

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 872 335**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4439** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2015** **E 18173541 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021** **EP 3388064**

54 Título: **Derivados de 2,4-tiazolidindiona en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

**02.04.2014 EP 14382130**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2021**

73 Titular/es:

**MINORYX THERAPEUTICS S.L. (100.0%)**  
**Av. Ernest Lluch 32**  
**08302 Mataró, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA COLLAZO, ANA MARÍA;**  
**ECKLAND, DAVID JOHN AUGUSTUS;**  
**PIZCUETA LALANZA, MARIA PILAR y**  
**MARTINELL PEDEMONTE, MARC**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 872 335 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

Derivados de 2,4-tiazolidindiona en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central

### Campo de la invención

Esta invención se refiere a nuevos usos de derivados de 2,4-tiazolidindiona como medicamentos en particular para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central.

### Antecedentes de la invención

Trastornos del sistema nervioso central (SN) son enfermedades de cualquier componente del cerebro y la médula espinal. Los trastornos del SN incluyen trastornos en los que el sistema nervioso está afectado durante toda la progresión de las enfermedades tales como enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxias degenerativas tales como ataxia de Friedrich, esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple y leucodistrofias), enfermedades cerebrovasculares (por ejemplo, isquemia global o local, hemorragia intracerebral, accidente cerebrovascular), convulsiones y epilepsia, enfermedades virales (por ejemplo, meningitis, encefalitis), tumores cerebrales y enfermedades neuroinflamatorias. Los trastornos de SN también incluyen trastornos en los que el sistema nervioso sólo se ve afectado durante las últimas etapas del desarrollo del trastorno. Estos trastornos incluyen enfermedades metabólicas raras como acidemias orgánicas o trastornos de los ácidos grasos y trastornos mitocondriales genéticos.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas. Estas condiciones son progresivas y a menudo mortales. El proceso de neurodegeneración no está bien entendido y las enfermedades que se derivan de él no tienen, hasta ahora, cura, a pesar de la búsqueda constante de tratamientos.

Algunas enfermedades neurodegenerativas también incluyen un componente inflamatorio, tales como esclerosis múltiple que tradicionalmente se consideró como una enfermedad desmielinizante mediada por inflamación pero, de hecho, es una enfermedad neurodegenerativa en la que el daño axonal, la muerte neuronal y la atrofia del SN central son las principales causas de discapacidad neurológica irreversible en los pacientes. Por tanto, la esclerosis múltiple puede considerarse una enfermedad neurodegenerativa pero también como una enfermedad neuroinflamatoria o enfermedad autoinmunitaria.

Leucodistrofias son un grupo de trastornos del SN genéricos cuya principal característica es la degeneración de la sustancia blanca del cerebro. Un trastorno de este grupo es la adrenoleucodistrofia (adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X o ALD-X). Este es un trastorno raro hereditario que conduce a un daño progresivo en el cerebro y otros tejidos y, finalmente, la muerte. Esta enfermedad puede considerarse como tanto neurodegenerativa como neuroinflamatoria.

ALD-X presenta tres fenotipos principales: (i) una adrenomieloneuropatía adulta (AMN) con axonopatía en la médula espinal, (ii) adrenomieloneuropatía cerebral con desmielinización cerebral (cAMN), y (iii) la variante de la niñez (cALD), caracterizada por la desmielinización cerebral severa. ALD-X es la leucodistrofia más frecuentemente heredada, con una incidencia mínima de 1 en 17.000 incluyendo hembras portadoras y machos hemicigóticos.

Las enfermedades cerebrovasculares son un grupo de disfunciones cerebrales relacionadas con la enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro. Hay cuatro tipos: accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio (AIT), hemorragia subaracnoidea y demencia vascular.

La epilepsia es un trastorno impredecible, grave y potencialmente mortal del sistema nervioso. Cerca de 50 millones de personas en todo el mundo tienen epilepsia.

Los tumores cerebrales son generados por una división celular anormal y descontrolada, no sólo en el cerebro (neuronas o células gliales), sino también en los vasos sanguíneos, los nervios craneales, las meninges, el cráneo y la hipófisis o glándula pineal. Los tumores cerebrales incluyen también aquellos que se han extendido a partir de células cancerosas primarias ubicadas en otros órganos (metástasis).

Las enfermedades virales del sistema nervioso son causadas por infecciones virales en el SN. Estas infecciones pueden provocar afecciones neurológicas y enfermedades inflamatorias potencialmente graves como la encefalitis, una inflamación del cerebro en sí, la meningitis que resulta en la inflamación de las meninges o mielitis que conlleva inflamación de la médula espinal. La rabia, el sarampión, las paperas, la poliomielitis, herpes simple o varicela zoster son tipos de infecciones virales del sistema nervioso.

Enfermedades metabólicas raras (también conocidas como errores congénitos del metabolismo) suelen ser enfermedades monogénicas en las que ciertas vías metabólicas están perturbadas originando disfunciones, en muchos casos en el SN central. Se trata de enfermedades debilitantes de forma crónicas y potencialmente mortales.

Enfermedades mitocondriales genéticas pueden ser causadas por mutaciones tanto en el mtDNA como en el nDNA,

que deterioran la función mitocondrial y por lo general resultan en enfermedad multisistémica muy severa desde el nacimiento, incluyendo manifestaciones graves del SN.

Hay una necesidad urgente de nuevos tratamientos de trastornos del SN central.

- 5 Una amplia variedad de 2,4-tiazolidindionas enriquecidas con deuterio se han descrito en el documento US 2014/0275180. Este documento también da a conocer su uso profético en el tratamiento de una variedad de diferentes enfermedades. Sin embargo, este documento no proporciona ninguna prueba en este sentido o con respecto a la capacidad de estos compuestos para cruzar la barrera hematoencefálica (BHE).

- 10 Pioglitazona es un fármaco comercializado para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. La pioglitazona es un agonista potente de los receptores activados por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR) y se ha propuesto para el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA y ataxia de Friedreich. El documento US 2013/0274295 da a conocer la utilidad de la pioglitazona en el tratamiento de la ALD-X basándose en datos preclínicos. Aunque los modelos preclínicos han mostrado resultados prometedores, los ensayos clínicos hasta la fecha no han demostrado beneficios clínicos en cualquiera de estas enfermedades muy graves.

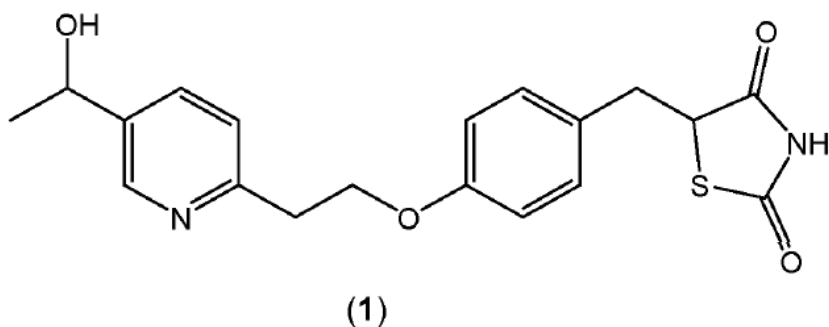
- 15 Además, la pioglitazona se ha asociado con efectos secundarios no deseados, incluidos los efectos cardiovasculares, retención de líquidos, aumento de peso y el cáncer de vejiga. Las altas dosis de pioglitazona, por lo tanto indeseable como la alta exposición sistémica sería probable que resulte en efectos secundarios graves.

- 20 La pioglitazona es una droga "sucia" que se transforma en muchos metabolitos in vivo. La vía metabólica de pioglitazona después de la administración oral ha sido estudiada en varias especies animales y en los seres humanos y los metabolitos se han descrito en la literatura (véase, por ejemplo Sohda et al, Chem. Pharm Bull, 1995, 43 (12), 2168-2172 y Maeshiba et al, Arzneim.-Forsch/Drug Res., 1997, 47 (I), 29-35). Al menos seis metabolitos se han identificado, llamándose de M-I a M-VI. Entre estos metabolitos, M-II, M-III y M-IV muestran alguna actividad farmacológica, pero son menos activos que pioglitazona en modelos preclínicos diabéticos.

- 25 La distribución de pioglitazona y sus metabolitos en diversos tejidos después de la administración oral de [<sup>14</sup>C]-Pioglitazona a ratas también ha sido estudiada (Maeshiba et al, Arzneim.-Forsch/Drug Res., 1997, 47 (I), 29-35). En la mayoría de los tejidos las concentraciones de pioglitazona y metabolitos M-I a M-VI eran más bajas que en el plasma y una de las concentraciones más bajas de radiactividad se encontró en el cerebro donde se detectó principalmente sólo pioglitazona.

### Sumario de la invención

- 30 Sorprendentemente, se ha encontrado que los trastornos del SN central pueden ser tratados por 5-[4-[2-(5-(1-hidroxietil)-2-piridinil)etoxi]bencil]-2,4-tiazolidindiona de fórmula (1), el metabolito M-IV de la pioglitazona.



o una sal del mismo.

- 35 En la presente invención, los trastornos del SN están limitados a aquéllos trastornos definidos en las reivindicaciones.

- 40 La invención se basa al menos en parte en los datos que muestran la capacidad inesperada del compuesto de fórmula (1) para cruzar la barrera hematoencefálica. Además, el compuesto de la invención tiene una o más propiedades deseables en un medicamento tales como una buena biodisponibilidad oral, baja eliminación del plasma sistémico y un buen volumen de distribución. Además, el compuesto de la invención es un fármaco razonablemente "limpio", ya que in vivo sólo se convierte en 5-(4-(2-(5-acetil-2-piridil)etoxi)bencil)-2,4-tiazolidindiona (metabolito M-III de pioglitazona) y ambos se excretan. Por lo tanto, los efectos secundarios debidos a los metabolitos no deseados se reducen al mínimo.

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (1) o sales farmacéuticamente aceptables del mismo o mezcla de compuestos de fórmula (1) para su uso en el tratamiento o la

prevención de los trastornos del SN central definidos en la reivindicación 1.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona los compuestos nuevos (2) a (5):

(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona

(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona

5 (4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona

(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o mezclas de uno o más de los compuestos (2) a (5) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en el tratamiento o la prevención de los trastornos del sistema nervioso central definidos en la reivindicación 4.

## 10 Descripción de las figuras

La figura 1 representa la concentración de compuesto de fórmula (1) en el plasma un ratón C57BL/6 después de una sola administración intravenosa de 1 mg/kg de dicho compuesto.

La figura 2 representa las concentraciones de compuesto de fórmula (1) en el plasma un ratón C57BL/6 después de una sola administración oral de 4,5 mg/kg de dicho compuesto.

15 La figura 3 representa la concentración de compuesto de fórmula (1) en el tejido cerebral de un ratón C57BL/6 después de una sola administración oral de 4,5 mg/kg de dicho compuesto (línea con marcadores de círculo) y después de una sola administración intravenosa de 1 mg/kg de dicho compuesto (línea con marcadores cuadrados).

La figura 4 representa la razón plasma-cerebro calculada basándose en los niveles de pioglitazona, MIV, MIII y MII en plasma y cerebro cuantificados a C<sub>max</sub> (concentración máxima) tras la dosificación oral de una sola administración de pioglitazona a 4,5 mg/kg en ratones C57BL/6 macho.

La figura 5 representa la razón plasma-cerebro calculada basándose en las curvas farmacocinéticas de concentración plasmática y cerebral-tiempo calculados como área bajo las curvas de pioglitazona y tras la dosificación oral de una única administración de o bien pioglitazona o bien MIV ambos a 4,5 mg/kg en ratones C57BL/6 macho.

25 La figura 6 representa las concentraciones de mezcla (c) que comprenden los compuestos (2) y (4) y mezcla (d) que comprende los compuestos (3) y (5) en plasma de un ratón C57BL/6 tras una única administración oral de 4,5 mg/kg de dichas mezclas.

La figura 7 representa el efecto del compuesto de fórmula (1) en neuronas corticales de rata primarias lesionadas mediante glutamato.

30 La figura 8 representa el efecto del compuesto de fórmula (1) en cultivo primario de neuronas sensoriales lesionadas mediante paclitaxel (Taxol).

La figura 9 representa el efecto del compuesto de fórmula (1) en la puntuación de discapacidad en un estudio de eficacia *in vivo* en una encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) de modelo de ratón múltiple.

La figura 10 representa el efecto del compuesto de fórmula (1) en neuronas motoras primarias lesionadas mediante glutamato.

## 35 Descripción de las realizaciones preferidas

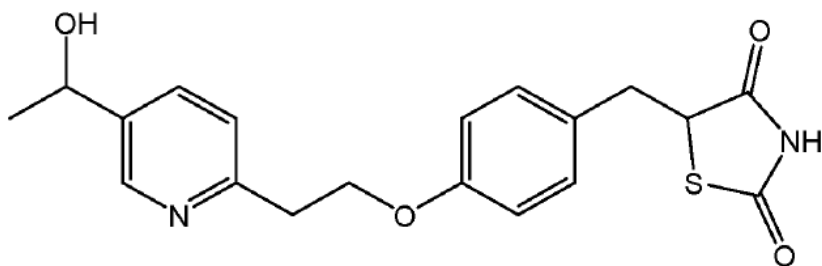
En la presente invención, los términos "compuesto de fórmula (1)", "M-IV", "MIV" y "M4" se refieren indistintamente a 5-[4-[2-(5-(1-hidroxietil)-2-piridinil)etoxi]bencil]-2,4-tiazolidindiona, que tiene la estructura representada anteriormente.

40 En un aspecto, la administración del compuesto de fórmula (1), o una sal farmacéuticamente aceptable es útil para el tratamiento o prevención de los trastornos del SN central definidos en la reivindicación 1.

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de esta memoria descriptiva significa mejorar o eliminar la enfermedad o uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad. "Tratamiento" también abarca mejorar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad.

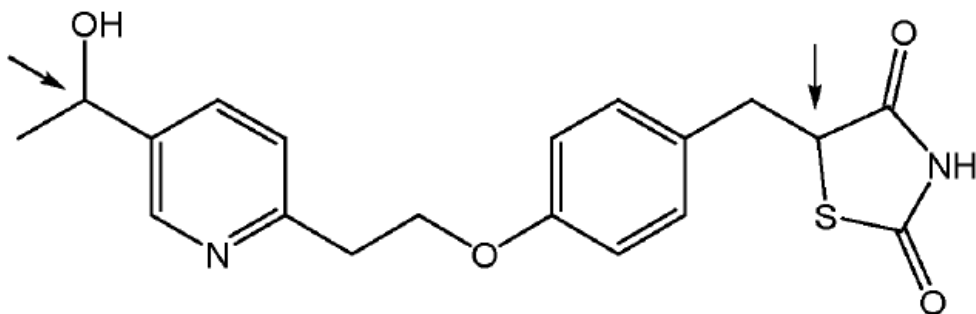
45 El término "mejorar" en el contexto de esta invención se entiende que significa cualquier mejora en la situación del paciente tratado.

El término "prevención" o "prevenir" se refiere a la reducción en el riesgo de adquirir o desarrollar una enfermedad o trastorno dado, o a la reducción o inhibición de la reaparición de una enfermedad o un trastorno.



(1)

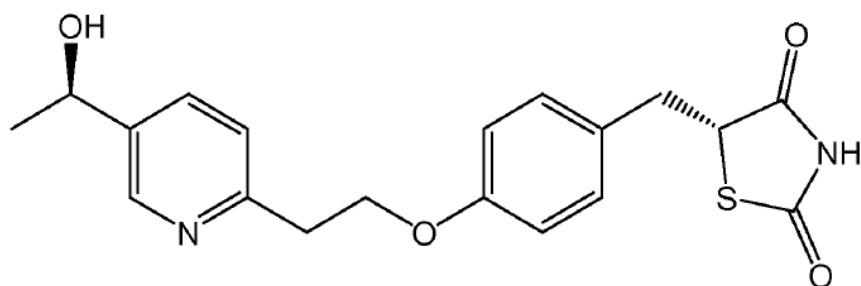
El compuesto de fórmula (1) puede denominarse 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil) piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona y tiene dos centros quirales. Uno de ellos es el átomo de carbono en la posición 5 del anillo de tiazolidindiona y el otro átomo de carbono asimétrico está en la posición 1 del grupo hidroxietilo tal como se muestra por las flechas:



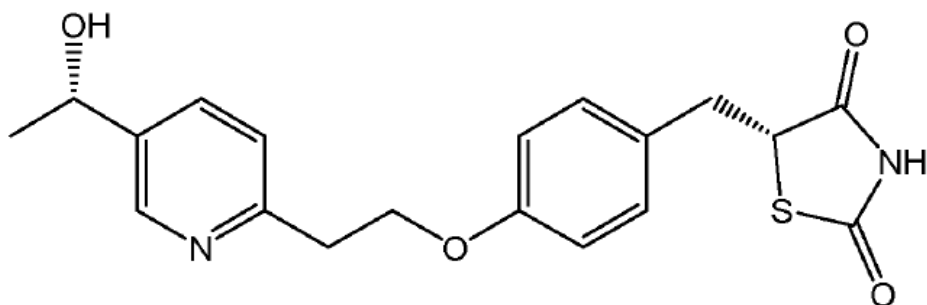
Tal como se usa en el presente documento, el término “compuesto de fórmula (1)” se usa para designar todos los posibles estereoisómeros, incluyendo enantiómeros y diastereómeros, y mezclas, incluyendo mezclas racémicas de los mismos.

En otro aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos (2) a (5) para su uso en el tratamiento o la prevención de los trastornos del sistema nervioso central definidos en las reivindicaciones:

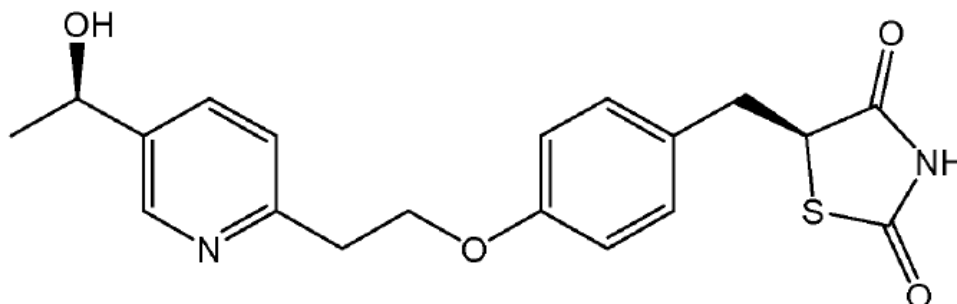
(2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona



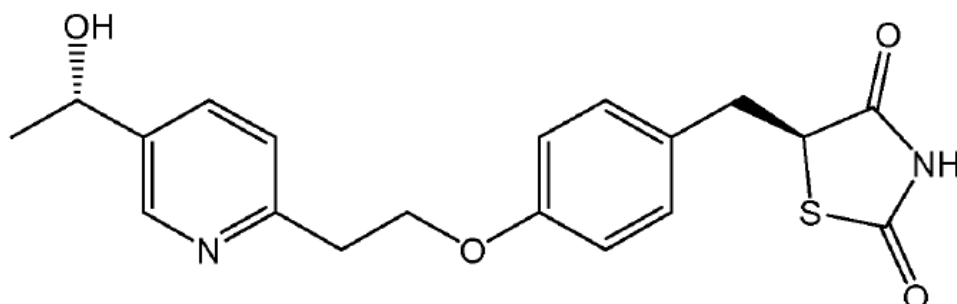
(3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona



(4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona



(5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona



5 o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos

Aunque los compuestos (2) a (5) se han preparado y aislado su configuración absoluta (R/S) aún no se ha determinado y sólo su rotación óptica se ha determinado.

10 Preferiblemente, la referencia a los compuestos (1) a (5) en la presente invención pretende designar los compuestos (1) a (5) que tienen átomos de hidrógeno que están predominantemente en forma de su isótopo  $^1\text{H}$ , es decir, no más del 1% del número total de átomos de hidrógeno por mol de compuesto está en forma del isótopo  $^2\text{H}$  (deuterio), todavía más preferiblemente no más del 0,015% (que es la abundancia natural del deuterio) del número total de átomos de hidrógeno por mol de compuesto están en forma del isótopo  $^2\text{H}$  (deuterio).

En una forma de realización particular, se prefieren las siguientes mezclas de compuesto (2) a (5):

15 (a) las mezclas que comprenden compuestos (2) y (3), siendo preferiblemente los compuestos (2) y (3) los únicos compuestos de fórmula (1) presentes en las mezclas;

(b) mezclas que comprenden (4) y (5), siendo preferiblemente los compuestos (4) y (5) los únicos compuestos de fórmula (1) presentes en las mezclas;

(c) mezclas que comprenden (2) y (4), siendo preferiblemente los compuestos (2) y (4) los únicos compuestos de fórmula (1) presentes en las mezclas;

20 (d) mezclas que comprenden (3) y (5), siendo preferiblemente los compuestos (3) y (5) los únicos compuestos de fórmula (1) presentes en las mezclas.

Las mezclas (c) y (d) se prefieren particularmente.

25 En las mezclas de (a) a (d) mencionadas anteriormente, se prefiere particularmente que los dos compuestos mencionados en cada una de las mezclas estén presentes en cantidades equimolares. Dichas mezclas pueden contener también cantidades menores (preferiblemente menos del 10% en peso, más preferiblemente menos del 3% en peso, aún más preferiblemente menos del 1% peso y lo más preferiblemente menos del 0,1% en peso de otros compuestos de fórmula (1)).

30 Para uso en el tratamiento de trastornos del SN central, pueden considerarse varios factores al seleccionar un compuesto preferido. Se prefiere un compuesto que muestra una alta exposición en cerebro frente a plasma. Un compuesto preferido muestra una potente actividad agonista de PPAR-gamma, pero compuestos con actividad agonista de PPAR-gamma menos potente son también útiles. Otros factores, incluyendo pero sin limitarse a, la actividad farmacológica (distinta de PPAR-gamma), ADME, perfil farmacocinético, toxicidad, seguridad, propiedades de distribución en el cerebro, acumulación de compuesto en los tejidos, el metabolismo y la eliminación de

compuesto, la variación genotípica en las propiedades fisicoquímicas y de aclaramiento pueden considerarse también para la selección de un compuesto preferido. Un compuesto preferido tiene una baja toxicidad en el sistema nervioso central. Un compuesto preferido tiene una baja toxicidad sistémica. La presencia o ausencia de actividad de PPAR alfa también puede considerarse. En algunos casos es deseable que el compuesto dé como resultado una  
 5 baja o nula acumulación en el cerebro. Esto puede reducir el riesgo de toxicidad en el sistema nervioso central y/o permitir una rápida reversión del efecto del fármaco en el sistema nervioso central. En otros casos, puede ser preferible una alta acumulación en el cerebro con exposición sistémica limitada. Esto puede dar como resultado una mayor exposición del sistema nervioso central para el fármaco y una mayor eficacia. A menudo es ventajoso que el compuesto no esté sometido a variaciones genotípicas significativas en su aclaramiento. Esto da como resultado  
 10 una eficacia más consistente. Estas actividades pueden determinarse mediante el uso de los ensayos *in vitro* e *in vivo* apropiados.

En una realización particular de los aspectos de la invención descritos arriba, el trastorno es ataxia de Friedreich.

Un compuesto preferido o mezcla de compuestos puede seleccionarse para una vía de administración particular. Algunos compuestos o mezcla de compuestos también pueden preferirse basándose en su uso para tratar una  
 15 enfermedad particular.

Los compuestos de la invención pueden estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales preparadas a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables ilustrativas de los compuestos de la presente invención pueden prepararse a partir de los siguientes ácidos, incluyendo, sin limitación, ácidos fórmico, acético, propiónico, benzoico, acético, propiónico, benzoico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, maleico, málico, tartárico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, isocítrico, xinafoico, tartárico, trifluoroacético, pamoico, propiónico, antranílico, mesílico, napadisilato, oxalacético, oleico, esteárico, salicílico, p-hidroxibenzoico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico),  
 20 metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluenosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, salicílico, ciclohexilaminosulfónico, algénico,  $\beta$ -hidroxibutírico, galactárico y galacturónico. Las sales farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen las sales del ácido clorhídrico y ácido bromhídrico.

La utilidad del compuesto de fórmula (1), incluyendo sus estereoisómeros (2) a (5), mezclas de (a) a (d) y la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede demostrar en ensayos *in vitro* o *in vivo* apropiados tal como se describe en los ejemplos.  
 30

Los compuestos de la invención o sales farmacéuticamente aceptables se pueden usar según la invención cuando se administra también al paciente o en combinación con uno o más de otro agente terapéutico seleccionado de agentes antiinflamatorios y analgésicos, agonistas de la dopamina (por ejemplo levodopa), inhibidores de MAO-B, inhibidores de catecol O-metiltransferasa (COMT), anticolinérgicos, otros antiparkinsonianos (por ejemplo amantadina), receptores antiNMDA (por ejemplo, memantina), inhibidores de colinesterasa, inhibidores de ACE, antagonistas de glutamato (por ejemplo, riluzol), antioxidantes, inmunomoduladores (por ejemplo fingolimod, anticuerpos monoclonales anti CD52, CD25 y CD20, interferón- $\beta$ -1a, natalizumab, laquinimod, dimetilfumarato),  
 35 agentes quimioterapéuticos, agentes de terapia de reemplazo de enzimas, agentes de terapia de reducción de sustrato, corticosteroides, antiproliferativos (por ejemplo, metotrexato), medicamentos anticonvulsivos, anticoagulantes, antihipertensivos y neuroprotectores. Los compuestos de la invención también se pueden usar cuando el paciente está sometiéndose a terapia génica, trasplante de médula ósea, estimulación profunda del cerebro o radioterapia.  
 40

Composiciones farmacéuticas para su uso tal como se define en las reivindicaciones comprenden los compuestos (2) a (5), mezclas de (a) a (d) o una sal farmacéuticamente aceptable representan otras realizaciones de la invención. Puede usarse cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, cualquiera de las vías de administración oral, intraoral, tópica, epicutánea, subcutánea, transdérmica, intramuscular, parenteral, ocular, rectal, vaginal, inhalación, bucal, sublingual e intranasal pueden ser adecuadas. Puede ser preferible la administración oral. Las formas orales de las composiciones farmacéuticas pueden ser sólidas o líquidas. Formas de dosificación adecuadas pueden ser comprimidos, cápsulas, pastillas, gránulos, suspensiones, emulsiones, jarabes o disoluciones. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son una forma sólida seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, píldoras o gránulos. Particularmente preferidos son los comprimidos. También se prefieren las disoluciones o suspensiones orales. Estas son ventajosas cuando el paciente tiene dificultad para tragar, por ejemplo como resultado de la enfermedad o para uso geriátrico y pediátrico. Preparaciones sublinguales  
 45 son también ventajosas.  
 50  
 55

Por una cantidad “eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un fármaco o agente farmacológicamente activo quiere decirse una cantidad no tóxica pero suficiente del fármaco o agente para proporcionar el efecto deseado. La cantidad que es “eficaz” variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad y estado general del individuo, el agente o agentes activos particulares, y similares. Por tanto, no siempre es posible especificar una

“cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarla un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina. Por tanto, la dosis del agente activo dependerá de la naturaleza y el grado del estado, la edad y el estado del paciente, y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Una dosis diaria típica es de desde 0,1 hasta 200 mg, preferiblemente desde 20 hasta 200 mg, por ejemplo para un adulto 10-100 mg administrados como una única dosis sin dosificación adicional o en múltiples dosis, por ejemplo de una a tres veces al día. Los compuestos descritos en el presente documento también pueden administrarse en dosis diarias de desde 80 hasta 600 mg.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica y pueden prepararse por métodos convencionales.

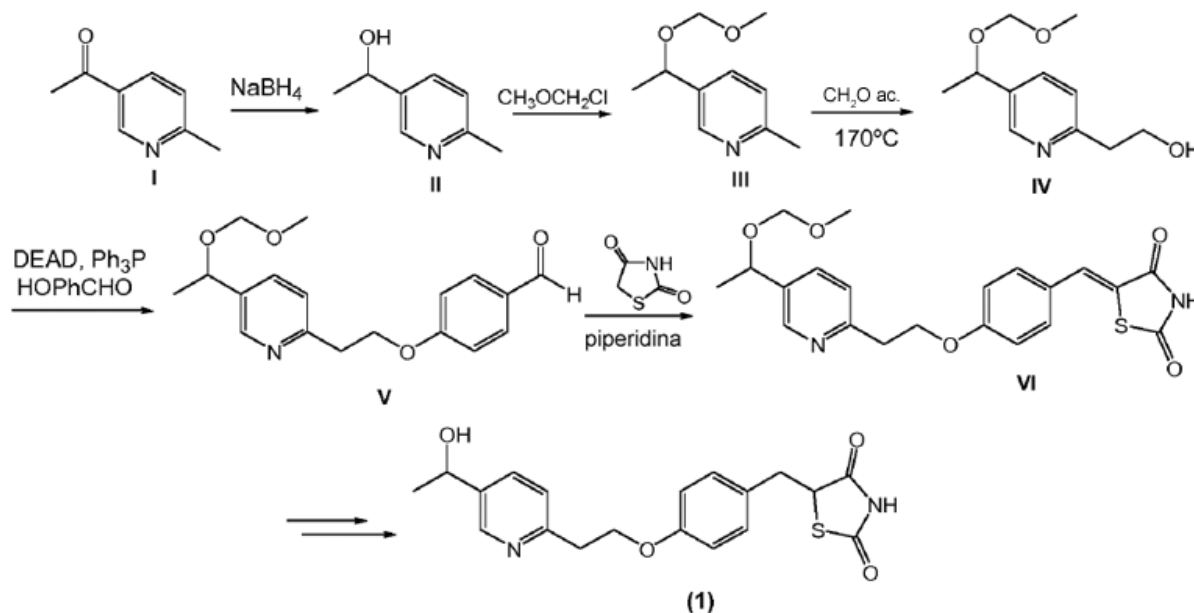
Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más agentes terapéuticos. Los tratamientos de combinación pueden administrarse de manera simultánea, secuencial o por separado, por la misma o por diferentes vías, o antes de, durante y después de procedimientos quirúrgicos o de intervención.

Los compuestos para el uso de la invención pueden prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica y/o por los procedimientos descritos a continuación. También se apreciará que los grupos funcionales, tales como grupos amino o hidroxilo, presentes en los diversos compuestos descritos, y que se desea conservar, pueden necesitar estar en forma protegida antes de que se inicie cualquier reacción. En tales casos, la eliminación del grupo protector puede ser la etapa final en una reacción particular. Los grupos protectores adecuados para tal funcionalidad serán evidentes para los expertos en la técnica. Para detalles específicos véase “Protective Groups in Organic Synthesis”, Wiley Interscience, TW Greene, PGM Wuts. Cualquier mezcla de productos finales o intermedios obtenidos se pueden separar basándose en las diferencias fisicoquímicas de los constituyentes, de manera conocida, en los productos finales o intermedios puros, por ejemplo por cromatografía, destilación, cristalización fraccionada o mediante la formación de una sal si es apropiado o posible dadas las circunstancias.

Los compuestos para su uso según la invención pueden prepararse por los procedimientos siguientes o similares.

El compuesto 5-[4-[2-(5-(1-hidroxietil)-2-piridinil)etoxi]bencil]-2,4-tiazolidindiona de fórmula (1) se puede preparar según el esquema 1 (véase, por ejemplo J. Med. Chem. 1996, 39 (26), 5053).

#### Esquema 1



Entre otras rutas, una mezcla de compuestos (2) y (4) o una mezcla de compuestos (3) y (5) de la invención pueden prepararse como en el esquema 1, pero utilizando alcoholes enantioméricamente puros (IIa) y (IIb) como materiales de partida.

Los compuestos intermedios de fórmula (IIa) y (IIb) pueden prepararse como enantiómeros individuales a partir del alcohol racémico (II) mediante uno o más de los siguientes procedimientos (esquema 2):

a) Separación por cromatografía quiral HPLC utilizando columnas quirales disponibles en el mercado.

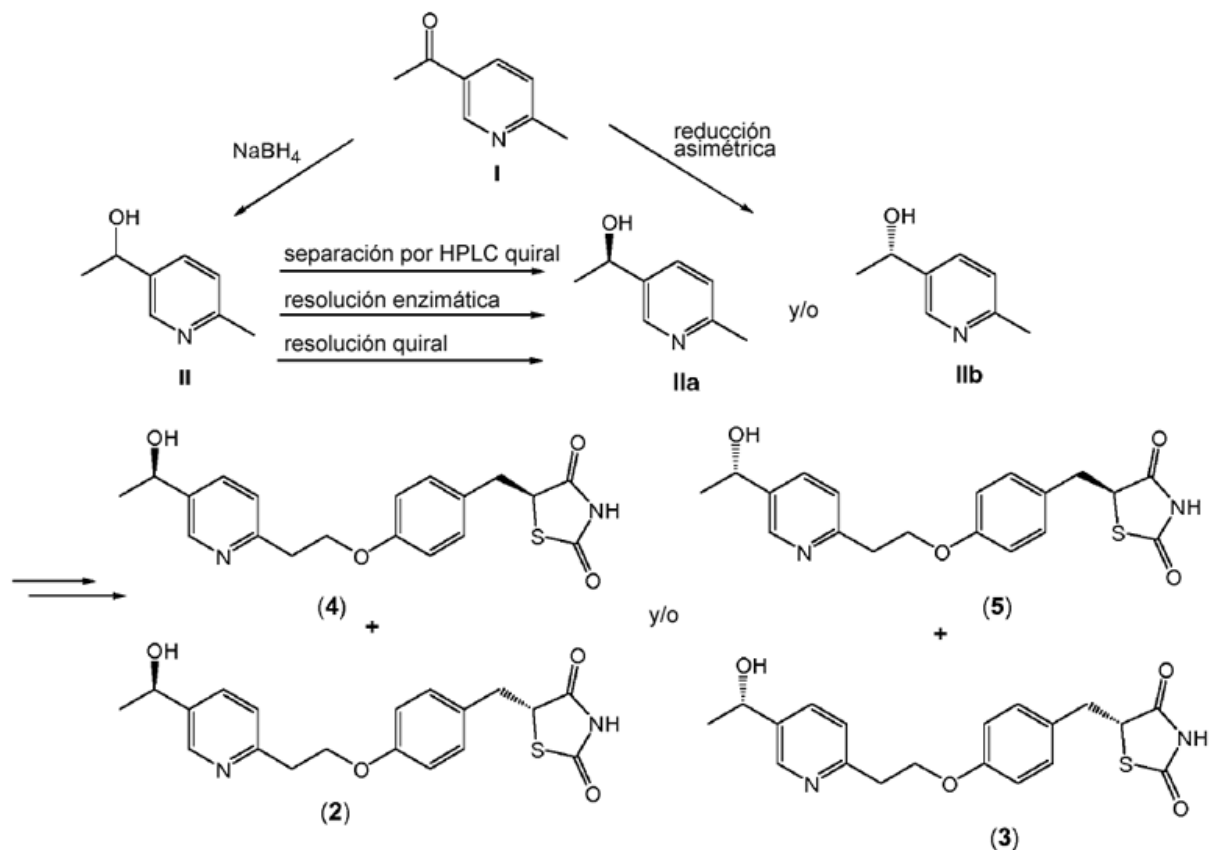
b) Resolución enzimática mediante el tratamiento de la mezcla isomérica con una enzima, tal como lipasa, que acetilará uno de los isómeros dejando el otro isómero sin reaccionar. Los dos isómeros se pueden separar



fácilmente.

c) Por tratamiento de la mezcla isomérica con reactivos de resolución y la separación de los diastereoisómeros resultantes por cristalización o por cromatografía en columna ordinaria.

Esquema 2



5

Un método alternativo para preparar los compuestos intermedios (**IIa**) y (**IIb**) como enantiómeros individuales por síntesis quiral, el tratamiento de un sustrato de fórmula (**I**) con un agente reductor quiral apropiado conocido por los expertos en la técnica.

10

Aún otro método para preparar mezclas (c), que comprenden el compuesto (**2**) y (**4**), y (d), que comprenden los compuestos (**3**) y (**5**), (esquema 3), incluye la resolución de la mezcla racémica **VIII** utilizando los métodos ya descritos (separación por HPLC quiral, resolución enzimática, resolución quiral, etc.) seguido de reducción de dobles enlaces en cada uno de los enantiómeros **VIIIa** y **VIIIb**.

The reaction scheme illustrates the synthesis of chiral thiohydantoin derivatives (2) and (3) from precursor (VI). The process begins with the conversion of (VI) to (VIII), which is a racemic mixture of enantiomers (VIIIa and VIIIb). This conversion is achieved through a series of steps: separation by chiral HPLC, enzymatic resolution, and chiral resolution.

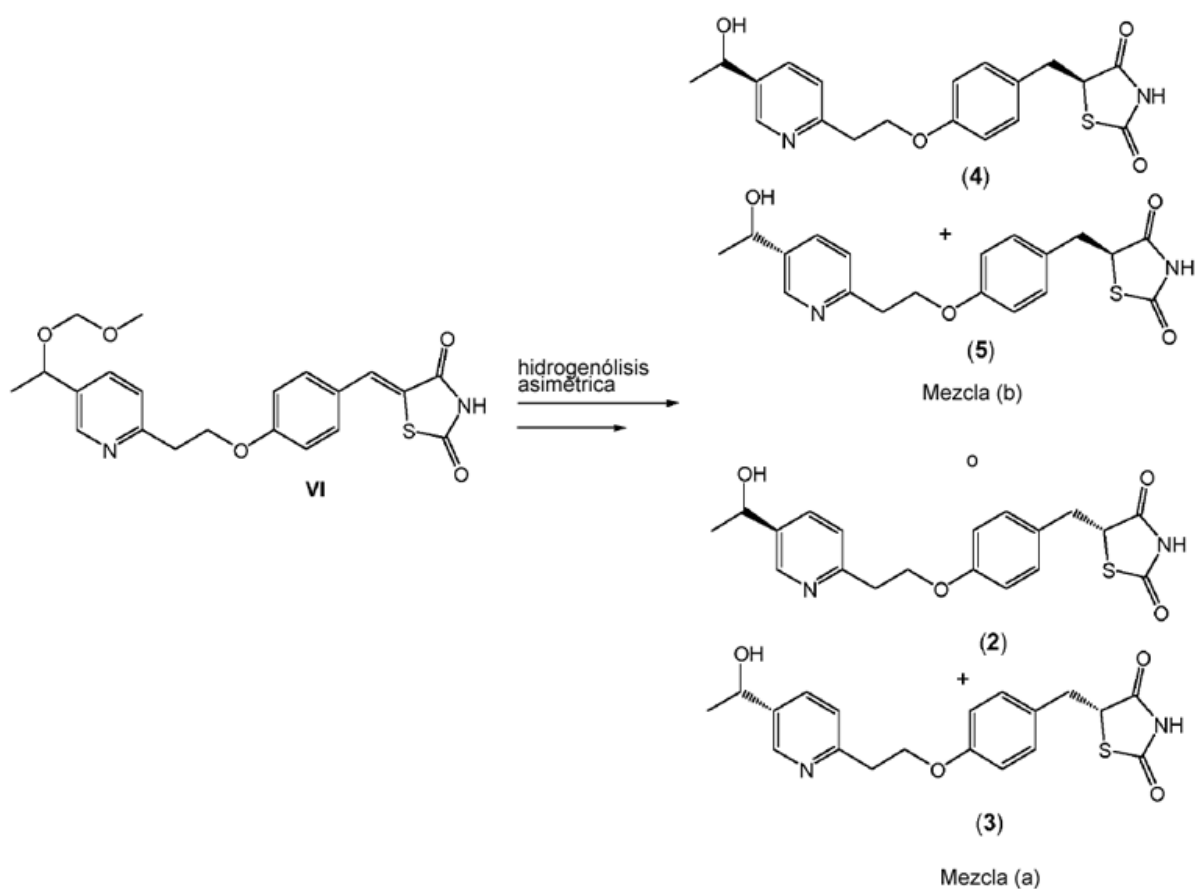
The racemic mixture (VIII) is then separated into its enantiomers, (VIIIa) and (VIIIb). Each enantiomer is further resolved into its corresponding chiral thiohydantoin derivative, (2) and (3), respectively. The structures of (2) and (3) are shown as diastereomers, with (2) being the (R,R)-isomer and (3) being the (S,S)-isomer.

Chemical structures shown:

- VI**: A thiohydantoin derivative with a 4-(2-(4-methoxyphenyl)ethoxy)phenyl group and a 2-(4-methoxyphenyl)ethyl group.
- VIII**: A thiohydantoin derivative with a 4-(2-(4-methoxyphenyl)ethoxy)phenyl group and a 2-(4-methoxyphenyl)ethyl group, shown as a racemic mixture of enantiomers (VIIIa and VIIIb).
- VIIIa** and **VIIIb**: Enantiomers of the thiohydantoin derivative (VIII).
- (2)** and **(3)**: Chiral thiohydantoin derivatives, shown as diastereomers.

La mezcla (b) (que comprende compuestos de fórmula (4) y (5)) y la mezcla (a) (que comprende compuestos de fórmula (2) y (3)) de la invención pueden prepararse por hidrogenólisis asimétrica de un compuesto de fórmula VI usando, por ejemplo, catalizadores de rodio o iridio en presencia de ligandos quirales tal como se muestra en el esquema 4. La reducción quiral del doble enlace también se puede realizar utilizando biocatalizadores (por ejemplo, *Rhodotorula rubra* y *Rhodotorula glutinis*).

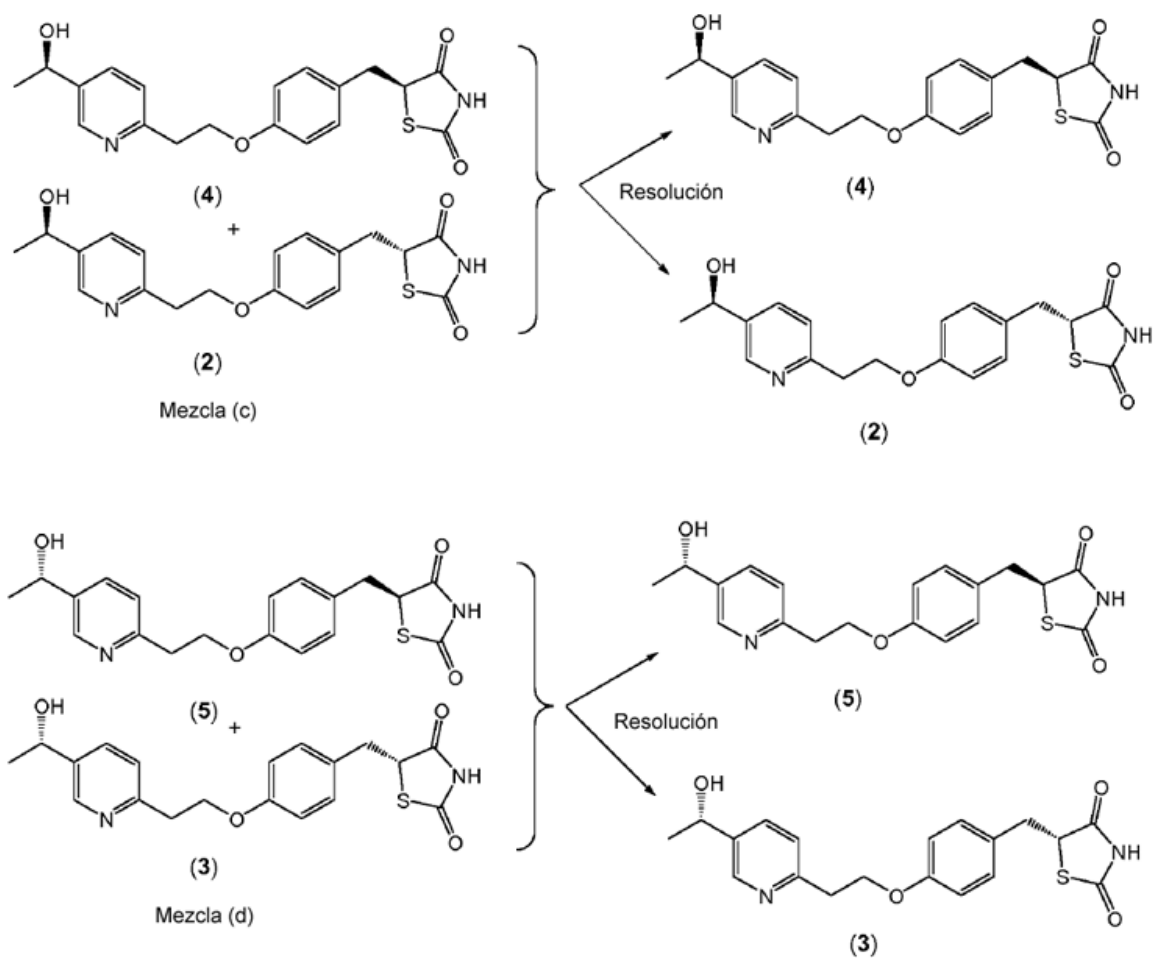
Esquema 4



Los compuestos de fórmula (2), (3), (4) y (5) se pueden obtener a partir de mezclas (c) y (d) (esquema 5) mediante separación por HPLC quiral. Alternativamente, los compuestos enantioméricamente puros deseados pueden prepararse por procedimientos de síntesis quirales conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo: hidrogenólisis asimétrica del correspondiente isómero individual del compuesto VI).

5

## Esquema 5



## Abreviaturas:

- ACE: Enzima convertidora de angiotensina
- ADME: Absorción, distribución, metabolismo y excreción
- 5 • ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
- AMN: Adrenomieloneuropatía
- AUC: Área bajo la curva
- ratón C57BL/6: ratón C57 negro 6
- cALD: Variante cerebral de ALD
- 10 • cAMN: Adrenomieloneuropatía cerebral
- CD20: Antígeno CD20 de linfocitos B
- CD25: Cadena alfa del receptor de IL-2
- CD52: Grupo de diferenciación 52
- ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
- 15 • Cmax: La concentración plasmática máxima después de la administración.
- COMT: Catecol O-metiltransferasa
- DEAD: Azodicarboxilato de dietilo

- CE<sub>50</sub>: La mitad de la concentración eficaz máxima
  - hERG: Gen relacionado con éter-a-go-go humano
  - HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución
  - LLOQ: Límite inferior de cuantificación
- 5
- MAO-B: Monoaminoxidasa B
  - ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
  - NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico
  - ADNn: Ácido desoxirribonucleico nuclear
  - SN: Sistema nervioso
- 10
- Ph: Fenilo
  - PPAR $\gamma$ : Receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales
  - qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
  - AIT: Ataque isquémico transitorio
  - Tmax: Tiempo hasta alcanzar la Cmax
- 15
- VSS: Volumen aparente de distribución en estado estacionario
  - ALD-X: Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

Los siguientes ejemplos apoyan la invención.

#### Ejemplo 1: Perfil farmacocinético y distribución cerebral

- 20 Protocolo: Se determinaron los parámetros farmacocinéticos y la distribución cerebral de 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona (racemato o estereoisómeros) tras una única administración de dosis oral (4,5 mg/kg) e intravenosa (1 mg/kg) a ratones C57 BL/6 macho. Se recogieron muestras de sangre y muestras de cerebro antes de la dosificación y en diferentes momentos después de la dosificación, tanto para farmacocinética oral como i.v. Todas las muestras se procesaron para su análisis mediante precipitación de proteínas utilizando acetonitrilo y se analizaron con el método de CL/EM/EM ajustado para el fin. El límite inferior de
- 25 cuantificación (LLOQ) en el plasma y el cerebro para 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona (1) es 0,99 ng/ml. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando la herramienta de análisis no compartimental de Phoenix WinNonlin.

- Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 1, figura 2 y figura 3. Los datos demuestran claramente que 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona (1) presenta un buen perfil farmacocinético, bajo aclaramiento plasmático sistémico y volumen de distribución (Vss) aceptable con una razón de exposición cerebro-plasma de 0,12.
- 30

- Después de una única administración intravenosa de 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona racémica (figura 1) a ratones C57BL/6 ratones a dosis de 1 mg/kg, el compuesto presentó un bajo aclaramiento plasmático sistémico (11,79 ml/min/kg, el flujo sanguíneo normal del hígado en ratones = 90 ml/min/kg) con semivida plasmática de eliminación terminal de 1,79 h. El V<sub>ss</sub> fue 2 veces mayor que el volumen normal de agua corporal total (0,7 l/kg).
- 35

- Después de una única administración oral de 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona racémica (1) a ratones C57BL/6 a dosis de 4,5 mg/kg (figura 2), se observaron concentraciones plasmáticas hasta 24 horas (1 animal). El Tmax en plasma fue de 0,50 h. La biodisponibilidad oral fue del 85%.

- 40 La figura 3 muestra las concentraciones cerebrales de ambos perfiles farmacocinéticos intravenoso y oral que se observaron hasta 8 horas. Tmax en el cerebro es de 0,50 horas con una razón de exposición de cerebro con respecto a plasma (AUC<sub>últ.</sub>) de 0,12.

- Estos resultados indican que 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona tiene un perfil farmacocinético favorable incluyendo buena biodisponibilidad oral y una razón de exposición de cerebro con respecto a plasma de 0,12, por lo tanto el compuesto cruza de manera significativa la barrera hematoencefálica.
- 45

Ejemplo 2: Mecanismo de acción: Farmacología *in vitro*

Protocolo: Para determinar el mecanismo de acción a través del agonismo de PPAR gamma, se realizó un ensayo funcional celular utilizando una línea celular recombinante humana cotransfectada con un indicador de luciferasa PPRE, PPAR- $\gamma$ , RXR- $\alpha$  y el coactivador DRIP205.

- 5 Las células transfectadas se trataron con dosis crecientes de los compuestos. Se detectó la actividad luciferasa mediante la tecnología AlphaScreen y se normalizó basándose en la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan como la inducción en veces con respecto al control (rosiglitazona 10  $\mu$ M). Se obtuvieron curvas de respuesta a la dosis. Los resultados se calcularon como CE<sub>50</sub>, que es la concentración de compuesto que provoca el 50% de la respuesta agonista de control.

CE<sub>50</sub> 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiiazolidin-2,4-diona racémica = 9,3  $\mu$ M

- 10 Los resultados de estos experimentos indican que 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiiazolidin-2,4-diona racémica y sus estereoisómeros tienen actividades agonistas de PPAR gamma variables, con una gama de CE<sub>50</sub>. Estos datos muestran que estos compuestos activan los receptores de PPAR gamma y en consecuencia las funciones biológicas dependiendo de esta activación.

Ejemplo 3

- 15 Condiciones experimentales generales:

Se registraron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN en un espectrómetro de RMN Varian de 400 MHz usando disolventes deuterados apropiados. Se realizaron análisis cromatográficos de los compuestos usando métodos apropiados tal como se muestra a continuación.

## Método de CLEM

- 20 Columna: Agilent Zorbax 3,5  $\mu$ m, SB-C8 (4,6 x 75 mm); longitud de onda: 210 nm; flujo: 1 ml/min; tiempo de ejecución: 7 min; gradiente de fase móvil (t/%B): 0/30, 3,5/95, 5/95, 5,5/30, 7/30 [A: agua (ácido fórmico al 0,1%); B: acetonitrilo]; MASA: APCI-ESI multimodo de cuadrupolo simple de Agilent.

## Método de HPLC quiral

- 25 Columna: Chiralpak-IA 5  $\mu$ m (4,6 mm x 250 mm); longitud de onda: 210 nm; flujo: 0,7 ml/min; tiempo de ejecución: 30 min; fase móvil-isocrática: 65/35 (A/B) [A: n-hexano (triethylamina al 0,05% y ácido trifluoroacético al 0,1%), B: alcohol isopropílico].

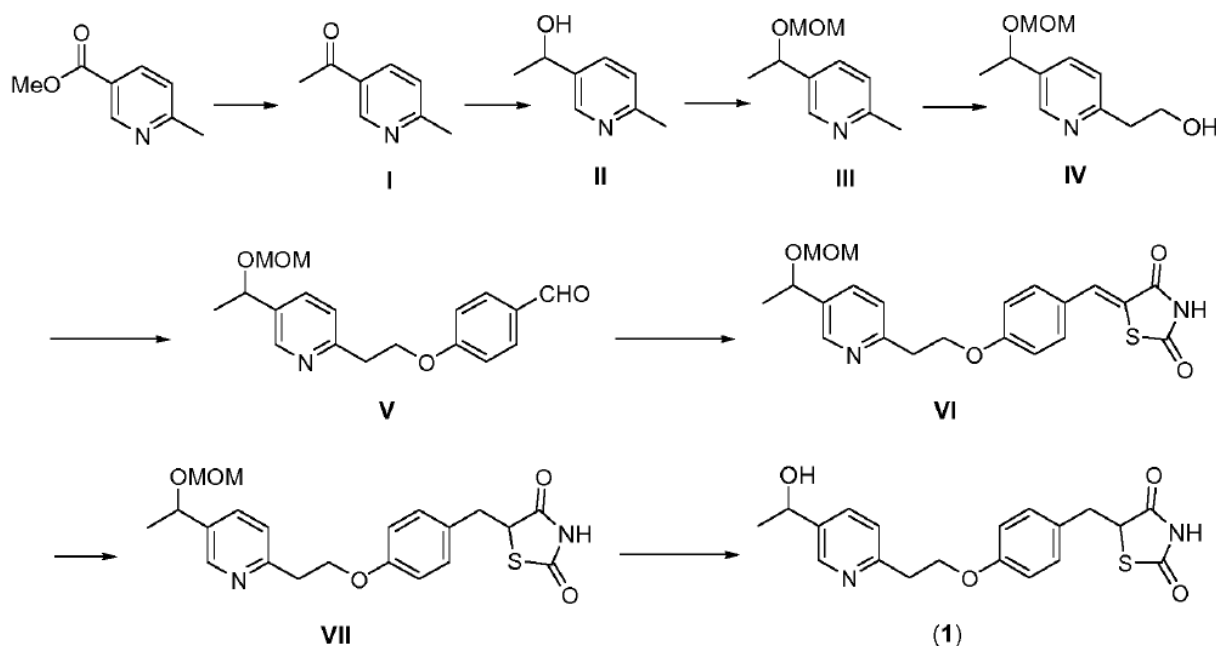
## Método de Prep-HPLC quiral

Columna: Chiralpak-IA 5  $\mu$ m (250 x 20 mm); longitud de onda: 254 nm; flujo: 18 ml/min; tiempo de ejecución: 60 min; fase móvil-isocrática 50/50 (A/B): A: n-hexano, B: EtOH (triethylamina al 0,05%).

- 30 Método de HPLC

Columna: Symmetry Shield RP-18, 5  $\mu$ m (4,6 x 250 mm); longitud de onda: 210 nm; flujo: 1 ml/min; tiempo de ejecución: 28 min; gradiente de fase móvil: (t/%B): 0/10, 8/10, 12/60, 16/80, 20/80, 24/10, 28/10 [A: agua (dihidrógeno-o-fosfato de potasio (pH ~3)), B: acetonitrilo].

Ejemplo 4: Se preparó 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiiazolidin-2,4-diona (1) según el esquema 6.



Esquema 6

#### 1-(6-Metil-piridin-3-il)-etanol (II)

Se añadió gota a gota LiHMDS (1,0 M en tetrahidrofurano, 463 ml, 0,463 moles) a una solución enfriada de 6-metilnicotinato de metilo (20 g, 0,132 mol) y acetato de etilo (82 g, 0,927 moles) en dimetilformamida a -50°C; se elevó gradualmente la temperatura hasta temperatura ambiente y se agitó a la misma temperatura. Después de 1 h, se enfrió la mezcla de reacción hasta 0°C; se diluyó lentamente con ácido sulfúrico al 20% y calentó a reflujo. Después de 4 h, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y adicionalmente hasta 0°C y se basificó con carbonato de potasio. El medio de reacción se diluyó con agua y se extrajo en acetato de etilo (3x50 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para proporcionar 1-(6-metil-piridin-3-il)etan-1-ona pura (compuesto I) (20,0 g) que se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación.

ES-EM [M +1] +: 136,1

Se añadió borohidruro de sodio (2,3 g, 0,06 moles) en pequeñas porciones a lo largo de 30 min, a una disolución del compuesto I (16,4 g, 0,121 mol) en etanol (160 ml) a 0°C y se agitó la mezcla de reacción a la misma temperatura. Después de 1 h, se diluyó la mezcla de reacción con disolución de bicarbonato de sodio (sat.) (2x200 ml) y se extrajo con diclorometano (2x500 ml). Se secó el extracto orgánico combinado sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un aceite de color amarillo pálido, que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (el 5% de metanol/diclorometano) para dar el compuesto II (17,0 g, rendimiento del 93% en 2 etapas) como un aceite de color amarillo pálido.

ES-EM [M +1] +: 138,1

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,35 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,63 (dd, J = 8,0, 2,4 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,89 (q, J = 6,5 Hz, 1H), 3,30 (s ancho, 1H), 2,50 (s, 3H), 1,48 (d, J = 6,5 Hz, 3H)

#### 5-(1-Metoximetoxi-etil)-2-metil-piridina (III)

Se añadió compuesto II (15 g, 0,109 moles), gota a gota, a una suspensión enfriada de hidruro de sodio (6,56 g, 0,164 mol) en tetrahidrofurano (150 ml) y se agitó a 0°C. Después de 30 min, se añadió gota a gota clorometil metil éter (13,2 g, 0,164 moles) mientras se agitaba y se mantenía la temperatura interna a alrededor de 0°C. Después de que la adición hubiera terminado, se agitó la mezcla de reacción a la misma temperatura durante 1 h. Se extinguió la reacción con agua enfriada con hielo (80 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3x50 ml). Se secó el extracto orgánico combinado sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un aceite de color naranja, que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (el 1% de metanol/diclorometano) para dar el compuesto III (10,0 g, rendimiento del 51%) como un aceite de color amarillo pálido.

ES-EM [M +1] +: 182,2

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,45 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,56 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,75 (q,

J = 6,4 Hz, 1H), 4,57 (ABq, 2H), 3,36 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 1,48 (d, J = 6,6 Hz, 3H)

2-[5-(1-Metoximetoxi-etil)-piridin-2-il]-etanol (IV)

- 5 Una mezcla de compuesto III (7,0 g, 0,0386 mol) y disolución de formaldehído al 37% (5,8 g, 0,077 moles) se calentó hasta 160°C en un tubo de vidrio sellado durante 5 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta t.a. y se concentró a presión reducida para proporcionar un compuesto en bruto que se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (el 1% de metanol/diclorometano) para dar el compuesto IV (1,2 g; rendimiento del 17%) como un aceite amarillo pálido.

ES-EM [M +1]<sup>+</sup>: 212,1

- 10 <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,42 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,65 (dd, J = 8,0, 2,4 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,72 (q, J = 6,6 Hz, 1H), 4,65 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 4,52 (ABq, 2H), 3,73 (m, 2H), 3,24 (s, 3H), 2,86 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,49 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

4-{2-[5-(1-Metoximetoxi-etil)-piridin-2-il]-etoxi}-benzaldehído (V)

- 15 Se añadió cloruro de metanosulfonilo (1,19 g, 0,01 moles), gota a gota, a una suspensión enfriada del compuesto IV (1,7 g, 0,008 mol) y trietilamina (1,79 ml, 0,013 mol) en diclorometano (20 ml) a 0°C y se agitó a la misma temperatura durante 1 h. Se diluyó la mezcla de reacción con agua (50 ml) y se extrajo con diclorometano (3x50 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para dar metanosulfonato de 2-(5-(1-(metoximetoxi)etil)piridin-2-il)etilo (2,04 g, rendimiento 88%) como un aceite amarillo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación.

ES-EM [M +1]<sup>+</sup>: 290

- 20 Se añadió metanosulfonato de 2-(5-(1-(metoximetoxi)etil)piridin-2-il)etilo (2,3 g, 0,008 moles) a una suspensión agitada de 4-hidroxibenzaldehído (1,65 g, 0,0137 moles) y carbonato de potasio (1,86 g, 0,0137 mol) en una mezcla de tolueno (25 ml) y etanol (25 ml); se agitó a 85°C durante 5 h. Después del consumo de los materiales de partida, se diluyó la mezcla de reacción con agua (30 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x100 ml). El extracto orgánico combinado se lavó con agua; se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar un líquido en bruto de color amarillo oscuro. El producto en crudo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (el 1% de metanol/diclorometano) para proporcionar el compuesto V (1,5 g, rendimiento del 60%) como un líquido amarillo pálido.
- 25

ES-EM [M +1]<sup>+</sup>: 316,1

5-(4-{2-[5-(1-Metoximetoxi-etil)-piridin-2-il]-etoxi}-benciliden)-tiazolidin-2,4-diona (VI)

- 30 Se añadió piperidina (80 mg, 0,95 mmol) a una disolución del compuesto V (0,6 g, 1,9 mmol) y tiazolidin-2,4-diona (0,22 g, 1,9 mmoles) en etanol (15 ml) y se calentó la mezcla a durante la noche a reflujo. Después de 15 h, se enfrió la mezcla de reacción hasta t.a. y se concentró a presión reducida para proporcionar una mezcla en bruto, que se purificó por cromatografía de columna ultrarrápida (el 2% de metanol/diclorometano) para dar el compuesto VI (500 mg, rendimiento del 64%) como un sólido amarillo.

- 35 ES-EM [M +1]<sup>+</sup>: 415,1

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12,25 (s ancho, 1H), 8,47 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,70 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,21 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,73 (m, 1H), 4,60-4,40 (m, 4H), 4,22 (t, J = 6,2 Hz, 1H), 3,24 (s, 3H), 3,20 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 1,41 (d, J = 6,0 Hz, 3H).

5-(4-{2-[5-(1-Hidroxietil)-piridin-2-il]-etoxi}-bencil)-tiazolidin-2,4-diona (1)

- 40 Una disolución de borohidruro de sodio (115 mg, 3,017 mmol) en hidróxido de sodio 0,2 N (1,2 ml) se añadió lentamente a una disolución con agitación del compuesto VI (0,5 g, 1,207 mmoles), dimetilglioxima (42 mg, 0,36 mmol) y CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (23 mg, 0,096 mmol) en una mezcla de agua (6 ml): tetrahidrofurano (6 ml) e hidróxido de sodio 1 M (1 ml) a 10°C y, después de la adición, se agitó la mezcla de reacción a t.a. Después de 1 h, el color de la reacción se aclaró y se añadieron cantidades adicionales de borohidruro de sodio (46 mg, 1,207 mmol) y CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (22 mg, 0,096 mmol) y se continuó la agitación a t.a. Después de 12 h, se neutralizó la reacción con ácido acético (pH ~7); se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo en acetato de etilo (3x50 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar el compuesto VII en bruto, 5-(4-(2-(5-(1-(metoximetoxi)etil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiazolidin-2,4-diona (0,4 g) como un semisólido amarillo pálido, que se usó en la siguiente etapa sin purificación.
- 45

- 50 ES-EM [M +1]<sup>+</sup>: 417,5

Se añadió HCl 2 N (2 ml) a una solución del compuesto VII (0,4 g, 0,96 mmol) en metanol (20 ml) y se calentó la mezcla a reflujo. Después de 4 h, se enfrió la mezcla de reacción hasta ta; se concentró a presión reducida para



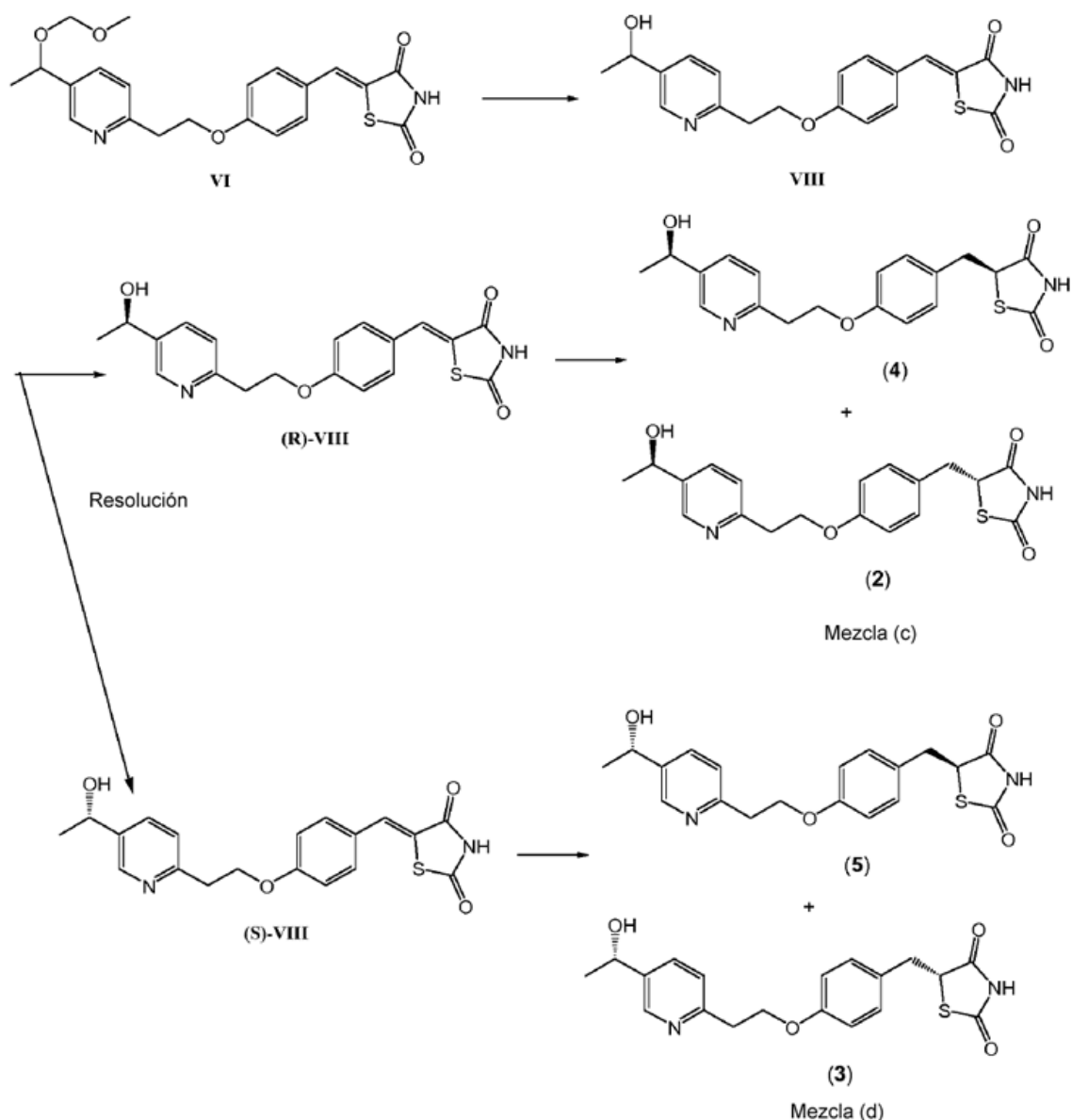
proporcionar un residuo que se disolvió en agua y se neutralizó la solución usando disolución de bicarbonato de sodio (sat.). Se recogió el precipitado blanco resultante por filtración para dar el compuesto 1 (250 mg, rendimiento del 56% a lo largo de 2 etapas) como un sólido de color blanquecino.

ES-EM  $[M + 1]^+$ : 373,4

- 5  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  12,00 (s ancho, -NH), 8,46 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 7,66 (dd,  $J = 8,0, 2,4$  Hz, 1H), 7,30 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,13 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 6,86 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 5,25 (d,  $J = 4,4$  Hz, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 4,30 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 3,30 (m, 1H), 3,14 (t,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 3,04 (m, 1H), 1,34 (d,  $J = 6,4$  Hz, 3H).

Ejemplo 5 (Mezcla (c) de compuestos (2) y (4)) y mezcla (c) de compuestos (3) y (4))

- 10 Se prepararon una mezcla de compuestos (2) y (4) (mezcla (c)) y una mezcla de compuestos (3) y (5) (mezcla (d)) según el esquema 7.



Esquema 7

El grupo metil clorometil éter de (Z)-5-(4-(2-(5-(1-(metoximetoxi)etil)piridin-2-il)etoxi)bencilideno)tiazolidin-2,4-diona (compuesto VI) se eliminó por tratamiento con HCl acuoso para dar el alcohol racémico VIII.

- 15 Los enantiómeros contenidos en la mezcla racémica de (Z)-5-(4-(2-(5-(1-hidroxi)etil)piridin-2-il)etoxi)bencilideno)tiazolidin-2,4-diona (VIII) se separaron mediante cromatografía de HPLC quiral para dar (R)-VIII y

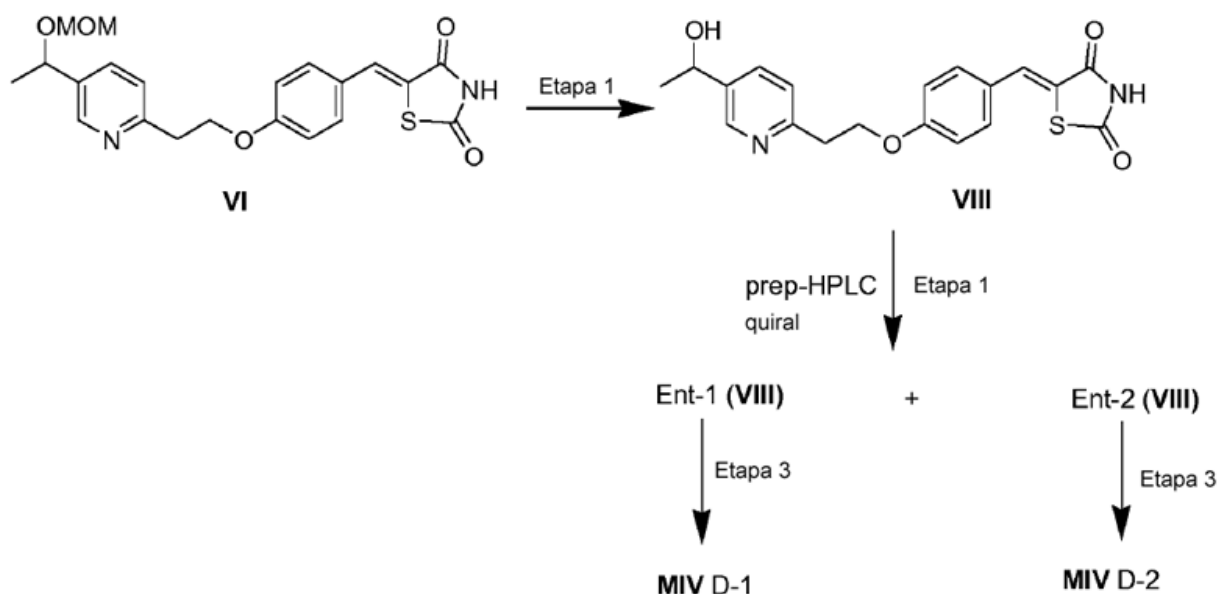
(S)-VIII.

(R)-VIII se trató entonces con una mezcla reductora ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , dimetilglioxima, NaOH, borohidruro de sodio), (protocolo de reducción de conjugado modificado de Pfaltz), para producir la mezcla (c) que comprende compuestos (2) y (4).

- 5 (S)-VIII se trató entonces con una mezcla reductora ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , dimetilglioxima, NaOH, borohidruro de sodio), (protocolo modificado de reducción de conjugado de Pfaltz), para producir la mezcla (d) que comprende los compuestos (3) y (5).

Ejemplo 6: Preparación de mezclas diastereoméricas de D-1 y D-2 de M-IV:

Esquema 1:



Etapa 1: Síntesis del compuesto VIII: Se añadió HCl (48 ml, 2 N) a una disolución del compuesto VI (10 g, 0,024 mol) en metanol (200 ml) y se calentó la mezcla a reflujo. Tras 4 h de reflujo, se enfrió la mezcla de reacción hasta t.a. y se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido amarillo. Se suspendió el sólido en agua (70 ml) y se neutralizó usando una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  saturada. Se recogió el precipitado amarillo pálido resultante mediante filtración y se secó a vacío para proporcionar el compuesto VIII (7,5 g; rendimiento del 84%).

ES-EM  $[\text{M}+1]^+$ : 371,0.

Etapa 2: prep. HPLC quiral

Se disolvió el compuesto VIII (1,0 g) en una mezcla que contenía volúmenes iguales de acetonitrilo, metanol y diclorometano; se inyectó (inyecciones de 150  $\mu\text{l}$ ) en la columna de prep-HPLC quiral (Chiralpak-IA 250 x 20 mm, 5 micrómetros) y se separó [fase móvil-n-hexano/ $\text{Et}_3\text{N}$  al 0,05% en EtOH (50:50); velocidad de flujo: 18 ml/min; tiempo de ejecución: 60 min]. Se concentraron por separado las fracciones que contenían los enantiómeros VIIIa y VIIIb a presión reducida hasta un volumen mínimo y se diluyeron los residuos respectivos con EtOAc (100 ml), seguido por agua (50 ml). Se secaron las fases orgánicas resultantes sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentraron para proporcionar los compuestos VIIIa y VIIIb como sólidos de color blanquecino. Se aislaron los enantiómeros VIIIa y VIIIb pero la configuración absoluta de cada enantiómero no se ha determinado.

Compuesto Ent-1 (VIII): 250 mg (rendimiento: 50%);  $t_R$  (HPLC quiral) = 14,8 min; ES-EM  $[\text{M}+1]^+$ : 371,0;  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  12,5 (s.a., 1H), 8,47 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (dd,  $J$  = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 7,53 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H), 7,31 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 7,08 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H), 5,25 (d,  $J$  = 4,0 Hz, 1H), 4,74-4,76 (m, 1H), 4,43 (dd,  $J$  = 6,8, 6,4 Hz, 2H), 3,18 (t,  $J$  = 6,4 Hz, 2H), 1,34 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H).

Compuesto Ent-2 (VIII): 237 mg (rendimiento: 47%);  $t_R$  (HPLC quiral) = 16,7 min; ES-EM  $[\text{M}+1]^+$ : 371,0;  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  12,5 (s.a., 1H), 8,47 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,67 (dd,  $J$  = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 7,53 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 2H), 7,31 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 7,08 (d,  $J$  = 9,2 Hz, 2H), 5,23 (d,  $J$  = 3,6 Hz, 1H), 4,75 (m, 1H), 4,43 (dd,  $J$  = 6,8, 6,4 Hz, 2H), 3,18 (dd,  $J$  = 6,8, 6,4 Hz, 2H), 1,34 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H).

## Síntesis de mezclas diastereoméricas de M-IV

## Síntesis de D-1 MIV

Etapa 3: Se añadió lentamente una disolución de NaBH<sub>4</sub> (77 mg, 2,02 mmol) en NaOH 0,1 N (2 ml) a una disolución con agitación del compuesto Ent-1 (VIII) (250 mg, 0,675 mmol), dimetilglioxima (32 mg, 0,27 mmol) y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (16 mg, 0,067 mmol) en una mezcla de agua (10 ml), THF (10 ml) y disolución de NaOH 1 M (0,5 ml) a 10°C, y se agitó la mezcla de reacción a t.a. durante 1 h. Tras desvanecerse el color del medio de reacción, se añadió una cantidad adicional de NaBH<sub>4</sub> (26 mg, 0,675 mmol) y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (16 mg, 0,067 mmol) y se continuó agitando a t.a. [se añadieron cantidades adicionales de CoCl<sub>2</sub> y NaBH<sub>4</sub> a intervalos de 12 h hasta que se consumió el material de partida, tal como se monitorizó mediante CLEM]. Tras 90-96 h, se neutralizó la mezcla de reacción con AcOH (pH~7); se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo en EtOAc (3 x 50 ml). Se secó el extracto orgánico combinado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró para proporcionar el compuesto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>; metanol al 4% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar una mezcla diastereomérica de MIV D-1 (125 mg) como un sólido de color blanquecino.

## Síntesis de D-2 MIV

Etapa 3: Se añadió lentamente una disolución de NaBH<sub>4</sub> (72 mg, 1,921 mmol) en NaOH 0,1 N (2 ml) a una disolución con agitación de compuesto Ent-2 (VIII) (237 mg, 0,64 mmol), dimetilglioxima (30 mg, 0,256 mmol) y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (15 mg, 0,064 mmol) en una mezcla de agua (10 ml), THF (10 ml) y disolución de NaOH 1 M (0,5 ml) a 10°C, y se agitó la mezcla de reacción a t.a. durante 1 h. Tras desvanecerse el color del medio de reacción, se añadió una cantidad adicional de NaBH<sub>4</sub> (24 mg, 0,64 mmol) y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (15 mg, 0,064 mmol) y se continuó agitando a t.a. [se añadieron cantidades adicionales de CoCl<sub>2</sub> y NaBH<sub>4</sub> a intervalos de 12 h hasta que se consumió el material de partida, tal como se monitorizó mediante CLEM]. Tras 96 h, se neutralizó la mezcla de reacción con AcOH (pH~7); se diluyó con agua (10 ml) y se extrajo en EtOAc (3 x 50 ml). Se secó el extracto orgánico combinado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró para proporcionar el compuesto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>; metanol al 4% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar una mezcla diastereomérica de MIV D-2 (125 mg) como un sólido de color blanquecino.

MIV D-1: Rendimiento: 125 mg (50%); t<sub>R</sub> (HPLC quiral) = 17,8, 14,7 min; ES-EM [M+1]<sup>+</sup>: 373,0; <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12,00 (s.a., NH), 8,46 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,67 (dd, J = 8,0, 2,4 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,86 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,27 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 4,88-4,85 (m, 1H), 4,76-4,74 (m, 1H), 4,30 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,30 (m, 1H), 3,14 (dd, J = 6,8, 6,4 Hz, 2H), 3,08-3,02 (m, 1H), 1,34 (d, J = 6,4 Hz, 3H).

MIV D-2: Rendimiento: 100 mg (42%); t<sub>R</sub> (HPLC quiral) = 19,4, 16,5 min; ES-EM [M+1]<sup>+</sup>: 373,0; <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12,01 (s.a., -NH), (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,67 (dd, J = 8,0, 2,0 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,86 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,27 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 4,88-4,85 (m, 1H), 4,76-4,74 (m, 1H), 4,30 (dd, J = 6,8, 6,4 Hz, 2H), 3,30 (m, 1H), 3,14 (dd, J = 6,8, 6,4 Hz, 2H), 3,08-3,02 (m, 1H), 1,34 (d, J = 6,8 Hz, 3H).

Las mezclas diastereoméricas D-1 y D-2 de MIV corresponden a las mezclas (c) y (d) descritas anteriormente, pero los diastereómeros específicos presentes en cada mezcla diastereomérica no se han asignado.

Ejemplo 7: ADME in vitro y caracterización toxicológica

Protocolo: Los ensayos realizados incluyen la inhibición del citocromo P450 con las diferentes isoformas, estabilidad microsomal y de hepatocitos, neurotoxicidad en células neuronales y ensayos de seguridad de hERG utilizando una medición de electrofisiología de pinzamiento de voltaje (FDA Draft Guidance for Industry. Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labelling Recommendations 2012, the European Medicines Agency (EMA) Guideline on the Investigation of Drug Interactions Adopted in 2012, Schroeder K *et al* 2003 J Biomol Screen 8 (1), 50-64, Barter ZE *et al*. 2007 Curr Drug Metab 8 (1), 33-45, LeCluyse EL y Alexandre e 2010 Methods Mol Biol 640, 57-82). Los resultados indican un perfil de ADME seguro y favorable para los compuestos de la invención.

Ejemplo 8: Las razones plasmáticas cerebrales de pioglitazona, MIV, MIII y MII tras la dosificación oral de una única administración de pioglitazona a 4,5 mg/kg en ratones C57BL/6 macho.

Se calculó la razón plasma-cerebro basándose en los niveles de pioglitazona, MIV, MIII y MII en plasma y cerebro cuantificados a C<sub>max</sub> (concentración máxima) tras la dosificación oral de una única administración de pioglitazona a 4,5 mg/kg en ratones C57BL/6 macho.

La razón plasma-cerebro en porcentaje fue del 9, el 13, el 7 y el 1%, respectivamente, para pioglitazona, MIV, MII y MIII tal como se muestra en la figura 4. Por tanto, los metabolitos activos MIII y MII cruzaron las BHE en mucho menor grado que la pioglitazona tal como se predijo basándose en las propiedades fisicoquímicas de los compuestos (véase la tabla 1). En cambio, inesperadamente el metabolito MIV cruzó la BHE en un porcentaje mayor que el compuesto original pioglitazona

Los cálculos de ambos índices (ClogP y QPlogBB) para pioglitazona y sus metabolitos MII y MIII se muestran en la tabla 1. Para ambos índices, los 2 metabolitos son menores que para pioglitazona, lo que sugiere para MII y MIII una penetración y distribución menos favorecida dentro del SNC.

Tabla 1

Estructura	Nombre	QPlogBB	CLogP	HBD	HBA
	Pioglitazona	-1,22	3,53	1	4
	MIV	-1,72	1,78	2	5
	MIII	-1,66	2,34	1	5
	MII	-1,72	2,13	2	5

**Ejemplo 9:** Las razones plasma-cerebro de pioglitazona y MIV y tras la dosificación oral de una única administración de o bien pioglitazona o bien M-IV ambos a 4,5 mg/kg en ratones C57BL/6 macho.

- 5 Con el fin de confirmar los hallazgos mostrados en el último ejemplo, se realizaron experimentos adicionales. Se calculó la razón plasma-cerebro basándose en las curvas farmacocinéticas de los perfiles de concentración en plasma y cerebro-tiempo como área bajo las curvas de pioglitazona y tras la dosificación oral de una única administración de o bien pioglitazona o bien MIV ambos a 4,5 mg/kg en ratones C57BL/6 macho.

- 10 La razón plasma-cerebro en porcentaje fue del 8% y el 12% para pioglitazona y M4 respectivamente tal como se muestra en la figura 5. Este 50% de aumento en la razón plasma-cerebro para el metabolito hidroxilado M-IV en comparación con la observada con pioglitazona en la misma condición era totalmente inesperado basándose en los cálculos predictivos de las propiedades fisicoquímicas (véase la tabla 1).

M-IV muestra un comportamiento contrario al esperado. Como MII, MIV es un metabolito monohidroxilado, pero en lugar de disminuir alrededor del 50% su penetración en la BHE, la penetración en la BHE es el 50% superior.

- 15 Los cálculos de ambos índices (ClogP y QPlogBB) para pioglitazona y M-IV se muestran en la tabla 1. Para ambos índices, MIV muestra un valor menor que pioglitazona, lo que sugiere para M-IV una penetración y distribución menos favorecidas dentro del SNC, al contrario de lo que se ha observado de manera sorprendente experimentalmente.

- 20 **Ejemplo 10:** Caracterización de la epimerización *in vivo* de las dos mezclas diastereoméricas de MIV, D-1 y D-2 en ratones.

- 25 Protocolo: Se determinaron los parámetros farmacocinéticos de las mezclas diastereoméricas D-1 y D-2 de 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiiazolidin-2,4-diona tras la administración de una única dosis por sonda oral (4,5 mg/kg) a ratones albinos Swiss macho. Se usaron un total de 51 ratones en este estudio con diseño de toma de muestras en paralelo (n=3/punto de tiempo). Se recogieron muestras de sangre antes de la dosificación y a diferentes momentos tras la dosificación para obtener ambos parámetros farmacocinéticos.

- 30 Se extrajeron las mezclas diastereoméricas D-1 y D-2 de 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiiazolidin-2,4-diona de muestras de plasma de ratón albino Swiss usando un método de extracción líquido-líquido (LLE) y se cuantificaron usando cromatografía de líquidos-espectroscopía de masas en tándem (LC-MS/MS) con ionización por electrospray (ESI) y monitorización de reacción múltiple (MRM). Se sometieron muestras de cerebro y plasma seleccionadas al análisis quiral usando una columna Chiral AGP para identificar la interconversión quiral. Se empleó un método bioanalítico aquiral para cuantificar el M-IV total presente en las muestras de plasma y cerebro.

- 35 Se diluyeron adecuadamente muestras de formulación con metanol al 70% y se comparó la respuesta instrumental frente a un patrón de mezcla diastereomérica correspondiente conocido usando el método aquiral de LC-MS/MS. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) en plasma para la mezcla diastereomérica D-1 y D-2 de 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)tiiazolidin-2,4-diona (1) es de 0,99 ng/ml. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos usando la herramienta de análisis no compartimental de Phoenix WinNonlin.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 6. Los datos demuestran claramente que la

diferencia en el % de conversión entre mezclas diastereoméricas es alta en ratones. *In vivo*, tanto D-1 como D-2 se interconvierten, aunque la conversión en D-2 a partir de D-1 está mucho más acentuada que la conversión de D-1 en D-2.

**Ejemplo 11:** Caracterización de neuronas corticales lesionadas con glutamato como modelo de enfermedad de Alzheimer.

Las neuronas corticales primarias lesionadas por glutamato (excitotoxicidad) son un modelo *in vitro* bien establecido para trastornos neurodegenerativos (J Neurosci; 1 de abril de 1999; 19(7):2455-63; J Neurosci Res. Mayo de 2013; 91(5):706-16) tal como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington (Brain Res Bull abril de 2013; 93:27-31), pero también otras patologías tales como esclerosis múltiple (Scand J Immunol 2014; 79(3):181-186).

Protocolo: Se cultivaron neuronas corticales de rata tal como describió Singer (J Neurosci. 1 de abril de 1999; 19(7):2455-63) y Callizot (J Neurosci Res. Mayo de 2013; 91 (5):706-16).

Se recogieron fetos y se colocaron inmediatamente en medio Leibovitz enfriado con hielo. Se trató la corteza con una disolución de tripsina-EDTA y se detuvo la disociación mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Pan Biotech), que contenía ADNasa I y suero de ternero fetal al 10% (FCS). Se disociaron las células mecánicamente y se centrifugaron. Se resuspendió el sedimento en un medio de cultivo definido con 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se sembraron las células en placas de 96 pocillos con poli-L-lisina y se cultivaron a 37°C. Se cambió el medio cada 2 días. Se intoxicaron las neuronas corticales con glutamato tras 13 días de cultivo.

En resumen, el día 13 de cultivo, se preincubaron BDNF y compuesto de prueba con neuronas corticales primarias durante 1 hora antes de la exposición a glutamato. Se añadió glutamato hasta una concentración final de 40  $\mu$ M diluido en medio de control en presencia de BDNF o compuesto de prueba durante 20 min.

Tras 20 min, se eliminó por lavado el glutamato y se añadió medio de cultivo nuevo con BDNF o compuesto de prueba durante 48 horas adicionales. Se realizó la evaluación de supervivencia mediante un ensayo de MTT realizado con el ensayo de proliferación celular en disolución CellTiter 96® Aqueous One (Promega).

Los resultados se muestran en la figura 7. Muestran que, en una lesión con glutamato, MIV (compuesto (1)) muestra un efecto protector (alcanzando la significación para los 3  $\mu$ M). De manera interesante, se observó una curva con forma de campana adecuada para MIV. A 3  $\mu$ M, hay un efecto protector completo como el observado con el compuesto de referencia (BDNF 50 ng/ml). Todos los valores se expresan como media  $\pm$  EE. Se realizó análisis estadístico mediante ANOVA de una vía, seguido por prueba de Dunnett o de PLSD Fisher,  $p < 0,05$  se considera significativo.

**Ejemplo 12:** Caracterización de la inhibición de MAO B (monoaminaoxidasas) como posible fármaco para tratar la enfermedad de Parkinson.

Los inhibidores selectivos de MAO-B aumentan los niveles de dopamina en el SNC afectado en la enfermedad de Parkinson sin aumentar los niveles de los otros neurotransmisores (epinefrina, norepinefrina o serotonina), en contraposición a inhibidores de MAO no selectivos (MAO-A y MAO B). Los inhibidores de MAO-B pueden usarse también para tratar depresiones.

Protocolo: Se adquirieron proteínas de monoaminaoxidasasa recombinantes humanas MAO-A y MAO-B de Sigma Aldrich (referencia M7316 y M7441 respectivamente). Con el fin de monitorizar las actividades enzimáticas de MAO y su velocidad de inhibición, se usó un ensayo basado en fluorescencia. El sustrato para el ensayo, kinuramina, no es fluorescente hasta la desaminación oxidativa mediante MAO, que da como resultado el producto fluorescente 4-hidroxiquinolina. La kinuramina es un sustrato para tanto MAO-A como B (sustrato no específico). Se usaron clorgilina y deprenilo (Sigma Aldrich) como controles para la inhibición específica de MAO-A y MAO-B respectivamente.

Los resultados muestran que 5-(4-(2-(5-(1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona inhibe MAO B con una  $Cl_{50}$  de 70,5 nM. En cambio, este compuesto no inhibió la proteína MAO A.

**Ejemplo 13:** Caracterización de la eficacia *in vivo* en una encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) de modelo animal como modelo de enfermedades neuroinflamatorias.

La neuroinflamación puede iniciarse en respuesta a una variedad de infección, lesión cerebral traumática, tóxicos o autoinmunidad en el SNC.

Los modelos de neuroinflamación se caracterizan por proliferación de astrocitos y microglia, junto con la pérdida neuronal, es una característica prominente de muchas enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, lesión cerebral traumática, infección y ALD (Human Molecular Genetics, 2004, vol. 13, n.º 23 2997-3006).

La inflamación crónica es la activación sostenida de células gliales y el reclutamiento de otras células inmunitarias en el cerebro. Es una inflamación crónica que está asociada normalmente con enfermedades neurodegenerativas.

El modelo de EAE es un modelo neuroinflamatorio, usado clásicamente para esclerosis múltiple, que se asemeja e incluye la mayoría de las características de las formas cerebrales graves de ALD, activación microglial, desmielinización cerebral y degeneración axónica también. Aunque la etiología de la enfermedad es diferente de ALD y la EAE (un modelo de esclerosis múltiple desencadenada por linfocitos CD4+ autorreactivos), el modelo de EAE es una herramienta valiosa para estudiar terapias para tanto ALD como esclerosis múltiple (Nature 2007; 7:904-912).

Protocolo: El desarrollo de síntomas clínicos en esclerosis múltiple y su encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) de modelo animal implica la activación y migración de células T al sistema nervioso central, la producción de moléculas inflamatorias derivadas de la glía y desmielinización y daño axónico. Se indujo de manera activa EAE crónica, monofásica tal como se describió con péptido de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina sintético más del 98% puro 35-55 (MOG35-55, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, SEQ ID NO: 1). Se les inyectó a ratones C57BL/6 hembra (6-8 semanas de edad) (dos inyecciones subcutáneas de 100 µl en una extremidad trasera) 250 µg de MOG35-55 emulsionado en 100 µl de disolución tamponada con fosfato mezclada con 100 µl de adyuvante completo de Freund que contenía 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Detroit, MI). Los ratones recibieron una inyección de toxina pertussis (400 ng en 200 µl de una disolución tamponada con fosfato, por vía intraperitoneal), una segunda inyección de toxina pertussis 2 días después y una inyección de refuerzo de MOG35-55 a los 7 días. Se registraron los signos clínicos tal como sigue: 0, sin signos; 1,0, cola lacia/pérdida del enderezamiento; 2,0, ataxia con cola lacia; 3,0, parálisis de una sola extremidad trasera; 4,0, parálisis de ambas extremidades traseras; 4,5, moribundo; y 5,0, muerto. Para ambos modelos, se anotaron puntuaciones de 5 y se contaron el día de la muerte sólo.

Se administró el compuesto dos veces al día (bid) comenzando el día 5 tras la inmunización durante 15 días a tres dosis crecientes diferentes.

Los resultados mostraron que MIV (compuesto (1)) reduce el desarrollo y la gravedad del modelo de encefalomielitis autoinmunitaria experimental. En la figura 9 se muestran puntuaciones clínicas diarias promedio del experimento. Los síntomas clínicos disminuyen de una manera dependiente de la dosis, las dosis más altas muestran el efecto máximo. MIV redujo los síntomas clínicos, lo que sugiere un papel de la activación de PPARgamma en los efectos protectores. No estaban asociados pérdida de peso ni toxicidad hematológica significativa a las dosis más altas con el tratamiento.

La neuroinflamación es un rasgo distintivo de tanto la esclerosis múltiple como la ALD, por tanto MIV puede ser eficaz sobre ambas enfermedades. De hecho, una disminución de la activación de la microglía proporciona una base molecular para explicar por qué HSCT alogénicos y autólogos son eficaces en la detención de la inflamación cerebral, concretamente por el reemplazo y la restauración metabólica funcional del linaje monocítico y conectan los fenotipos de cALD y AMN con una ruta patógena comparativa (Human Molecular Genetics, 2012, vol. 21, n.º 5 1062-1077). Por tanto, estos modelos pueden tener un gran potencial y relevancia para estudiar el papel de agonistas de PPAR gamma en ALD.

Ejemplo 14: Caracterización en fibroblastos de pacientes de ALD-X como modelo de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X.

Se obtuvieron fibroblastos de control y con adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X humanos de Coriell (Candem, EE.UU.). Se hicieron crecer las células en medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 U/ml y 100 mg de estreptomycin, a 37°C en el 95% de aire humidificado/el 5% de CO<sub>2</sub>, hasta el 80-90% de confluencia. Para realizar los experimentos, se usó medio de Eagle modificado por Dulbecco sin D-glucosa, piruvato o L-glutamina. Se cultivaron las células en este medio complementado con 1 g/l de glucosa o 1 g/l de galactosa y suero bovino fetal al 10% durante 24 horas incubado con dosis crecientes de MIV (3, 10 y 30 µM).

Se realizó la determinación de MTT tal como describieron Mosmann J. Immunol. Methods 1983, 65,55-63 y Hansen J. Immunol. Methods 1989; 119,203-210. Este método se basa en la capacidad de las células viables pero no las muertas para convertir la sal de tetrazolio (MTT) en formazán coloreado.

Para la determinación de los niveles de ATP, se sembraron 2x10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos en medio completo. Tras 16-18 h, se lisaron las células, en 20 µl de tampón de lisis y se usaron 10 µl de lisado para medir los niveles de ATP usando un kit de determinación de ATP (Molecular Probes, Invitrogen). Se usó 1 µl de cada uno de los lisados restantes para la medición de proteína.

Los resultados muestran un efecto protector de MIV (compuesto (1)) sobre fibroblastos con ALD basándose en un aumento en la supervivencia celular (el 20% a 3, µM, frente a sin tratar).

Ejemplo 15: Caracterización de neuronas motoras de la médula espinal como modelo de enfermedades de neuronas

motoras (ELA)

Las neuronas motoras de la médula espinal lesionadas mediante glutamato son un modelo experimental *in vitro* adecuado para estudiar ELA y otras enfermedades de neuronas motoras (MND) tales como parálisis bulbar progresiva, parálisis pseudobulbar, esclerosis lateral primaria (ELP), atrofia muscular progresiva, atrofia muscular espinal (AME), síndrome pospoliomielítico (SPP) y otras enfermedades raras tales como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, síndrome de Guillain-Barre o AMN (Neuron. Abril de 1992; 8(4):737-44).

Protocolo: Se cultivaron neuronas motoras de médula espinal (SC) de rata tal como describieron Martinou (Neuron. Abril de 1992; 8(4):737-44) y Wang (PLoS Genet. 2013; 9(9)). En resumen, se sacrificaron ratas hembra preñadas de 14 días de gestación mediante dislocación cervical y se recogieron los fetos y se colocaron inmediatamente en medio de Leibovitz L15 enfriado con hielo. Se trató la médula espinal durante 20 min a 37°C con tripsina-EDTA. Se detuvo la disociación mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Pan Biotech), que contenía ADNasa I y suero de ternero fetal al 10% (FCS). Se disociaron las células mecánicamente y entonces se centrifugaron. Se resuspendió el sedimento en un medio de cultivo definido con 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se sembraron las células en placas de 96 pocillos prerrecubiertas con poli-L-lisina y se cultivaron a 37°C. Se cambió el medio cada 2 días.

En resumen, el día 13 de cultivo, se preincubó BDNF o compuesto de prueba con neuronas motoras primarias de la médula espinal (SC) durante 1 hora antes de la exposición a glutamato. Se añadió glutamato hasta una concentración final de 10  $\mu$ M diluido en medio de control en presencia de BDNF o compuesto de prueba durante 20 min. Tras 20 min, se eliminó por lavado el glutamato y se añadió medio de cultivo nuevo con BDNF o compuesto de prueba durante 48 horas adicionales.

Se realizó la evaluación de supervivencia mediante inmunotinción. 48 tras la intoxicación, se eliminó el sobrenadante de cultivo celular y se fijaron las neuronas motoras de la SC mediante una disolución fría de etanol (95%) y ácido acético (5%) durante 5 min y se permeabilizaron. Se incubaron las células durante 2 horas con un anticuerpo monoclonal anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP-2) que tiñe específicamente cuerpos celulares de neuronas (MAP-2) permitiendo el estudio de evaluación de la supervivencia neuronal en el cultivo. Este anticuerpo se reveló con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488).

Para cada condición se evaluaron 6 pocillos, se tomaron 30 fotografías usando ImageXpress (Molecular Device) con 20x aumentos. Se tomaron todas las imágenes con las mismas condiciones. Se realizó automáticamente el análisis del número total de neuronas usando el editor de módulos Custom (Molecular Device).

Se preincubaron compuestos de prueba durante 1 hora antes de la aplicación de glutamato.

Los resultados (figura 10) mostraron que MIV (compuesto (1), 1  $\mu$ M) en una lesión con glutamato tiene un efecto protector en neuromas motoras (MN) de la SC, demostró un aumento estadísticamente diferente ( $p < 0,05$ , prueba de la t de Student) en la supervivencia celular frente al control con glutamato (Glut).

#### Lista de secuencias

<110> MINORYX THERAPEUTICS S.L.

<120> Derivados de 2,4-tiazolidindiona en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central

<130> P10708EPPC01

<150> EP14382130.4

<151> 2014-04-02

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina 35-55

<400> 1

# ES 2 872 335 T3

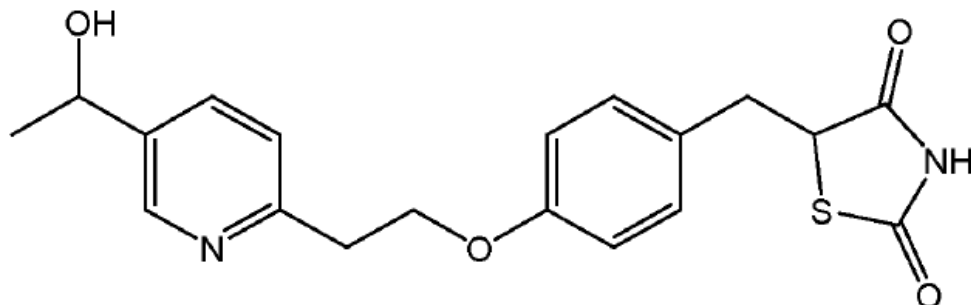
Met	Glu	Val	Gly	Trp	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Ser	Arg	Val	Val	His	Leu
1				5					10					15	

Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys
			20	



## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (1) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno del sistema nervioso central



(1),

- 5 en el que el trastorno del sistema nervioso central se selecciona del grupo que consiste en ataxia de Friedrich, una lesión cerebral, una enfermedad metabólica rara, isquemia global o local, hemorragia intracerebral, accidente cerebrovascular, demencia vascular, meningitis causada por una infección viral en el sistema nervioso, encefalitis causada por infección viral en el sistema nervioso central y metástasis de un tumor cerebral primario.
- 10 2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, seleccionado de los compuestos (2) a (5):
- (2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona;
- (3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona;
- (4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona; y
- (5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona;
- 15 o una de sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que no más del 0,015% del número total de átomos de hidrógeno por mol de compuesto están en forma del isótopo  $^2\text{H}$ .
4. Mezcla de dos o más de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en los compuestos (2) a (5):
- (2) (R)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona;
- 20 (3) (R)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona;
- (4) (S)-5-(4-(2-(5-((R)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona; y
- (5) (S)-5-(4-(2-(5-((S)-1-hidroxietil)piridin-2-il)etoxi)bencil)thiazolidin-2,4-diona;
- o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,
- 25 para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno del sistema nervioso central, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en ataxia de Friedrich, una lesión cerebral, una enfermedad metabólica rara, isquemia global o local, hemorragia intracerebral, accidente cerebrovascular, demencia vascular, meningitis causada por una infección viral en el sistema nervioso, encefalitis causada por infección viral en el sistema nervioso central y metástasis de un tumor cerebral primario.
5. Mezcla para su uso según la reivindicación 4, seleccionada del grupo que consiste en:
- 30 (a) mezclas que comprenden los compuestos (2) y (3);
- (b) mezclas que comprenden compuestos (4) y (5);
- (c) mezclas que comprenden compuestos (2) y (4); y
- (d) mezclas que comprenden compuestos (3) y (5).

6. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el trastorno es ataxia de Friedrich.
7. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el trastorno del sistema nervioso central es una enfermedad metabólica rara.
- 5 8. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se administra también otro agente terapéutico.
9. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según la reivindicación 8, en el que el compuesto o la mezcla de compuestos y dicho otro agente terapéutico se proporcionan en combinación.
- 10 10. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto o la mezcla de compuestos se proporcionan en una composición farmacéutica, tal como una forma oral de la composición farmacéutica.
11. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según la reivindicación 10, en el que la forma oral es una disolución oral o una suspensión oral; o la forma oral se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, pastillas y gránulos.
- 15 12. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el compuesto o la mezcla de compuestos en la composición farmacéutica están a una dosificación de desde 0,1 mg hasta 200 mg o desde 10 mg hasta 100 mg.
- 20 13. Compuesto o mezcla de compuestos para su uso según la reivindicación 9, en el que la composición farmacéutica es adecuada para administración tópica, epicutánea, subcutánea, transdérmica, intramuscular, parenteral, ocular, rectal, vaginal, inhalación, bucal, sublingual o intranasal, tal como una forma de dosificación sublingual.

FIG. 1

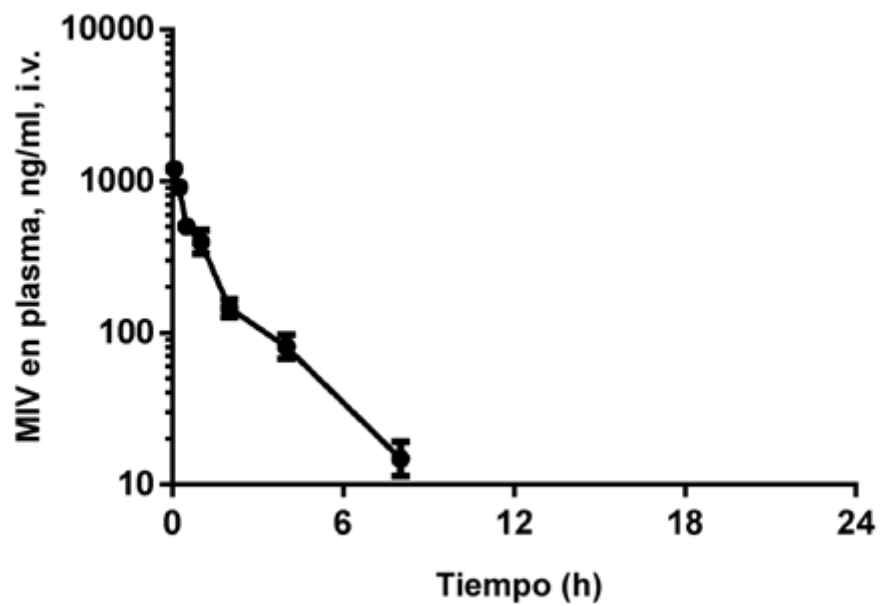


FIG. 2

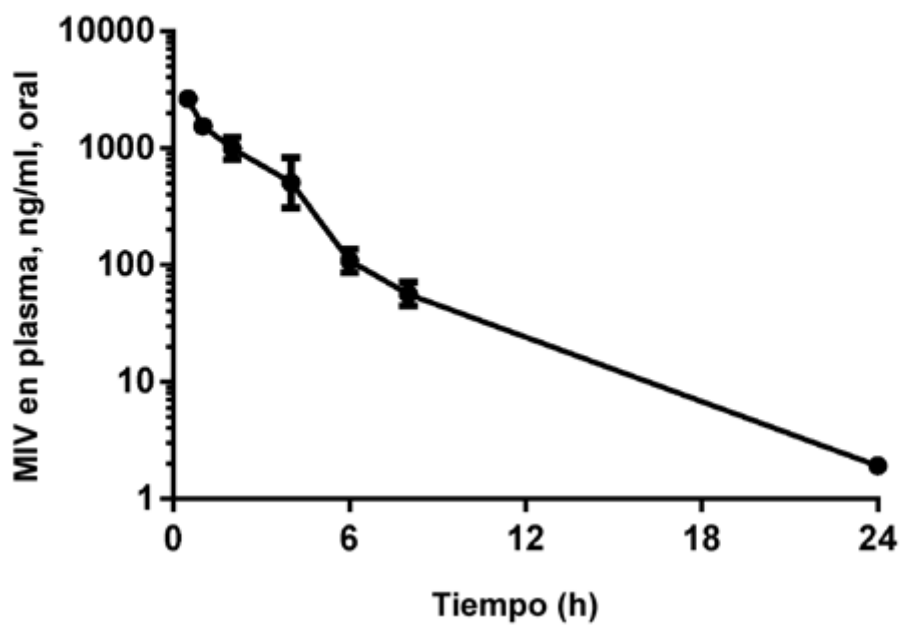


FIG 3

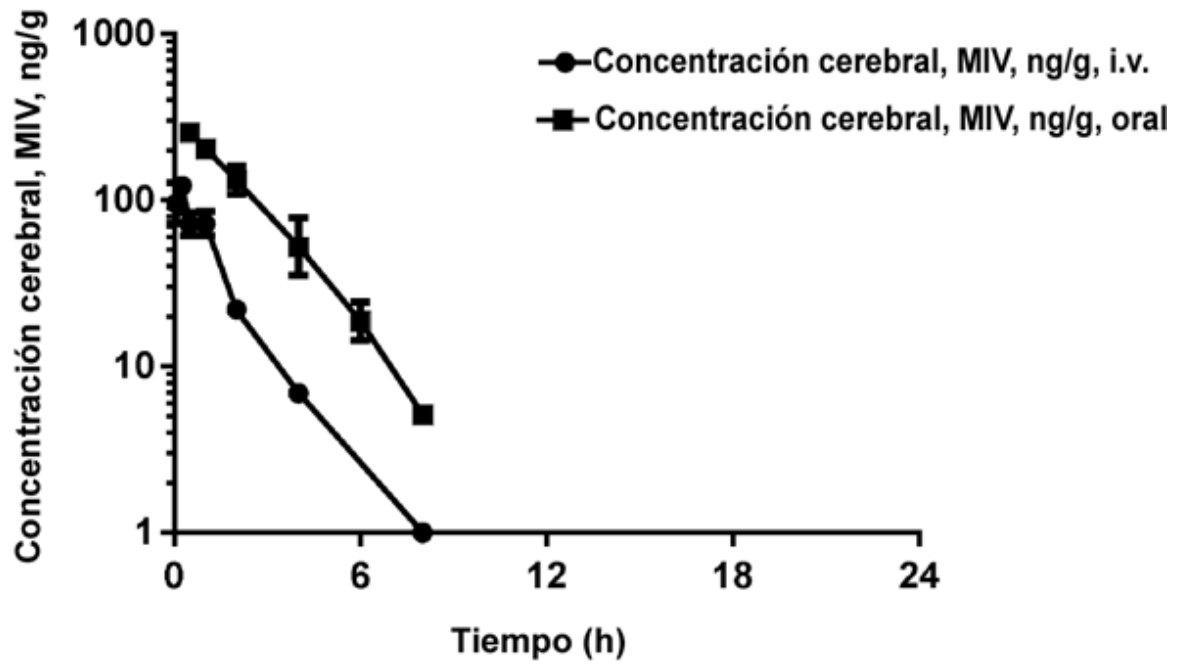


FIG 4

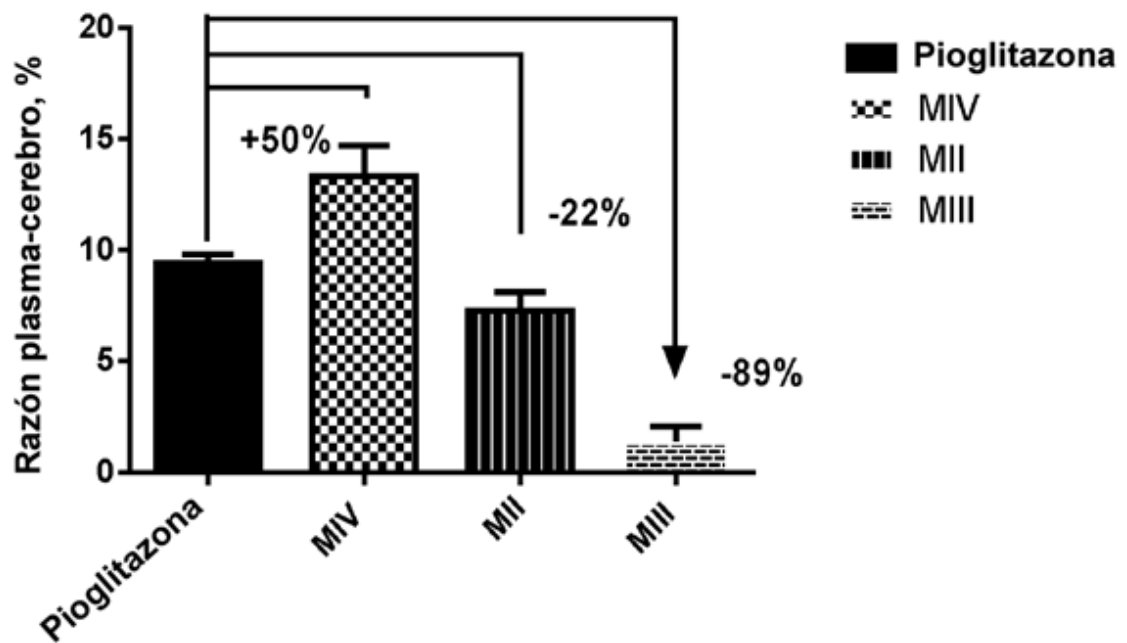


FIG 5

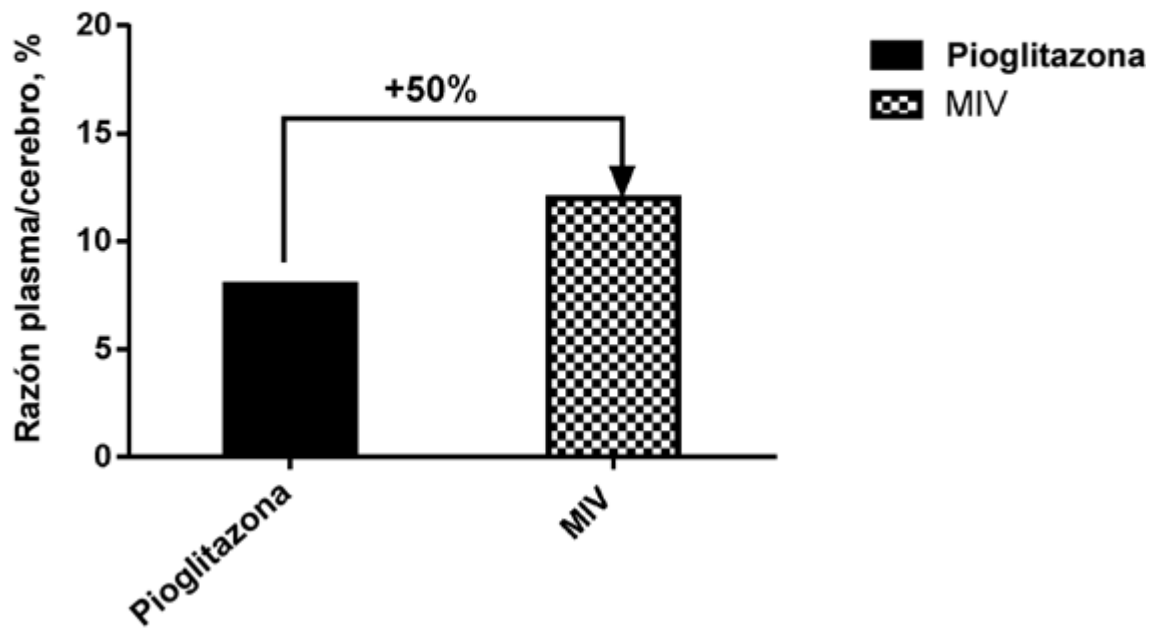


FIG 6

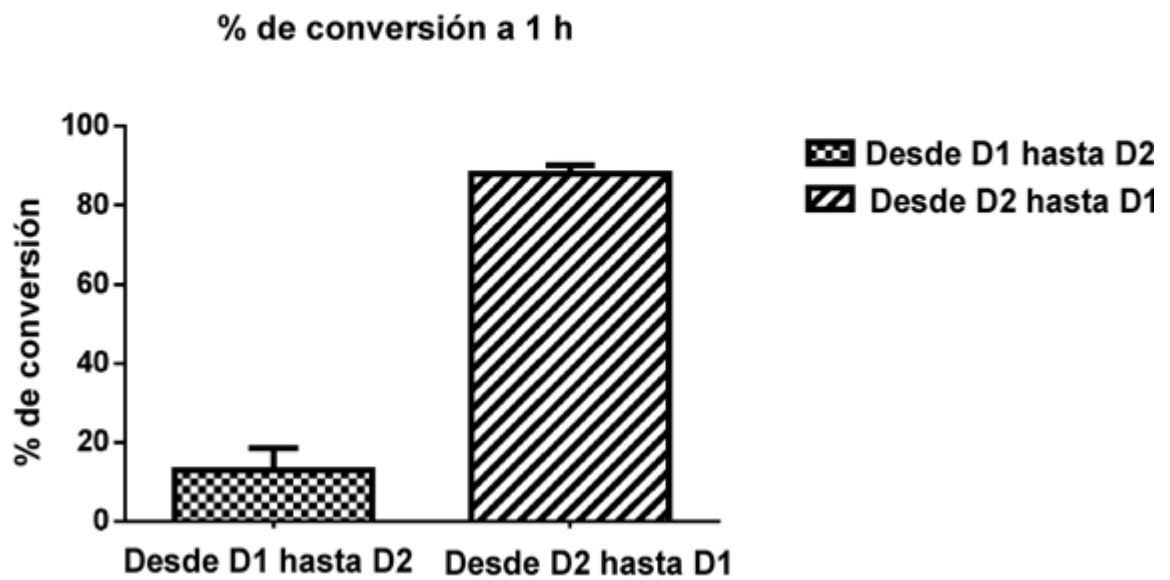
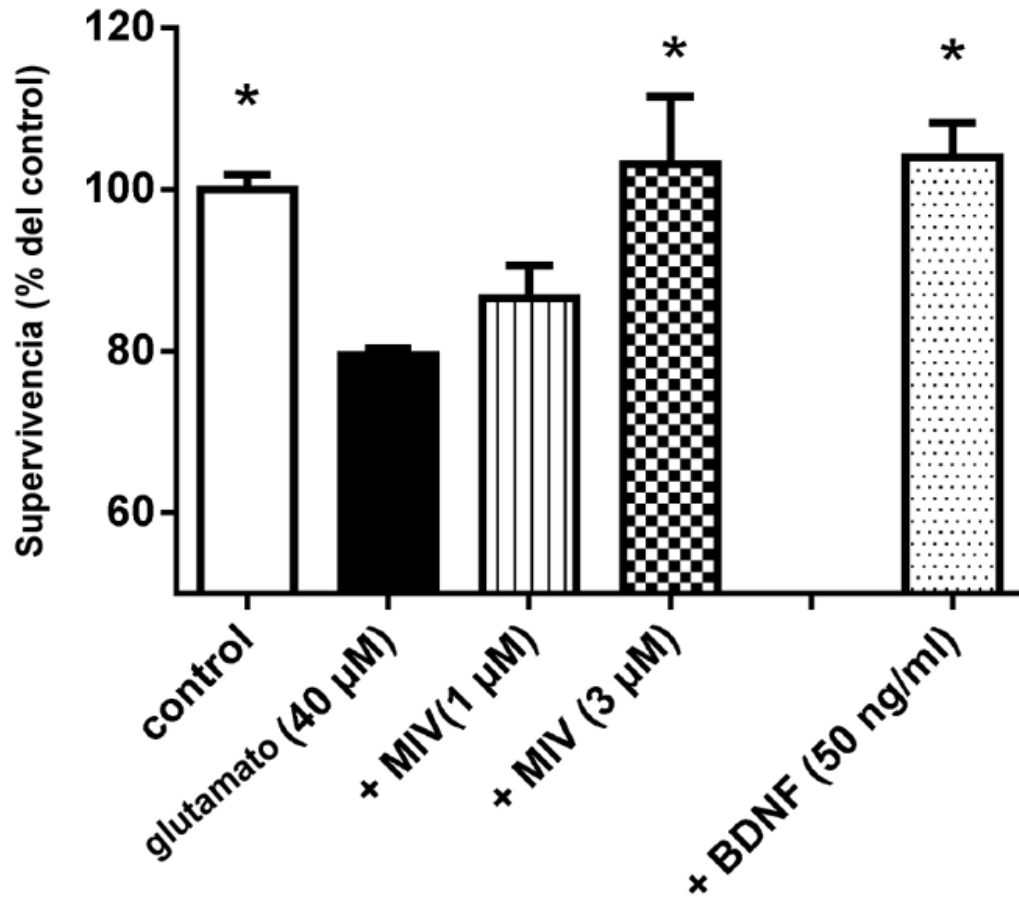
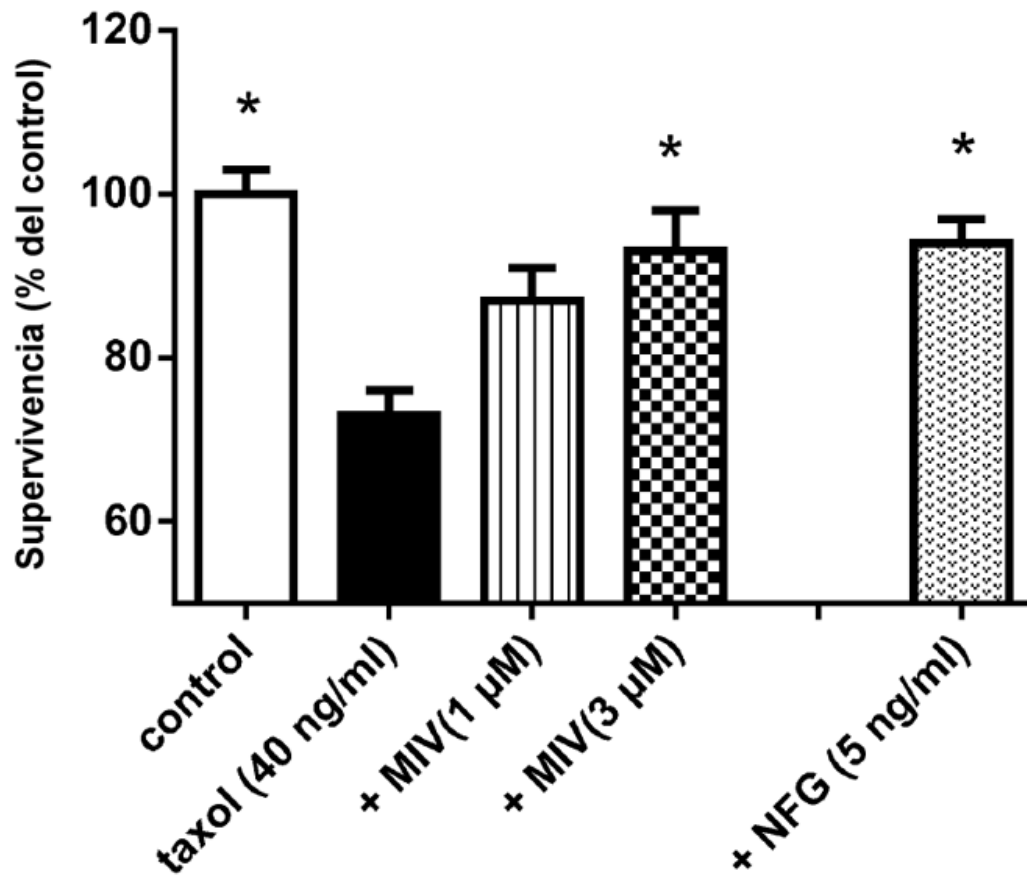


FIG 7



\*p<0,05 Anova de una vía seguido por prueba de Dunnett

FIG 8



\*p<0,05 Anova de una vía seguido por prueba de Dunnett

FIG 9

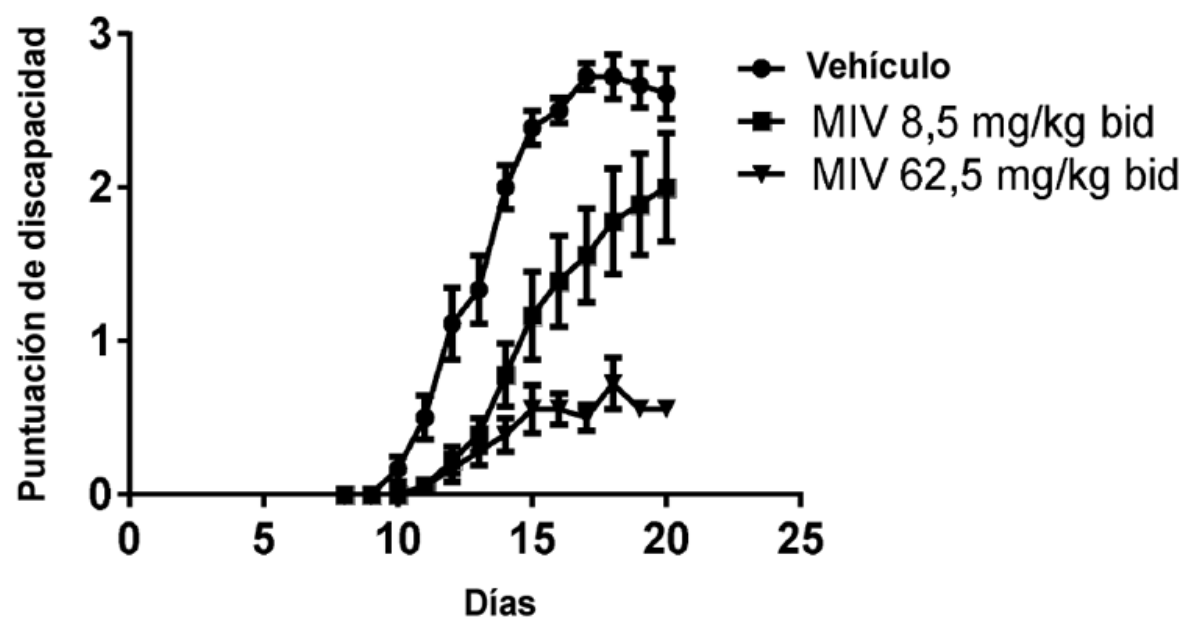
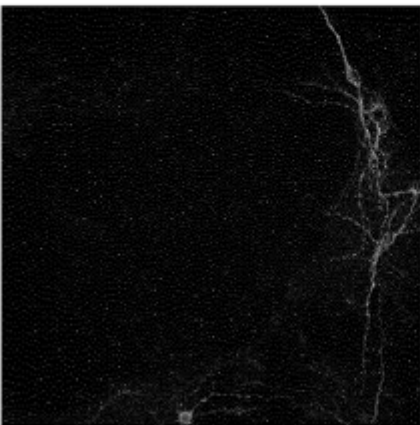
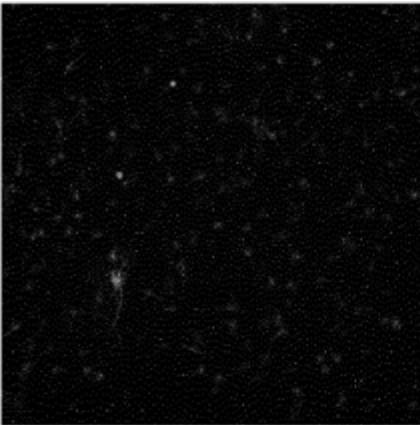
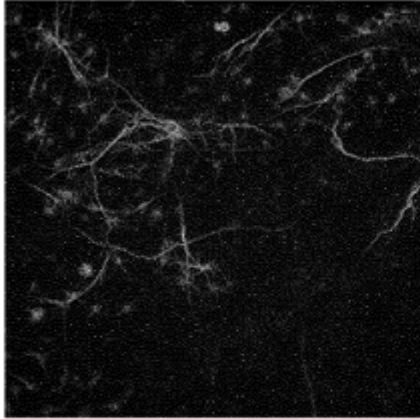




FIG 10



$\mu$