(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 440 217**

(51) Int. CI.:

A61K 31/436	(2006.01)	***A61K 31/517***	(2006.01)
A61K 31/435	(2006.01)	***A61K 31/519***	(2006.01)
A61K 31/4375	(2006.01)	***C07D 239/88***	(2006.01)
A61K 31/47	(2006.01)	***C07D 241/42***	(2006.01)
A61K 31/473	(2006.01)	***C07D 471/04***	(2006.01)
A61K 31/4745	(2006.01)	***C07C 233/54***	(2006.01)
A61K 31/495	(2006.01)	***A61P 25/16***	(2006.01)
A61K 31/498	(2006.01)	***A61P 25/28***	(2006.01)
A61K 31/50	(2006.01)		
A61K 31/5025	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2003 E 03798831 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1558585**

(54) Título: **Compuestos neurológicamente activos**

(30) Prioridad:

04.10.2002 AU 2002951868
04.10.2002 AU 2002951864
04.10.2002 AU 2002951865
04.10.2002 AU 2002951866

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.01.2014

(73) Titular/es:

PRANA BIOTECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
LEVEL 1 100 DORCAS STREET
SOUTH MELBOURNE VIC 3205, AU

(72) Inventor/es:

KOK, GAIK BENG;
LEUNG, BRENDA KWAN YI;
GAUTIER, ELISABETH COLETTE LOUISE y
BARNHAM, KEVIN JEFFREY

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Compuestos neurológicamente activos

La presente invención se refiere al uso de compuestos neurológicamente activos en la fabricación de productos farmacéuticos o veterinarios para el tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

Antecedentes de la invención

Se cree que la duración de la vida está biológicamente determinada para cada especie, y que la longitud de la vida humana es incierta, pero puede ser hasta 120 años. Puesto que la esperanza de vida ha aumentado significativamente en este siglo, los ancianos son un segmento creciente de nuestra población y sus necesidades de atención médica seguirán creciendo durante décadas.

Aunque el envejecimiento normal se caracteriza por modestas reducciones en la masa y el volumen del cerebro humano, que se puede deber a atrofia o muerte de células cerebrales, estos cambios son mucho más profundos en los cerebros de los pacientes que sucumben a una afección neurodegenerativa. La mayoría de estas afecciones son esporádicas (es decir, no se deben a mutaciones genéticas) y de causa desconocida, pero cientos de mutaciones diferentes en muchos genes han demostrado ser la causa de variantes familiares (hereditarias) de varias enfermedades neurodegenerativas. Muchas de las docenas o más de genes que albergan estas mutaciones fueron descubiertos en la búsqueda para determinar la base genética de afecciones neurodegenerativas sólo en los últimos diez años. Las afecciones neurodegenerativas evolucionan gradualmente después de un largo período de funcionamiento normal del cerebro, debido a la degeneración progresiva (es decir, la disfunción y la muerte de las células nerviosas) de regiones cerebrales específicas. Puesto que la expresión sintomática de la enfermedad ocurre cuando la pérdida de células nerviosas supera un "umbral" para la función continua (por ejemplo, memoria, movimiento) realizada por la región del cerebro afectada, el inicio real de la degeneración del cerebro puede preceder a la expresión clínica en muchos años.

Las facultades intelectuales y cognitivas superiores integradoras se deterioran progresivamente e interfieren con las actividades cotidianas en las afecciones neurológicas que derivan en demencia. La prevalencia exacta de la demencia en la población anciana se desconoce, pero puede ser el 15% de las personas mayores de 65 años con un 5% severamente y un 10% leve a moderadamente demente. La prevalencia de demencia grave aumenta de 1% a los 65 años a 45% a los 85 años. Existen muchas causas de demencia, pero la enfermedad de Alzheimer (EA) representa el 50% en los pacientes con demencia mayores de 65 años de edad.

La EA es una enfermedad degenerativa primaria del cerebro que se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas como memoria, pensamiento, comprensión, cálculo, lenguaje, capacidad de aprendizaje y juicio. Se diagnostica demencia cuando este deterioro es suficiente para afectar las actividades personales de la vida diaria. La EA presenta un inicio insidioso con un deterioro lento. Esta enfermedad debe ser claramente diferenciada del deterioro normal de las funciones cognitivas relacionado con la edad. El deterioro normal es mucho menor, mucho más gradual y deriva en discapacidades más leves. La aparición de la EA se produce generalmente después de los 65 años de edad, aunque no es infrecuente la aparición más temprana. A medida que la edad avanza, la incidencia aumenta rápidamente (se duplica aproximadamente cada 5 años). Esto tiene implicaciones obvias para el número total de personas que viven con este trastorno dado que la esperanza de vida aumenta en la población.

La etiología de la demencia en la EA no es clara. Existe considerable evidencia de una predisposición hereditaria para algunas formas de la EA (revisado en St George-Hyslop, 2000), y la expresión de ciertas isoformas de ApoE también se ha vinculado a un mayor riesgo de EA (Corder et al, 1993; Czech et al 1994). La acumulación tóxica de aluminio ha sido sugerida como un agente causante de la EA, aunque en la actualidad esta hipótesis ha sido reemplazada en gran medida. Los cerebros de pacientes con EA tienen depósitos anómalos que incluyen proteína β-amiloide (Aβ).

Aβ es conocida por estar presente en el cerebro de las personas con ciertas enfermedades neurodegenerativas, pero no se sabe si es un síntoma de un proceso subyacente de la enfermedad, o está realmente implicada en la etiología de la enfermedad. Por ejemplo, algunos autores creen que los depósitos de Aβ pueden ser indicativos de un mecanismo de defensa normal del cerebro, en el que el cerebro intenta secuestrar la Aβ; dichos depósitos pueden estar presentes en el cerebro de individuos normales. Existe una mutación de la proteína *tau* en la cual están presentes en el cerebro ovillos neurofibrilares, pero no placas de amiloide, esta afección se conoce como tauopatía.

Un enfoque propuesto para el tratamiento de la EA es inhibir la producción de Aβ en el cerebro. La escisión proteolítica de APP por BACE1 y γ-secretasa genera Aβ de tamaño normal, que luego se libera de las células

(Nunan y Small, 2000). Por lo tanto, los inhibidores de BACE1 o de γ-secretasa pueden tener valor terapéutico. Alternativamente, varios estudios han demostrado que el colesterol puede influir en la liberación de Aβ (Simons et al., 1998; Hartmann, 2001; Fassbender et al., 2001; Frears et al., 1999; Friedhoff et al., 2001). Sin embargo, hay ciertas discrepancias en el área respecto al valor de bajar los niveles de colesterol, y algunos trabajadores consideran que el colesterol es en realidad beneficioso. Por ejemplo, Ji et al., (2002) sugirieron que la unión de Aβ al colesterol podría evitar la toxicidad de Aβ al inhibir su oligomerización.

En un enfoque alternativo, se ha propuesto que desentrañando el procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP), que genera el monómero del amiloide Aβ, podrían ser posibles varias potenciales dianas terapéuticas (Shearman et al., 2000; Sinha et al., 1999), y este enfoque está en una etapa temprana de desarrollo clínico. El intento de promover la depuración de Aβ del cerebro a través de la vacunación con Aβ, si bien es eficaz en un modelo de EA en ratón transgénico (Schenk et al. 1999), se encontró que tiene efectos adversos significativos (Brower, 2002).

Asimismo se ha sugerido que el depósito de fibrillas tipo amiloide también puede ser importante en otras enfermedades neurodegenerativas. Éstas incluyen la enfermedad de Parkinson, la demencia con formación de cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica, la enfermedad de Hallerboden-Spatz y la enfermedad difusa por cuerpos de Lewy.

Una de las teorías competidoras acerca de la etiología de EA es que los pasos causantes se encuentran en la vía de la biogénesis intracerebral y la acumulación de la proteína amiloide Aβ (véanse revisiones recientes por Selkoe, 2001; Beyreuther et al., 2001; Bush, 2001). Sin embargo, hasta la fecha no hay drogas ni fármacos dirigidos a esta vía que hayan demostrado tener un efecto duradero en la modificación de la expresión clínica de la enfermedad o la prevención o el mejoramiento del deterioro de la función cognitiva asociado a trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer.

Otra hipótesis es que la EA es causada por la acumulación tóxica de amiloide Aβ, debida en parte al exceso de unión de cobre y zinc, iones metálicos que son abundantes en las regiones más afectadas. Además, se ha sugerido que cuando los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} interaccionan con Aβ, se produce la agregación de Aβ en fibrillas y placas (Atwood et al., 1998); confirmado por los datos recientes de animales que carecen de Zn^{2+} sináptico (Lee et al., 2002). También se ha sugerido que las interacciones redox activas Cu^{2+}-Aβ pueden generar H_2O_2 a partir de O_2 (Huang et al., 1999). Se ha demostrado que tanto el Cu^{2+} como el Zn^{2+} afectan las interacciones Aβ-membrana lipídica (Curtain et al., 2001).

El cerebro es un órgano que concentra iones metálicos y la evidencia reciente sugiere que una falla en la homeostasis de metales desempeña un papel fundamental en diversas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. Las características comunes de estas enfermedades incluyen el depósito de proteínas mal plegadas (cada enfermedad tiene su propia proteína amiloide especifica) y daño celular sustancial como resultado del estrés oxidativo. De hecho en la actualidad se están acumulando rápidamente datos que indican que esas reacciones metaloquímicas podrían emerger como el denominador común subyacente a los trastornos neurológicos amiloidógenos como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amilotrófica (ELA), las enfermedades priónicas - como la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob (ECJ), las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), las cataratas, los trastornos mitocondriales, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington. En esos casos, la agregación patológica de una proteína específica es promovida por actividad redox anómala en un entorno fisiológico tipificado por la presencia de metales de transición y reductores disponibles. [Bush, 2000 (Curr Opin Chem Biol. 2000 Apr; 4(2):184-91)].

Se da a conocer y reivindica un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer utilizando yodoclorohidroxiquinolina un antibiótico [también conocido como clioquinol (CQ)], en las patentes de Estados Unidos Nº 5,994,323 y 6,001,852 por P.N. Geromylatos S.A. y en la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 09/972,913 por Bush et al. CQ se retiró como antibiótico en 1970, debido a su asociación con un síndrome neurológico raro, la neuropatía mielo-óptica subaguda (NMOS), que se observó solamente en Japón en los años sesenta, en pacientes que habían recibido el fármaco durante largos periodos y probablemente a dosis superiores a las recomendadas en el momento (Shiraki, 1975). No obstante, la evidencia reciente sugiere que NMOS fue causada por una deficiencia de vitamina B12 relacionada con el uso excesivo en una población excepcionalmente vulnerable, y por lo tanto podría ser rehabilitado para un estudio en un escenario clínico (Yassin et al., 2000; Bush y Masters, 2001).

Sin embargo, no se proporcionan resultados *in vivo* en modelos animales ni en seres humanos en las patentes de Geromylatos y Bush. US 5,994,323 da a conocer una composición que contiene CQ y vitamina B12, y su uso para el tratamiento de "enfermedades o trastornos que responden a la administración de CQ mientras inhiben los efectos secundarios perjudiciales" del CQ. Estas enfermedades incluyen la EA. US 6,001,852 da a conocer un método de tratamiento de la EA utilizando CQ, preferentemente junto con vitamina B12. Tanto US 5,994,323 como US 6,001,852 sugieren una dosis de 10-750 mg por día; US 5,994,323 recomienda que si el tratamiento es por un período largo CQ se debe administrar intermitentemente, por un máximo de 3 semanas cada vez, seguido de un

período de "reposo farmacológico" de 1 a 4 semanas.

En la solicitud US Nº 09/972,913 se hace referencia a CQ exclusivamente en términos de su capacidad para desagregar los depósitos de Aβ. No se discute ningún otro mecanismo de neurotoxicidad. PCT/US99/05291 por General Hospital Corporation da a conocer el uso de CQ en combinación con quelantes de cobre y zinc específicos para promover la disolución de las placas amiloides y la inhibición de la formación de placas amiloides o la producción de ROS por Aβ.

US 6,001,852 también sugiere que se podría utilizar una composición que contenga CQ y vitamina B12 en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; sin embargo, en este contexto se sugiere que CQ actúa principalmente mediante depuración de hierro de la sustancia negra.

La eficacia de CQ en el tratamiento de la EA se basa en su capacidad para penetrar en el SNC y luego secuestrar los metales de transición, Cu, Zn y Fe de diversas entidades de Aβ reduciendo así la toxicidad de Aβ y liberándola para la depuración. La eficacia de CQ está restringida por su escasa solubilidad en agua que limita su biodisponibilidad oral. CQ es conocido también por sufrir un importante metabolismo conjugativo y tiene antecedentes de toxicidad como hemos comentado antes. El hecho de que CQ sea un ligando de un metal bidentado hace necesario el confinamiento de al menos dos moléculas por cada ion metálico capturado.

WO 02/48117 da a conocer varios derivados de quinazolina que tienen actividad inhibitoria de la poli(adenosina 5'-difaso-ribosa)polimerasa. Los compuestos están indicados como útiles en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.

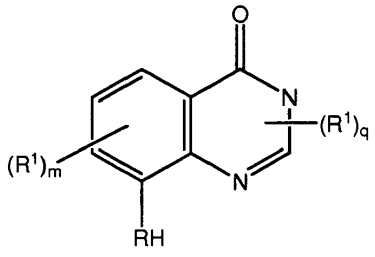
Resumen de la invención

En la actualidad hemos desarrollado compuestos heterocíclicos que tienen dos anillos de 6 miembros fusionados con un átomo de nitrógeno en la posición 1 y un grupo hidroxi o mercapto en la posición 8, con al menos un anillo aromático, a través de la optimización colectiva de una o más de las propiedades siguientes:

(a) quelación de metales (según se define más adelante);
(b) solubilidad acuosa;
(c) menor toxicidad celular;
(d) propiedades de dispersión del amiloide;
(e) adecuada permeabilidad de la membrana para la penetración en el SNC; y
(f) estabilidad metabólica.

Estos compuestos incluyen ejemplos de productos terapéuticos que se concentran en el SNC a través del transporte activo, tienen actividad antioxidante además de sus propiedades de quelación de metales que en algunos casos conduce a mejores propiedades de quelación de metales y tienen una estrategia profármaco que enmascara el grupo 8-hidroxi u 8-mercapto para favorecer la penetración en el SNC y hacer uso de la actividad esterasa conocida que reside en la superficie interna de la barrera hematoencefálica (BHE).

De acuerdo con la presente invención se proporciona el uso de un compuesto de fórmula Ia, sus sales, hidratos, solvatos, tautómeros, isómeros geométricos y/o estereoisómeros en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer:



Ia

en el cual

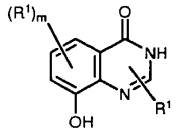
R es O o S;

R^1 se elige independientemente entre H, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6}alquenilo opcionalmente sustituido; C_{2-6}alquinilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido; heterociclilo opcionalmente sustituido; CN; halo; CF_3; SO_3H; y OR^2, SR^2, SOR^2, SO_2R^2, NR^2R^3, $(CH_2)_nNR^2R^3$, $HCNOR^2$, $HCNNR^2R^3$, $CONR^2R^3$, $CSNR^2R^3$, $NCOR^2$, $NCSR^2$, COR^2, CO_2R^2, CSR^2 o $SO_2NR^2R^3$ donde R^2 y R^3 se eligen independientemente entre H, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6}alquenilo opcionalmente sustituido; C_{2-6}alquinilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido o heterociclilo opcionalmente sustituido y n es un número entero de 1 a 10; m es un número entero de 1 a 3; y q es un número entero de 1 a 2, donde el sustituyente opcional es C_{1-6}alquilo, CF_3, F, Cl, I, ciano, C_{1-6}alcoxi, arilo o heterociclilo; y donde arilo es un fenilo y heterociclilo es un grupo heteromonocíclico insaturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 3 átomos de nitrógeno, un grupo heteromonocíclico saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno o un grupo heteromonocíclico saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno. R es preferentemente O.

R^1 es preferentemente halo, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido, OR^2, SR^2, $(CH_2)_nNR^2R^3$, $CONR^2R^3$ y $NCOR^2$ donde n, R^2, R^3, el sustituyente opcional, arilo y heterociclilo son los definidos antes. Más preferentemente R^1 es flúor; yodo; cloro; fenilo opcionalmente sustituido como 4-halofenilo, por ejemplo, 4-fluorofenilo o 4-clorofenilo; un grupo heteromonocíclico insaturado de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno como imidazolilo o piridinilo; un grupo heteromonocíclico saturado de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno como imidazolidinilo o piperazinilo; un grupo heteromonocíclico saturado de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno como morfolinilo; C_{1-4}alquilo opcionalmente sustituido como metilo o etilo; C_{2-6}cicloalquilo opcionalmente sustituido como ciclopropilo; C_{1-6}alcoxi opcionalmente sustituido; tio opcionalmente sustituido; $CH_2NR^4R^5$ en el cual R^4 y R^5 se eligen independientemente entre H y C_{1-4}alquilo; o $CONH(CH_2)_2R^6$ en el cual R^6 es heterociclilo opcionalmente sustituido; y donde el sustituyente opcional y el heterociclilo son los definidos antes.

Sin querer vernos restringidos por la teoría, se cree que el sustituyente R^1 tiene un efecto limitado, electrónica o estéricamente, en las propiedades quelantes de los compuestos utilizados en la presente invención. Por consiguiente, se puede usar la sustitución para modular otros parámetros como la citotoxicidad y las propiedades físicoquímicas que incluyen el número de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, la lipofilicidad (ClogP, ElogP y LogD), la solubilidad y la superficie polar. La modulación de esos parámetros contribuye a la optimización del perfil farmacocinético de los compuestos. También se postula que cuando el sustituyente R^1 está ubicado en las posiciones 2 y/o 7 además de modular la citotoxicidad y las propiedades fisicoquímicas podría también afectar la actividad si el sustituyente proporciona propiedades quelantes.

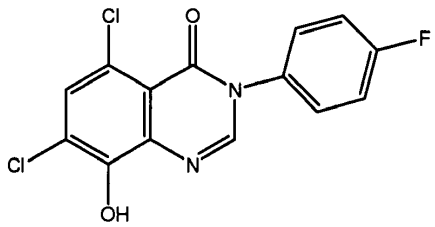
Los compuestos ilustrativos de fórmula Ia son de la manera siguiente:



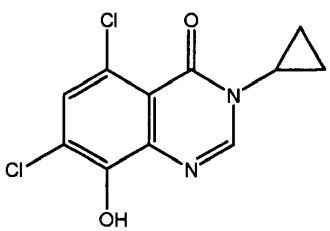
8-hidroxi-4(3H)-quinazolinonas
en las cuales R^1 y m son los definidos antes.

Preferentemente R^1 está ubicado en las posiciones 2, 3, 5 y/o 7 y se elige entre halo, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido y $(CH_2)_nNR^2R^3$ donde n, R^2, R^3, el sustituyente opcional, arilo y heterociclilo son los definidos antes. Más preferentemente R^1 es cloro, fenilo opcionalmente sustituido, C_{2-6}cicloalquilo, $CH_2NR^4R^5$ en el cual R^4 y R^5 se eligen independientemente entre H y C_{1-4}alquilo o piridinilo opcionalmente sustituido, donde los sustituyentes opcionales son los definidos antes.

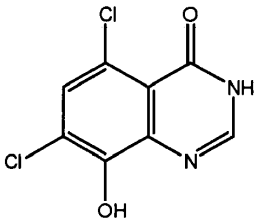
Los ejemplos particularmente preferidos se muestran a continuación.



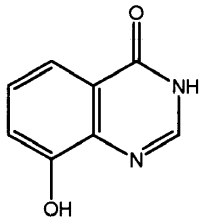
1055



1061



1067



1049

Descripción detallada de la invención

En las reivindicaciones de esta solicitud y en la descripción de la invención, excepto que el contexto requiera algo diferente debido al lenguaje expreso o la implicación necesaria, las palabras “contienen” o variaciones como “contiene” o “que contiene(n)” se utilizan en sentido inclusivo, es decir para especificar la presencia de las características establecidas pero no para excluir la presencia o la adición de otras características en diversas realizaciones de la invención.

El término “alquilo” utilizado solo o en frases como “alquilo opcionalmente sustituido” se refiere a grupos hidrocarburo de cadena lineal, cadena ramificada o cíclicos que tienen entre 1 y 6 átomos de carbono o entre 1 y 4 átomos de carbono. Son ejemplos ilustrativos de dichos grupos alquilo: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. Los grupos alquilo preferidos son C_{1-4}alquilo como metilo o etilo y C_{2-6}cicloalquilo como ciclopropilo.
El término “alquenilo” utilizado solo o en frases como “alquenilo opcionalmente sustituido”, indica radicales lineales, ramificados o mono o policíclicos de 2 a 6 átomos de carbono que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de radicales alquenilo incluyen alilo, etenilo, propenilo, butenilo, iso- butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-pentenilo, ciclopentenilo, 1-metil-ciclopentenilo, 1-hexenilo, 3-hexenilo, ciclohexenilo, 1,3-butadienilo, 1,4-pentadienilo, 1,3-ciclopentadienilo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,3-ciclohexadienilo y 1,4-ciclohexadienilo.

El término “alquinilo” utilizado solo o en frases como “alquinilo opcionalmente sustituido”, se refiere a radicales de cadena lineal o de cadena ramificada de 2 a 6 átomos de carbono que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos incluyen etinilo, 1-propinilo, 1- y 2-butinilo, 2-metil-2-propinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo y 5-hexinilo.

La frase “grupo heterociclilo” utilizada sola o en frases como “heterociclilo opcionalmente sustituido” se refiere a un grupo heteromonocíclico insaturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 3 átomos de nitrógeno, un grupo heteromonocíclico saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno, o un grupo heteromonocíclico saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno.

Los grupos heterocíclicos adecuados incluyen pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazolilo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidino o piperazinilo o morfolinilo.

El heterociclilo es preferentemente imidazolilo, piridinilo, imidazolidinilo, piperazinilo o morfolinilo.

El término “arilo” utilizado solo o en frases como “arilo opcionalmente sustituido” indica fenilo. Preferentemente, el arilo es fenilo opcionalmente sustituido como 4-halofenilo, más preferentemente 4-fluorofenilo o 4-clorofenilo.

El término “halo” se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo, preferentemente flúor, yodo o cloro.

El término “alcoxilo” se refiere a radicales de cadena lineal o ramificada que contienen oxígeno y que cada uno contiene porciones alquilo de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, butoxi y *tert*-butoxi.

La frase "opcionalmente sustituido" se refiere a un grupo que puede estar, o no, sustituido adicionalmente con uno o más grupos elegidos entre C_{1-6}alquilo, más preferentemente C_{1-4}alquilo; CF_3; flúor; cloro; yodo; ciano; C_{1-6}alcoxi, más preferentemente C_{1-4}alcoxi; arilo; un heterociclilo.

La expresión “quelante de metal” se usa en este documento en su sentido más amplio y se refiere a compuestos que tienen dos o más átomos dadores capaces de unirse a un átomo de metal preferentemente Cu, Zn o Fe donde al menos dos de los átomos dadores son capaces de unirse simultáneamente al átomo del metal y el complejo metálico resultante tiene una estabilidad termodinámica mayor o igual que la del complejo ion metálico:ligando biológico. El uso de quelantes de metales como tratamiento para trastornos neurológicos en la presente invención se distingue del concepto conocido previamente de “terapia de quelación”. La “terapia de quelación” es un término

asociado clínicamente a la eliminación de metales pesados como en la enfermedad de Wilson, la β-talasemia y la hemocromatosis. La falla en la homeostasis de los metales en estas enfermedades se puede describir como un suceso catastrófico como un dique que se desborda produciendo una abrumadora inundación del metal problema. El mecanismo de acción de dichos compuestos es que el metal pesado es secuestrado por los quelantes y depurado por excreción. A modo de comparación la falla en la homeostasis de los metales asociada a las afecciones neurológicas de la presente invención es más parecida al constante goteo de un grifo que si se deja el tiempo suficiente causará con el tiempo un daño local durante un período prolongado. La intención del "quelante de metales" de la presente invención es interrumpir una interacción metal-proteína anómala para lograr una sutil repartición de los metales y una posterior normalización de la distribución de los metales con el objetivo de que una vez superado el ciclo tóxico, los procesos endógenos de depuración puedan enfrentar más eficazmente la acumulación de la proteína amiloidógena.

Las sales del compuesto de fórmula Ia son preferentemente farmacéuticamente aceptables, pero se comprenderá que las sales que no son farmacéuticamente aceptables también están comprendidas por el alcance de la presente invención, puesto que son útiles como productos intermedios en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de cationes farmacéuticamente aceptables como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, amonio y alquilamonio; sales de adición de ácido de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables como clorhídrico, ortofosfórico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, carbónico, bórico, sulfámico y bromhídrico; o sales de ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables como acético, propiónico, butírico, tartárico, maleico, hidroximaleico, fumárico, cítrico, láctico, múcico, glucónico, benzoico, succínico, oxálico, fenilacético, metanosulfónico, trihalometanosulfónico, toluenosulfónico, bencenosulfónico, salicílico, sulfanílico, aspártico, glutámico, edético, esteárico, palmítico, oleico, láurico, pantoténico, tánico, ascórbico y valérico.

Además, algunos de los compuestos que se usan en la presente invención pueden formar solvatos con agua o solventes orgánicos comunes. Dichos solvatos están comprendidos por el alcance de la presente invención.

El término “tautómero” se usa en este documento en su sentido más amplio para incluir compuestos de fórmula Ia que son capaces de existir en un estado de equilibrio entre dos isómeros. Dichos compuestos pueden diferir en el enlace que conecta dos átomos o grupos y la posición de esos átomos o grupos en el compuesto.

Dado que el compuesto de fórmula Ia puede tener uno o más centros quirales, es capaz de existir en forma de enantiómeros.

Las composiciones de la presente invención contienen al menos un compuesto de fórmula Ia junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros medicamentos. Cada portador, diluyente, adyuvante y/o excipiente debe ser farmacéuticamente “aceptable” en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no debe ser nocivo para el sujeto. Las composiciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluidas bucal y sublingual), vaginal o parenteral (como subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones se pueden presentar de manera conveniente en formas farmacéuticas unitarias y se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en el área farmacéutica. Dichos métodos incluyen el paso de asociar el principio activo con el portador que integra uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con portadores líquidos, diluyentes, adyuvantes y/o excipientes, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego si fuera necesario dando forma al producto.

Los compuestos de fórmula Ia se utilizan en la fabricación de medicamentos para el tratamiento, el mejoramiento o la profilaxis de las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer puede ser esporádica o familiar, incluidas una de varias formas autosómicas dominantes de la enfermedad de Alzheimer familiar (revisado en St George-Hyslop, 2000).

En una realización particularmente preferida de todos los aspectos de la invención, antes del tratamiento el sujeto tiene una función cognitiva moderada o gravemente deteriorada, evaluada según la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer-prueba cognitiva (ADAS-cog), por ejemplo, un valor de ADAS-cog de 25 o mayor.

Además de frenar o detener el deterioro cognitivo de un sujeto, los compuestos de fórmula Ia también pueden ser adecuados para usar en el tratamiento o la prevención de afecciones neurodegenerativas, o pueden ser adecuados para usar en el alivio de los síntomas de afecciones neurodegenerativas. Los compuestos pueden ser capaces de proporcionar al menos una reversión parcial del deterioro cognitivo experimentado por los pacientes. Si se administra a un sujeto que se ha identificado que tiene un mayor riesgo de predisposición a afecciones neurodegenerativas, o a un sujeto que presenta manifestaciones preclínicas de deterioro cognitivo, tales como deterioro cognitivo leve o deterioro cognitivo mínimo progresivo, estos compuestos pueden ser capaces de prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos, además del efecto de frenar o reducir la velocidad del deterioro

cognitivo.

Actualmente la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, no se diagnostican en general hasta que aparecen uno o más síntomas de advertencia. Estos síntomas constituyen un síndrome conocido como deterioro cognitivo leve (DCL), que recientemente fue definido por la Academia Americana de Neurología y se refiere al estado clínico de los individuos que tienen deterioro de la memoria, pero que por otra parte funcionan bien, y que no cumplen con los criterios clínicos de demencia (Petersen et al., 2001). Los síntomas del DCL incluyen:

(1) Pérdida de memoria que afecta el rendimiento laboral
(2) Dificultad para realizar tareas que le son familiares
(3) Problemas para encontrar las palabras correctas
(4) Desorientación en tiempo y espacio (perderse)
(5) Pobreza o declinación del juicio
(6) Problemas con el pensamiento abstracto
(7) Extravío de objetos en forma reiterada
(8) Cambios de humor o comportamiento
(9) Cambios en la personalidad
(10) Pérdida de iniciativa

El DCL se puede detectar mediante exámenes cognitivos convencionales, como el Mini Examen del Estado Mental y la Detección del Deterioro de la Memoria, y detección con baterías neuropsicológicas.

El término "sujeto" según se utiliza en este documento se refiere a cualquier animal que tenga una enfermedad o afección que requiera tratamiento con un principio farmacéuticamente activo. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, o puede ser un animal doméstico o de compañía. Si bien se prevé particularmente que los compuestos de fórmula la son adecuados para usar en el tratamiento médico de los seres humanos, también es aplicable al tratamiento veterinario, que incluye el tratamiento de animales de compañía como perros y gatos, y animales domésticos como caballos, ponis, burros, mulas, llamas, alpacas, cerdos, ganado y ovejas, o animales de zoológico como primates, felinos, cánidos, bóvidos y ungulados.

Los mamíferos adecuados incluyen los miembros de las órdenes Primates, Rodentia, Lagomorpha, Cetacea, Carnivora, Perissodactyla y Artiodactyla. Los miembros de las órdenes Perissodactyla y Artiodactyla se prefieren particularmente debido a su biología similar y a su importancia económica.

Por ejemplo, Artiodactyla comprende aproximadamente 150 especies vivientes distribuidas en nueve familias: cerdos (Suidae), pecaríes (Tayassuidae), hipopótamos (Hippopotamidae), camellos (Camelidae), cervatillos (Tragulidae), jirafas y okapi (Giraffidae), ciervos (Cervidae), berrendos (Antilocapridae) y ganado, ovejas, cabras y antílopes (Bovidae). Muchos de esos animales se utilizan como animales de cría en varios países. Más importante aún, muchos de los animales económicamente importantes tales como cabras, ovejas, vacas y cerdos tienen una biología muy similar y comparten un alto grado de homología genómica.

La orden Perissodactyla comprende caballos y burros, que son ambos económicamente importantes y están estrechamente relacionados. De hecho, es bien sabido que los caballos y los burros se cruzan.

Según se usa en este documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de un compuesto de fórmula la eficaz para producir una respuesta terapéutica deseada, por ejemplo, tratar, mejorar o prevenir una afección neurológica.

La “cantidad terapéuticamente eficaz” específica variará, evidentemente, con factores tales como la afección particular en tratamiento, la condición física del sujeto, el tipo de sujeto en tratamiento, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), y las formulaciones específicas empleadas y la estructura del compuesto o sus derivados.

Además, los compuestos de fórmula Ia se pueden combinar con otros medicamentos para proporcionar una combinación operativa. Se pretende incluir cualquier combinación químicamente compatible de principios farmacéuticamente activos, en tanto la combinación no elimine la actividad del compuesto de fórmula Ia. Se comprenderá que el compuesto de la invención y el otro medicamento se pueden administrar por separado, consecutivamente o simultáneamente.

Otros medicamentos pueden incluir, por ejemplo, cuando la afección es la enfermedad de Alzheimer, un inhibidor del sitio activo de la acetilcolinesterasa, por ejemplo fenserina, galantamina o tacrina; un antioxidante como vitamina E o vitamina C; un antiinflamatorio como flurbiprofeno o ibuprofeno opcionalmente modificado para liberar óxido nítrico (por ejemplo NCX-2216, producido por NicOx) o un estrogénico como 17-β-estradiol.

Los métodos y los portadores farmacéuticos para la preparación de composiciones farmacéuticas son bien conocidos en el área, como se indica en libros de texto como Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Williams & Wilkins, Pennsylvania, Estados Unidos.

Según se usa en este documento, un "portador farmacéutico" es un solvente un suspendente o un vehículo farmacéuticamente aceptable para administrar el compuesto de fórmula Ia al sujeto. El portador puede ser líquido o sólido y se elige teniendo en mente la manera planificada de administración. Cada portador debe ser farmacéuticamente “aceptable” en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no debe ser nocivo para el sujeto.

El compuesto de fórmula Ia se puede administrar por vía oral, tópica o parenteral en formulaciones en unidades de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y vehículos no tóxicos convencionales, farmacéuticamente aceptables. El término parenteral según se usa en este documento incluye inyecciones subcutáneas, aerosol para administración a los pulmones o la cavidad nasal, técnicas de inyección o infusión intravenosas, intramusculares, intratecales e intracraneales.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral como comprimidos, suspensiones acuosas u oleosas, pastillas, trociscos, polvos, gránulos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires. La composición para uso oral puede contener uno o más agentes seleccionados del grupo de los edulcorantes, saborizantes, colorantes y conservantes para producir preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los saborizantes adecuados incluyen esencia de menta piperita, esencia de wintergreen, saborizantes de cereza, naranja o frambuesa. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfatocoferol, ácido ascórbico, metilparabeno, propilparabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los retardantes adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Los comprimidos contienen el principio activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de los mismos.

Estos excipientes pueden ser por ejemplo, (1) diluyentes inertes, como carbonato de calcio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; (2) granulantes y desintegrantes, como almidón de maíz o ácido algínico; (3) aglutinantes, como almidón, gelatina o acacia, y (4) lubricantes, como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no recubrirse o recubrirse usando las técnicas conocidas para retardar la desintegración y absorción en el tubo digestivo, y proporcionar así una acción sostenida durante un período de tiempo más prolongado. Por ejemplo, se puede emplear un material retardador como monoesterato de glicerilo o diesterato de glicerilo. El recubrimiento también se puede realizar usando las técnicas descritas en las patentes de Estados Unidos Nº 4,256,108; 4,160,452; y 4,265,874 para preparar comprimidos terapéuticos osmóticos de liberación controlada.

El compuesto de fórmula Ia así como el principio farmacéuticamente activo se pueden administrar, para aplicación *in vivo*, por vía parenteral mediante inyección o por perfusión gradual en el tiempo, independientemente o conjuntamente. La administración puede ser por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica o por infusión mediante, por ejemplo, bomba osmótica. Para los estudios *in vitro* los agentes se pueden agregar o disolver en un tampón biológicamente aceptable adecuado y agregar a una célula o un tejido.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, acuosas o no acuosas, estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas o acuosas, como solución salina y medios amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, solución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada, los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como los basados en la solución de Ringer con dextrosa), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes, quelantes, factores de crecimiento, gases inertes y similares.

En general, los términos “tratar”, “tratamiento” y análogos, se usan en este documento con el significado de afectar a un sujeto, tejido o célula para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir parcial o completamente una enfermedad, o un signo o síntoma de ésta, y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o total de una enfermedad. “Tratar” según se usa en este documento cubre cualquier tratamiento o prevención de una enfermedad en un vertebrado, un mamífero, particularmente un humano e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a dicha enfermedad, pero que aún no se le ha diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad, es decir detener su evolución; o (c) aliviar o mejorar los efectos de la enfermedad, es decir, causar la regresión de los efectos de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas se preparan transformando un compuesto de fórmula Ia, o sus sales, o combinaciones del compuesto de fórmula Ia y uno o más principios farmacéuticamente activos en una forma adecuada para la administración a un sujeto utilizando portadores, excipientes y aditivos o auxiliares. Los portadores o auxiliares utilizados frecuentemente incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteínas lácteas, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y solventes como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes. Los conservantes incluyen antibióticos, antioxidantes, quelantes y gases inertes. Otros portadores farmacéuticamente aceptables comprenden soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluidos, sales, conservantes, tampones y similares, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed. Williams y Wilkins (2000) y The British National Formulary 43ª ed. (British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2002; http://bnf.rhn.net). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan según la práctica de rutina en el área. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7ª ed., 1985).

Las composiciones farmacéuticas se preparan y se administran preferentemente en formas farmacéuticas. Las formas farmacéuticas sólidas pueden ser comprimidos, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un sujeto, dependiendo de la actividad del compuesto, la manera de administración, la naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del sujeto, se pueden usar dosis diarias diferentes. Bajo ciertas circunstancias, no obstante, pueden ser adecuadas dosis diarias mayores o menores. La administración de la dosis diaria se puede llevar a cabo mediante una sola administración de una forma farmacéutica individual o mediante la administración de varias formas farmacéuticas más pequeñas y también mediante administración múltiple de dosis subdivididas a intervalos específicos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar local o sistémicamente en una dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por supuesto, de la gravedad de la enfermedad y del peso y el estado general del sujeto. Habitualmente, las dosis utilizadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil acerca de las cantidades útiles para la administración *in situ* de la composición farmacéutica, y se pueden usar modelos animales para determinar dosis eficaces para el tratamiento de los efectos secundarios citotóxicos. Diversas consideraciones se describen, por ejemplo, en Langer, Science, 249: 1527, (1990). Las formulaciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín. También pueden estar en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, como aceite de cacahuate, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen normalmente los principios activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes pueden ser (1) suspendentes como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; (2) dispersantes o humectantes que pueden ser (a) fosfátidos de origen natural como lecitina; (b) un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso, por ejemplo, estearato de polioxietileno; (c) un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol; (d) un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y hexitol como monooleato de polioxietileno sorbitol, o (e) un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión, acuosa u oleaginosa, inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular según métodos conocidos utilizando aquellos dispersantes o humectantes y suspendentes adecuados que han sido mencionados precedentemente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico aceptable para uso parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Con este fin, se puede utilizar cualquier aceite fijo blando incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos como el ácido oleico.

Los compuestos de fórmula I también se pueden administrar en forma de sistemas de administración de liposomas, como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas se pueden formar a partir de diversos fosfolípidos, como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de fórmula Ia también se pueden presentar para su uso en forma de composiciones veterinarias, que se pueden preparar, por ejemplo, por los métodos convencionales en esa área. Los ejemplos de dichas composiciones veterinarias incluyen las adaptadas para:

(a) administración oral, aplicación externa, por ejemplo pócimas (por ej. soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas); comprimidos o bolos; polvos, gránulos o pellets para mezclar con raciones; pastas para aplicación a la lengua;
(b) administración parenteral por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por ej. como una solución o suspensión estéril; o (cuando corresponda) por inyección intramamaria donde una suspensión o solución es introducida en la ubre a través del pezón;
(c) aplicaciones tópicas, por ej. como una crema, pomada o aerosol aplicado a la piel; o
(d) intravaginalmente, por ej. como un pesario, crema o espuma.

Los niveles de dosificación del compuesto de fórmula Ia son del orden entre aproximadamente 0.5 mg y aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, con un intervalo de dosis preferido entre aproximadamente 0.5 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal por día (entre aproximadamente 0.5 g y aproximadamente 3 g por paciente por día). La cantidad de principio activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una sola dosis variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación destinada a la administración oral a humanos puede contener entre aproximadamente 5 mg y 1 g de un principio activo con una cantidad adecuada y conveniente de material portador que puede variar entre aproximadamente 5 y 95 por ciento del total de la composición. Las formas de dosificación contendrán generalmente entre aproximadamente 5 mg y 500 mg de principio activo.

Opcionalmente, los compuestos de fórmula Ia se administran según un programa de dosis dividida, de modo que haya al menos dos administraciones en total en el programa. Las administraciones se hacen preferentemente al menos cada dos horas y hasta cada cuatro horas o más; por ejemplo el compuesto se puede administrar cada una hora o cada media hora. En una realización preferida, el régimen de dosis dividida comprende una segunda administración del compuesto de la invención luego de un intervalo desde la primera administración suficientemente largo para que el nivel del principio activo en la sangre haya disminuido hasta aproximadamente 5 a 30% del nivel plasmático máximo alcanzado luego de la primera administración, de modo de mantener un contenido eficaz de principio activo en la sangre. Opcionalmente se pueden hacer una o más administraciones consecutivas a un intervalo correspondiente entre cada administración precedente, preferentemente cuando el nivel plasmático haya disminuido hasta aproximadamente 10 a 50% del máximo inmediatamente precedente.

Sin embargo, se comprenderá que el nivel de dosificación específico para cualquier paciente en particular, dependerá de varios factores como la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud general, el género, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de flujo de los sujetos estudiados;
La figura 2 son gráficos que muestran el cambio medio (± EE) con respecto a los valores iniciales con el paso del tiempo en las capacidades cognitivas (evaluado con ADAS-cog) en (A) dos grupos de CQ vs placebo y (B) la estratificación por gravedad de la enfermedad dentro de los grupos de tratamiento [menos gravemente afectados (ADAS-cog < 25), más gravemente afectados (ADAS-cog ≥25) (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$);
La figura 3 son gráficos que muestran el cambio medio (± EE) con respecto a los valores iniciales con el paso del tiempo en los niveles plasmáticos de $A\beta_{42}$ en (A) los grupos de CQ vs placebo y (B) la estratificación por gravedad de la enfermedad como en la figura 8. (*** $p \leq 0.001$);
La figura 4 son gráficos que muestran el cambio medio (± EE) con respecto a los valores iniciales con el paso del tiempo en (A) Zn plasmático (B) Cu plasmático en los dos grupos de CQ vs. placebo; y
La figura 5 es un gráfico que muestra los cambios relativos en el comportamiento (ADAS-cog) y los niveles bioquímicos (Aβ plasma/CSF) en el transcurso de la EA.

Ejemplos

La invención se describirá ahora en detalle únicamente con referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

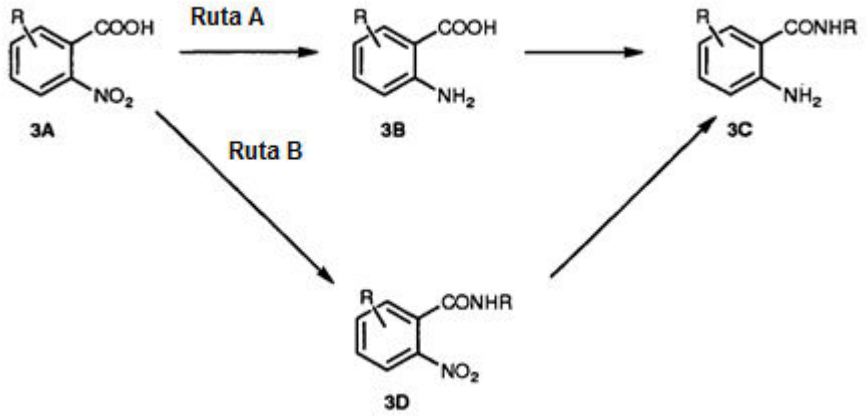
(1) Preparación de 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-onas

Las 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-onas se pueden preparar por procesos conocidos en la bibliografía.

La 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona en sí misma se preparó según un procedimiento bibliográfico (véase Iyer y Dhar, J. Sci. Ind. Res., 1956, 15C, 1). Los derivados de la 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona se pueden sintetizar por varios métodos conocidos en la bibliografía. Uno de los métodos más comunes para derivados de la 3*H*-quinazolin-4-ona es a través de 2-aminobenzamidas sustituidas. Se puede tener acceso a las 2-aminobenzamidas a través de dos métodos diferentes (Esquema 3). Por ejemplo, se convierte primero ácido 2-nitrobenzoico 3A en el ácido antranílico

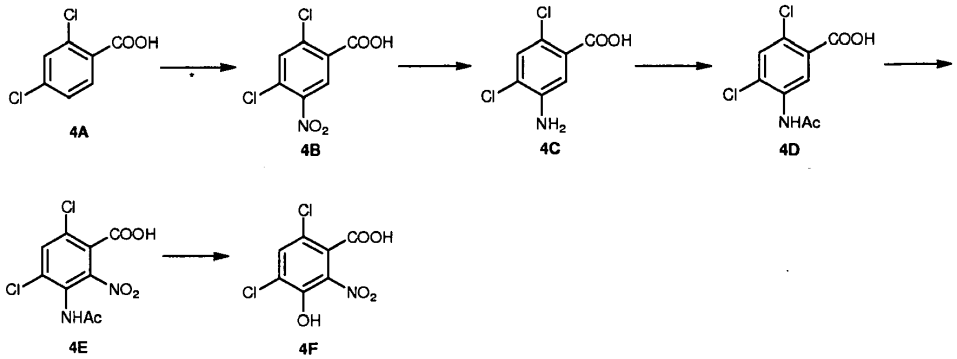
correspondiente 3B. En presencia de aminas y un agente activante como CDI, 3B da la 2-aminobenzamida 3C (ruta A). Alternativamente, 3A y una amina en presencia de CDI se pueden convertir primero en la 2-nitro benzamida 3D. La reducción subsiguiente de 3D da 3C (ruta B).

Esquema 3



El compuesto, 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (4F) (Esquema 4) es un producto intermedio clave utilizado para proporcionar una serie de 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-onas y, específicamente, para la síntesis de derivados 5,7-dicloro sustituidos. Por lo tanto, de acuerdo con Golstein y Schaaf (Helv. Chim. Acta, 1957, 57(23), 132), se nitra ácido 2,4-diclorobenzoico (4A) comercial para dar ácido 2,4-dicloro-5-nitrobenzoico (4B). El compuesto 4B se convierte, a través de la amina 4C y la acetamida 4D, en ácido 3-acetamida-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico (4E). La hidrólisis básica subsiguiente de 4E da el ácido 2-nitrobenzoico 4F. Todos los pasos proceden con altos rendimientos (aproximadamente 90%).

Esquema 4

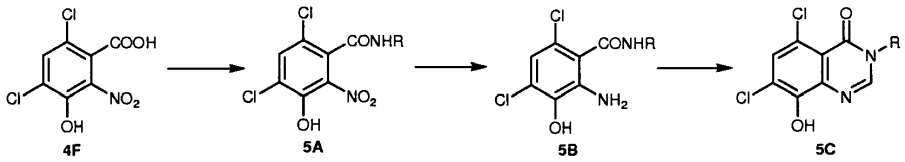


*preparado según Golstein y Schaaf, *Helv. Chim. Acta*, 1957, 57(23), 132

El uso del producto intermedio de fórmula 4E resulta en que el proceso del esquema 4 tiene altos rendimientos y es susceptible de aumentar a escala.

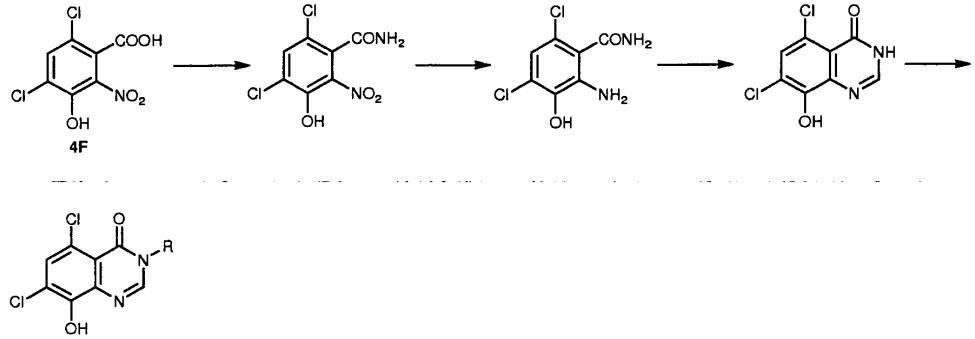
La conversión de un ácido 2-nitrobenzoico como un compuesto 4F en 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-onas (5C) se muestra en el esquema 5. Por lo tanto, el tratamiento de 4F con una amina en presencia de CDI produce la benzamida *N*-(sustituida) 5A. La reducción del grupo nitro y el acoplamiento de la amina resultante 5B con ácido fórmico/CDI proporciona el derivado *N*-alquilado 5C deseado.

Esquema 5



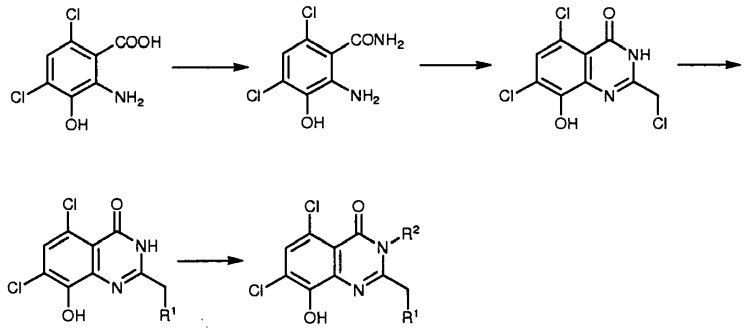
También se pueden preparar quinazolin-4-onas *N*-alquiladas a través de la ruta que se muestra en el esquema 6. Por consiguiente, el ácido 2-nitrobenzoico sustituido apropiado como 4F, se trata primero con una amina en presencia de un activante como CDI. Esto proporciona la nitrobenzamida correspondiente la cual, en condiciones reductoras, da la aminobenzamida. El tratamiento subsiguiente de la aminobenzamida con formamida a reflujo produce la 3*H*-quinazolin-4-ona. Después la 3*H*-quinazolin-4-ona se desprotona con una base como NaH y se trata con el haluro de alquilo apropiado.

Esquema 6



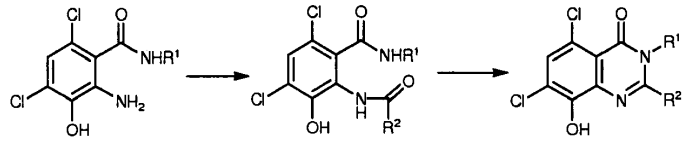
El esquema 7 muestra una ruta para la síntesis de 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-onas 2-sustituidas. Por consiguiente, el tratamiento de un ácido antranílico como ácido 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxibenzoico con cloruro de tionilo y la reacción subsiguiente del cloruro de ácido con amoníaco da la benzamida correspondiente. Ésta, a su vez, se trata con ácido cloroacetilacético para dar 5,7-dicloro-2-clorometil-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona (véase por ejemplo: Tani y colaboradores, J. Med. Chem., 1979, 22, 95). La elaboración posterior del derivado 2-clorometilo en un rango de derivados 2-metil sustituidos, por ej., derivados 2-(metilamino)metilo, se puede lograr usando métodos bibliográficos corrientes. La *N*-alquilación de esos derivados usando las condiciones descritas antes produce derivados 2,3-disustituidos.

Esquema 7



Las 2,3-disustituidas-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-onas también se pueden sintetizar a través de la ruta que se muestra en el esquema 8. Por consiguiente, una 2-amino-3*N*-(sustituida)benzamida se trata con el ácido carboxílico apropiado como glicina protegida con Boc. La deshidratación subsiguiente con metóxido de sodio (véase Lee y colaboradores, J. Med. Chem., 1995, 38, 3547) produce el análogo deseado.

Esquema 8



General

El compuesto siguiente se preparó por los métodos descritos en la bibliografía: 8-metoxi-4(3*H*)-quinazolinona (3)[5]. Los compuestos siguientes se obtuvieron de fuentes comerciales: 8-hidroxi-quinazolina (A1) y 8-hidroxi-2-metil-4(3*H*)-quinazolinona (1). Las aminas: etilamina, histamina, 2-(2-aminoetil)piridina, 2-(2-metilaminoetil)piridina; los aldehídos: 4-imidazolcarboxaldehído, 2-tiazolcarboxaldehído y 2-piridinacarboxaldehído, azoles: pirazol, imidazol, metilimidazol y 1*H*-1,2,3-triazol, los ácidos borónicos: ácido fenilborónico, ácido 2-(trifluorometil)fenilborónico, ácido 2-metoxifenilborónico, ácido o-tolilborónico, ácido 2-fluorofenilborónico, ácido 3-metoxifenilborónico, ácido 4-metoxifenilborónico, ácido *m*-tolilborónico, ácido 3,5-difluorofenilborónico, ácido 2,4-difluorofenilborónico, ácido 3-tiofenoborónico, ácido 3-fluorofenilborónico y ácido 4-fluorofenilborónico; y los reactivos organozinc: bromuro de 2-piridilzinc, yoduro de 2-(metiltio)fenilzinc, yoduro de 2-(etoxicarbonil)fenilzinc y bromuro de 6-metilpiridilzinc (solución 0.5 M en THF) se obtuvieron comercialmente (Aldrich). El ácido 3-piridilborónico se compró a Frontier Scientific. El 2-aminometiltiazol se preparó de acuerdo con la bibliografía.[13] Los solventes fueron de calidad analítica y se usaron como se recibieron. El THF se destiló de sodio y benzofenona en atmósfera de argón. Los espectros ^{1}H NMR (δ, con respecto a TMS) se registraron en un espectrómetro Varian Unity 300 a menos que se indique lo contrario; los valores *J* se informan en hertz. Los datos espectrales de masas se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Quattro II.

La síntesis de los derivados de los compuestos 8-hidroxi-quinazolina se describe en la parte A.

Parte a: síntesis de derivados de 8-hidroxi-quinazolina

La preparación de una serie de derivados de 8-hidroxi-quinazolina se resume en A2 y A4.

Gráfico A2

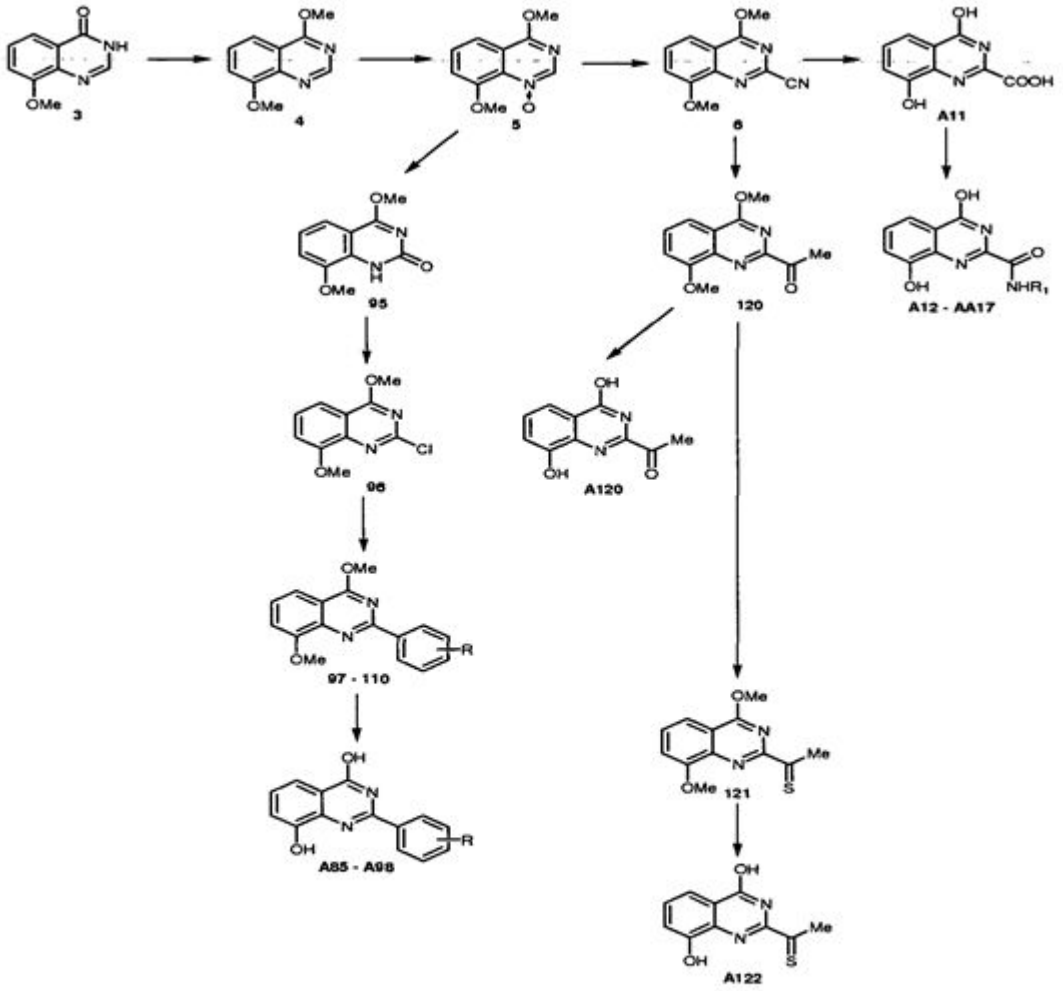
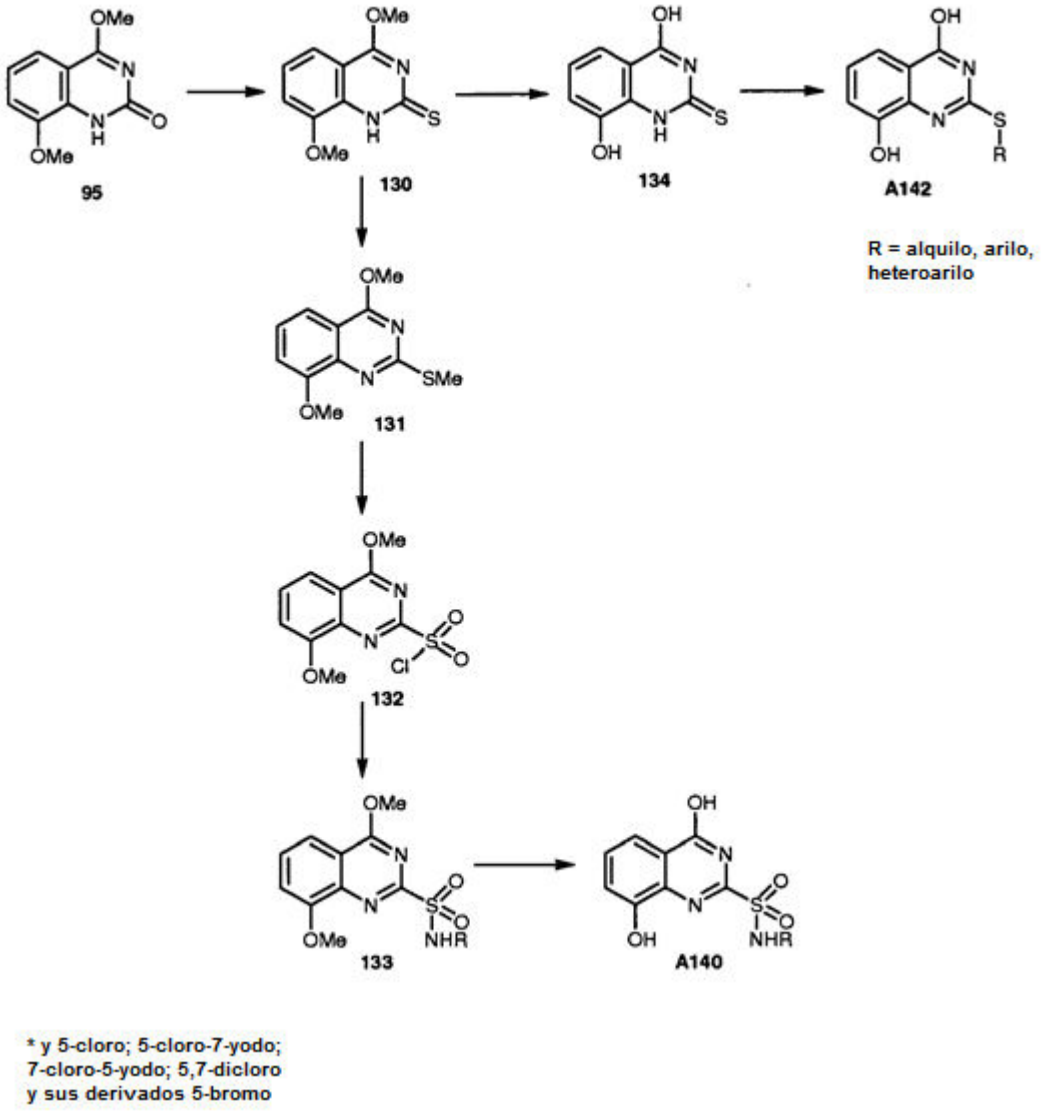
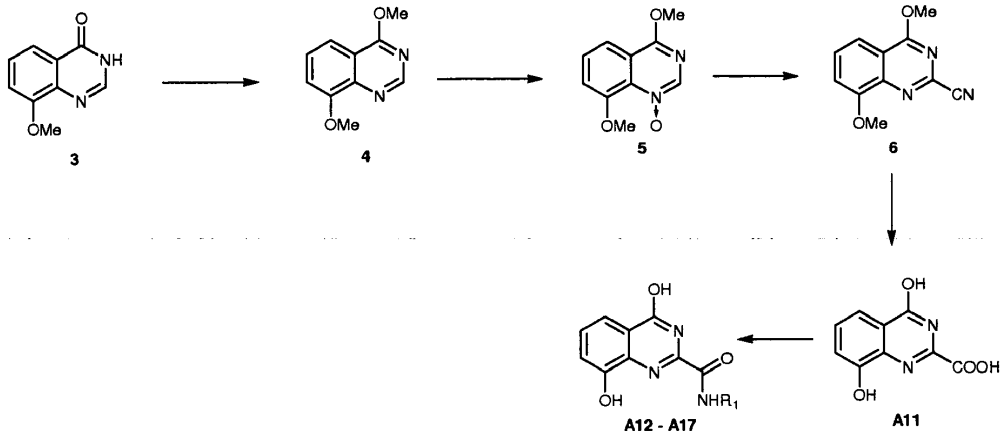

3
4
5
6
A11
95
120
A12 - AA17
96
A120
97 - 110
121
A85 - A98
A122
* y 5-cloro;
5-cloro-7-yodo;
7-cloro-5-yodo;
5,7-dicloro
y sus derivados
5-bromo

Gráfico A4



Preparación del ácido 4,8-hidroxi-quinazolina-2-carboxílico (A11) (Esquema A5)

Esquema A5



A una mezcla en agitación de 8-metoxi-4(3*H*)-quinazolinona[5](3) (0.05 mol) y THF (100 mL) se le agregó yodometano (0.1 mol), bromuro de tetrabutilamonio (100 mg) e NaOH acuoso (preparado partir de 7.55 g de NaOH en 20 mL de H_2O). Después de 16 h a 40 °C, la mezcla se concentró y el residuo remanente se particionó entre H_2O y diclorometano (1:1, 200 mL). La capa orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, se secó y se concentró. La purificación en columna dio 4,8-dimetoxi -quinazolina (4).

A una solución en agitación de 4 (40 mmol) en $CHCl_3$ (200 mL) a 0 °C se le agregó ácido m-cloroperbenzoico (44 mmol) en porciones en el transcurso de 10 min. Después de otros 30 min a 0 °C, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente en el transcurso de 30 min y después se concentró hasta sequedad. Al residuo remanente se le agregó acetato de etilo y $NaHCO_3$ 1 N (1:1, 200 mL); se separaron las capas y la capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró. Esto proporcionó el *N*-óxido 5.

Una mezcla de 5 (30 mmol), benceno (80 mL) y sulfato de dimetilo (35 mmol) se agitó a reflujo durante 16 h, se dejó enfriar, y se concentró al vacío. Al residuo remanente en H_2O (100 mL) a 0 °C se le agregó NaCN (90 mmol). Después de 3 h, la mezcla de reacción se neutralizó (HOAc) y se extrajo con diclorometano, los extractos se combinaron y se secaron. La eliminación del solvente dio el compuesto 2-ciano 6.

Una mezcla de 6 (20 mmol) y NaOH (40 mmol) en H_2O (20 mL) se calentó a 100 °C durante 4 h, y se enfrió. El pH de la solución se ajustó a 4 (HOAc glacial) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (50 mL x 4). Los extractos combinados se secaron y se eliminaron los volátiles. Esto dio ácido 4,8-dimetoxi-quinazolina-2-carboxílico como un sólido. La des-*O*-metilación subsiguiente con BBr_3 dio ácido 4,8-dihidroxi-quinazolina-2-carboxílico (A11).

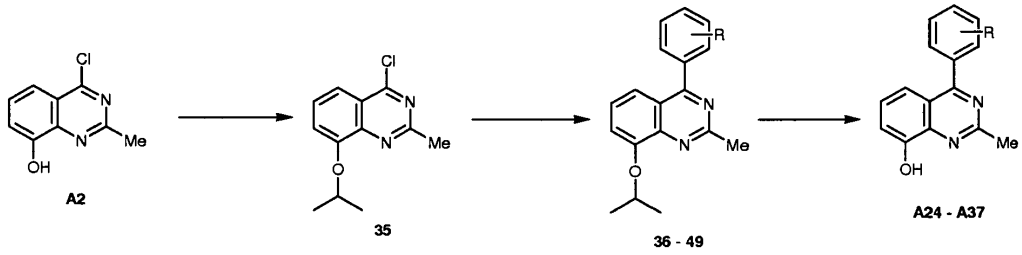
Preparación de amidas del ácido 4,8-dihidroxi-quinazolina-2-carboxílico (A12 - A17) (Esquema A5)

Se agregó 1,3-diciclohexilcarbodiimida (1 mmol) a una solución en agitación de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (1 mmol) y ácido 4,8-dihidroxi-quinazolina-2-carboxílico (A11) (1 mmol) en DMF y diclorometano (1:1, 10 mL). Después de 30 min, se agregó histamina (1 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otras 16 h. Luego se eliminaron los volátiles al vacío y el residuo remanente dio, después de la purificación por cromatografía en columna de sílice (acetato de etilo/*i*-PrOH/NH_4OH 2 N, 6:2:1), [2-(1*H*-imidazol-4-il)-etil-amida del ácido 4,8-dihidroxi-quinazolina-2-carboxílico (A12).

La reacción anterior se repitió usando aminas con All: 2-(2-aminoetil)piridina dio A13, 2-(aminometil)piridina dio A14, 2-aminotiazol dio A15, 2-aminofenol dio A16, 1,2-fenilenodiamina dio A17.

Preparación de 4-aril (o heterocíclico)-8-hidroxi-2-metil-quinoxalina (A24 - A37) (Esquema A6) (Esquema de referencia)

Esquema A6



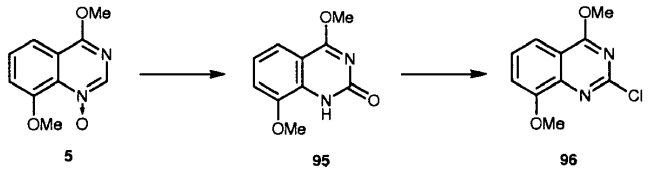
Se agregó 2-bromopropano (9 mmol) a una mezcla en agitación de 4-cloro-8-hidroxi-2-metil-quinazolina (A2) (6 mmol), K_2CO_3 (24 mmol) y DMSO (20 mL). Después de 16 h a temperatura ambiente, se le agregó NH_4Cl saturado (20 mL) y la mezcla se extrajo con diclorometano (20 mL x 3). Los extractos se combinaron y se concentraron. Se agregó éter dietílico (100 mL) al residuo y la mezcla resultante se lavó sucesivamente con NaOH 2 N, H_2O y solución saturada de cloruro de sodio, y se secó (Na_2SO_4). La eliminación del solvente produjo 4-cloro-8-isopropoxi-2-metil-quinazolina (35) como un sólido.

A una mezcla en agitación de 4-cloro-8-isopropoxi-2-metil-quinazolina (35) (0.58 mmol), ácido fenilborónico (0.62 mmol), Na_2CO_3 2 N (7.2 mL), EtOH (1.2 mL) y benceno (6 mL) se le agregó, bajo una manta de argón, $Pd(PPh_3)_4$ (20 mg). La mezcla se agitó a reflujo durante 16 h, se enfrió y se concentró. La cromatografía en columna subsiguiente (acetato de etilo/hexano) proporcionó 8-isopropoxi-2-metil-4-fenilquinazolina (36) como un sólido.

A una solución en agitación de 8-isopropoxi-2-metil-4-fenil-quinazolina (36) (0.34 mmol) en diclorometano (2 mL) a -78 °C se le agregó BCl_3 (1.36 mL de una solución en diclorometano 1 M, 1.36 mmol). Se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente (en el transcurso de 2 h) y se agitó durante otras 2 h. Se le agregó MeOH (5 mL) y la mezcla se concentró hasta sequedad. El proceso se repitió 4 veces. El lavado posterior del residuo remanente con éter dietílico (2 mL x 3) proporcionó 8-hidroxi-2-metil-4-fenil-quinazolina (A24). De manera similar, el tratamiento de 4-cloro-8-isopropoxi-2-metil-quinazolina (35) con ácidos borónicos: ácido 2-(trifluorometil)fenilborónico, ácido 2-metoxifenilborónico, ácido *o*-tolilborónico, ácido 2-fluorofenilborónico, ácido 3-metoxifenilborónico, ácido 4-metoxifenilborónico, ácido *m*-tolilborónico, ácido 3,5-difluorofenilborónico, ácido 2,4-difluorofenilborónico, ácido 3-tiofenoborónico, ácido 3-fluorofenilborónico, ácido 4-fluorofenilborónico y ácido 3-piridilborónico; y la escisión de isopropoxi con BCl_3 dio 4-aril(o heterocíclico)-8-hidroxi-2-metil-quinazolinas (A25 - A37).

Preparación de 2-cloro-4,8-dimetoxi-quinoxalina (96) (Esquema A11)

Esquema A11

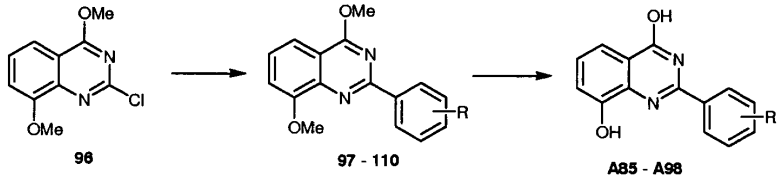


Se agregó Ac_2O (6 mL) a una mezcla en agitación del *N*-óxido 5 (10 mmol) y diclorometano (10 mL). Después el solvente se eliminó al vacío y la solución resultante se calentó a reflujo durante 1 h, se enfrió y se concentró. El residuo remanente se lavó con éter dietílico (10 mL x 2). Esto dio ácido 4,8-dimetoxi-2 (1*H*)-quinazolinona (95) como un sólido.

El tratamiento de 4,8-dimetoxi-2(1*H*)-quinazolinona (95) (5 mmol) con oxicloruro de fósforo (20 mL) y el tratamiento final estándar proporcionaron el 2-cloruro 96.

Preparación de 2-aril(o heterocíclico)-4,8-dihidroxi-quinazolinas (A85 - A98) (Esquema A12)

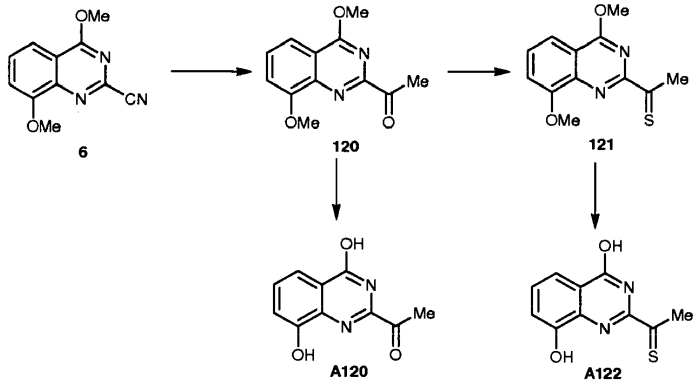
Esquema A 12



De acuerdo con el procedimiento descrito previamente, el acoplamiento del 2-cloruro 96 (0.1 mmol) con ácidos borónicos: ácido fenilborónico, ácido 2-(trifluorometil)fenilborónico, ácido 2-metoxifenilborónico, ácido *o*-tolilborónico, ácido 2-fluorofenilborónico, ácido 3-metoxifenilborónico, ácido 4-metoxifenilborónico, ácido *m*-tolilborónico, ácido 3,5-difluorofenilborónico, ácido 2,4-difluorofenilborónico, ácido 3-tiofenoborónico, ácido 3-fluorofenilborónico, ácido 4-fluorofenilborónico y ácido 3-piridilborónico dio 97 - 110; y la escisión subsiguiente del 8-*O*-metil éter con BCl_3 dio A85 - A98.

Preparación de 2-acetil-4,8-dihidroxi-quinazolina (A120) (Esquema A15)

Esquema A 15



Se agregó gota a gota bromuro de metilmagnesio (1.2 mL de una solución 3 M en éter dietílico, 3.5 mmol) a una solución en agitación de 6 (0.6 mmol) en éter dietílico (10 ,L) a -15 °C. Se dejó que la solución resultante alcanzara la temperatura ambiente en el transcurso de 2 h y se agitó a temperatura ambiente durante otras 4 h. La mezcla de reacción se enfrió rápidamente con NH_4Cl saturado y se extrajo con acetato de etilo (10 mL x 3), los extractos se combinaron, se secaron y se concentraron para dar 120.

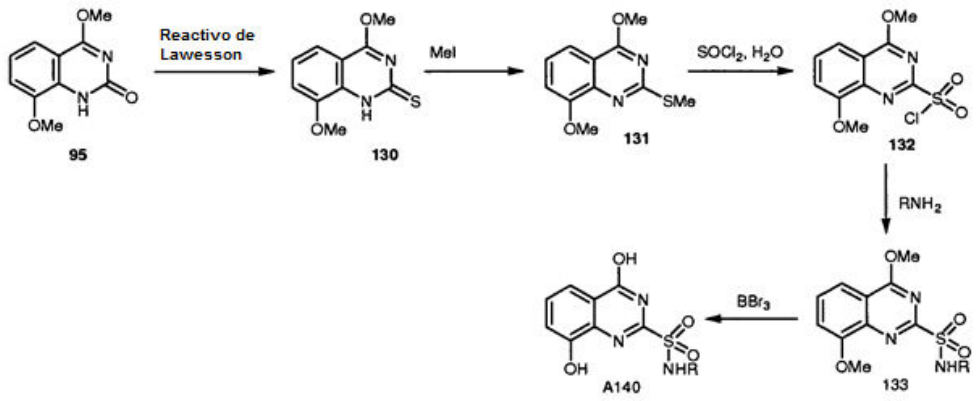
El tratamiento de 120 con BBr_3 dio A120.

Preparación de 2-*S*-acetil-4,8-dihidroxi-quinazolina (A122) (Esquema A15)

Una solución de 120 (1 mmol) y reactivo de Lawesson (0.7 mmol) en THF (10 mL) se calentó a reflujo durante 16 h y se dejó enfriar. La concentración y la cromatografía en columna subsiguiente del residuo dieron 121. El tratamiento de 121 con BBr_3 dio A122.

Preparación de (2-piridin-2-il-etil)-amida del ácido 8-hidroxi-quinazolina-2-sulfónico (A140) (Esquema A22)

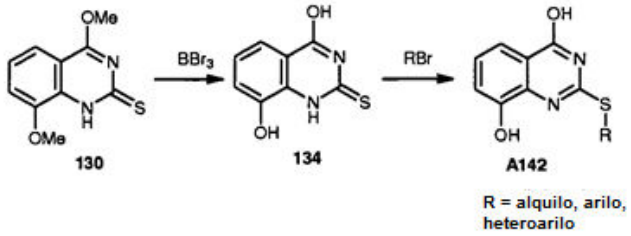
Esquema A22



RNH_2: preferentemente, etilamina, histamina, 2-(2-aminoetil)piridina, 2-(2-metilaminoetil)piridina

Preparación de 2-alquil(o aril o heterocíclico)sulfanil-8-hidroxi-quinazolina (A142) (Esquema A23)

Esquema A23



RBr: preferentemente, 2-bromopiridina, 2-bromotiazol, 4-bromo-1H-imidazol, 4-bromo-1-metilimidazol

REFERENCIAS

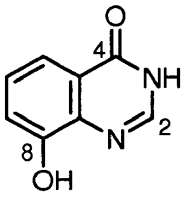
5. R.N. Iyer, N. Anand and M.L. Dhar, J. Sci. Ind. Res., 1956, 15C, 1-7.
10. H. Gerson and M.W. McNeil, J. Org. Chem., 1971, 8, 821-824.
13. (a) A. Dondoni, G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici and P. Pedrini, Synthesis, 1987, 998-1001. (b) A. Dondoni, F.L. Merchan, P. Merino, I. Rojo and T. Tejero, Synthesis, 1996, 641-646.
16. X.-H. Bu, H. Liu, M. Du, K.M.C. Wong, V. W.W. Yam and M. Shionoya, Inorg. Chem., 2001, 40, 4143-4149.

(7) Preparación de 8-hidroxi-4(3*H*)-quinazolinona

General

Los compuestos/reactivos siguientes se obtuvieron de fuentes comerciales: aminas: etilamina, histamina, 2-(2-aminoetil)piridina, 2-(2-metilaminoetil)piridina; aldehídos: 4-imidazolcarboxaldehído, 2-tiazolcarboxaldehído y 2-piridinacarboxaldehído, azoles: pirazol, imidazol, metilimidazol y 1*H*-1,2,3-triazol, ácidos borónicos: ácido fenilborónico, ácido 2-(trifluorometil)fenilborónico, ácido 2-metoxifenilborónico, ácido *o*-tolilborónico, ácido 2-fluorofenilborónico, ácido 3-metoxifenilborónico, ácido 4-metoxifenilborónico, ácido *m*-tolilborónico, ácido 3,5-difluorofenilborónico, ácido 2,4-difluorofenilborónico, ácido 3-tiofenoborónico, ácido 3-fluorofenilborónico y ácido 4-fluorofenilborónico; y reactivos organozinc: bromuro de 2-piridilzinc, yoduro de 2-(metiltio)fenilzinc, yoduro de 2-(etoxicarbonil)fenilzinc y bromuro de 6-metilpiridilzinc (solución 0.5 M en THF) (Aldrich). El ácido 3-piridilborónico se compró a Frontier Scientific. El 2-aminometiltiazol se preparó de acuerdo con la bibliografía.[1] Los solventes fueron de calidad analítica y se usaron como se recibieron. El THF se destiló de sodio y benzofenona en atmósfera de argón. Los espectros ^{1}H NMR (δ, con respecto a TMS) se registraron en un espectrómetro Varian Unity 300 a menos que se indique lo contrario; los valores *J* se informan en hertz. Los datos espectrales de masas se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Quattro II.

Se describe la síntesis de derivados de 8-hidroxi-4(3*H*)-quinazolinona (A).



A

Se empleó el método[2] de Iyer y colaboradores en la síntesis de los compuestos A1 y A2. La derivatización posterior de estos compuestos para proporcionar una serie de 8-hidroxi-4(3*H*)-quinazolinonas empleó las rutas que se muestran en los gráficos A1 - A2. La halogenación de las posiciones 5 y/o 7 en el sistema de 8-hidroxi-4(3*H*)-quinazolinona siguió métodos descritos previamente[3] en la bibliografía para las reacciones en 8-hidroxiquinolinas.

Gráfico A1

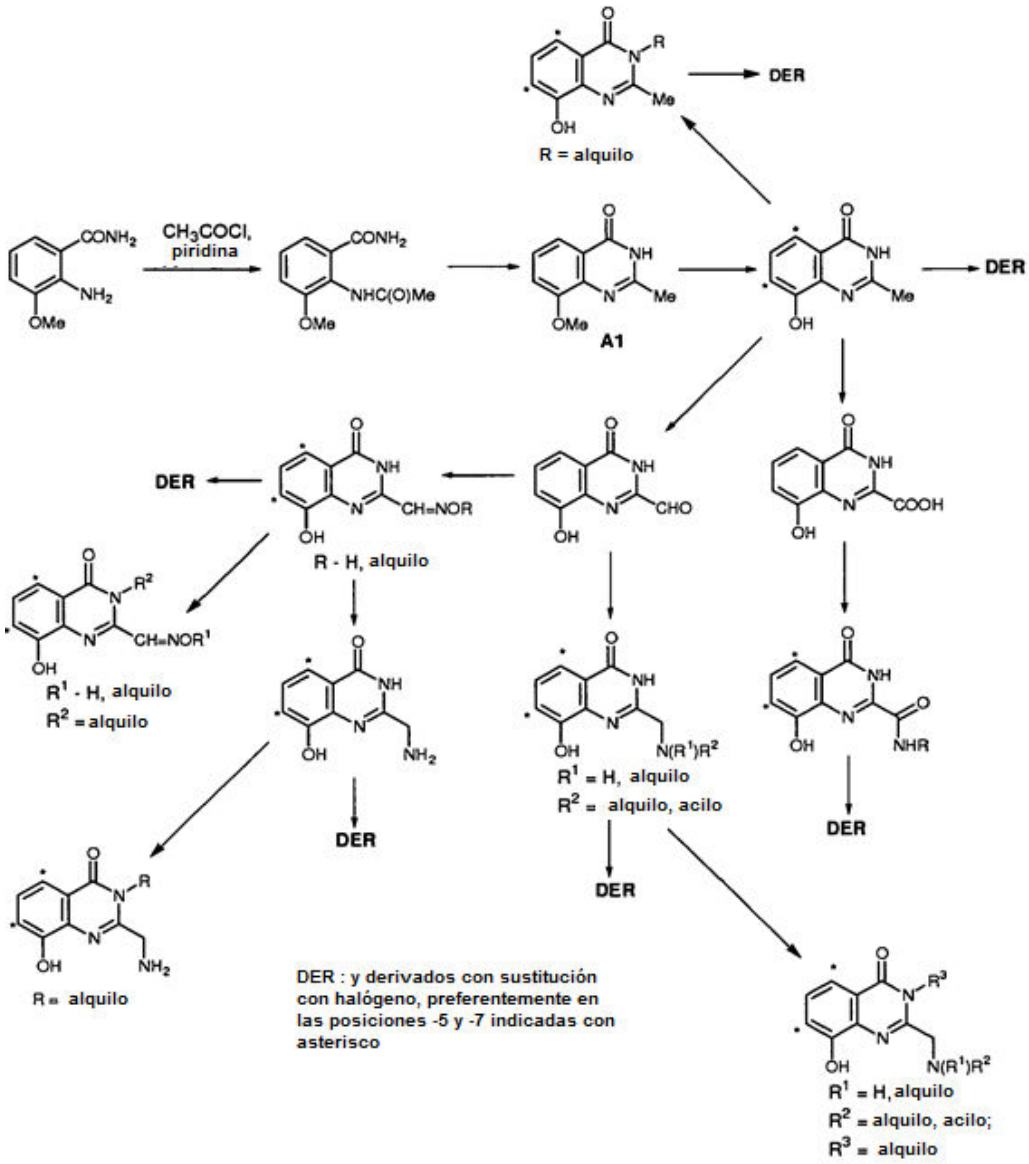
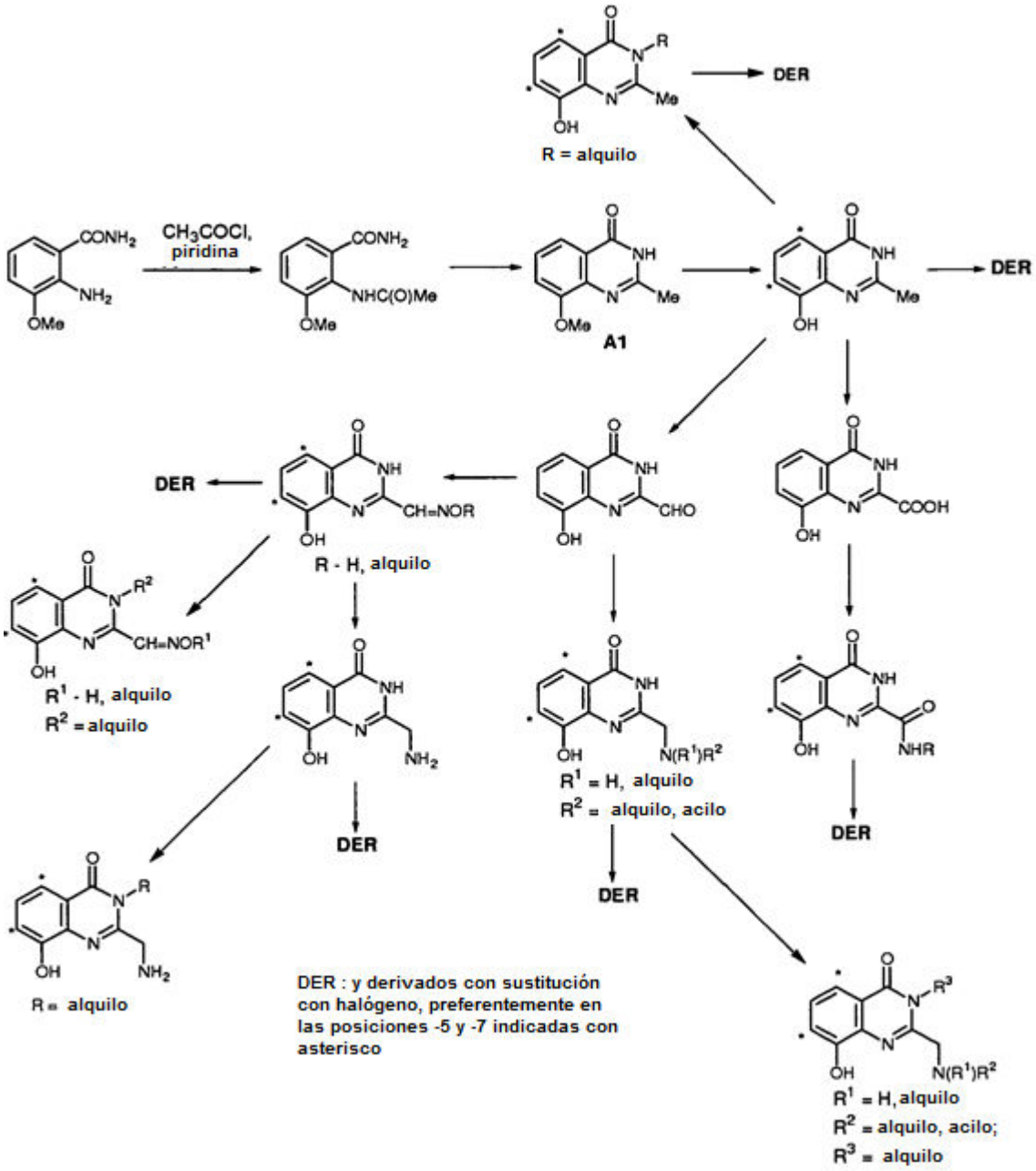


Gráfico A2


DER
R = alquilo
CONH2
CH3COCl, piridina
NHC(O)Me
OMe
A1
CH=NOR
R - H, alquilo
CHO
COOH
CH=NOR1
R1 - H, alquilo
R2 = alquilo
NH2
N(R1)R2
R1 = H, alquilo
R2 = alquilo, acilo
NHR
R = alquilo
DER : y derivados con sustitución con halógeno, preferentemente en las posiciones -5 y -7 indicadas con asterisco
R3
R1 = H, alquilo
R2 = alquilo, acilo;
R3 = alquilo

REFERENCES

1. (a) A. Dondoni, G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici and P. Pedrini, Synthesis, 1987, 998-1001. (b) A. Dondoni, F.L. Merchan, P. Merino, I. Rojo and T. Tejero, Synthesis, 1996, 641-646.
2. R.N. Iyer, N. Anand and M.L. Dhar, J. Sci. Ind. Res. A, General, 1956, 15C, 1-7.
3. H. Gerson, M.W. McNeil, R. Parmegiani and R.K. Godfrey, J. Med. Chem., 1972, 15, 987-989, and references cited therein.

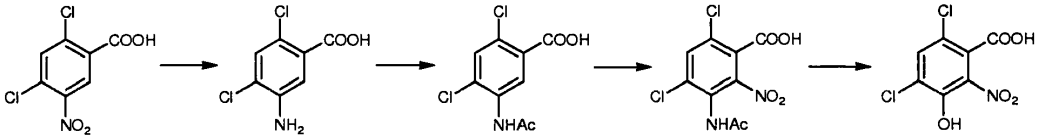
General

Este compuesto se preparó de acuerdo con procedimientos bibliográficos: 8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona (PB 1049) (Iyer y Dhar, J. Sci. Ind. Res., 1956, 15C, 1). Los solventes fueron de calidad analítica y se usaron como se recibieron. El THF se destiló de sodio y benzofenona en atmósfera de argón. Los espectros ^{1}H NMR (δ, con respecto a TMS) se registraron en un espectrómetro Varian Inova 400 a menos que se indique lo contrario; los valores *J* se informan en hertz; multiplicidad: s = singulete, d = doblete, m = multiplete, sep = septeto, t = triplete, q = cuarteto. Los datos espectrales de masas se registraron en un espectrómetro de masas Micromass Quattro II.

Ejemplo 2:

(A) 5,7-dicloro-3-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona (1055)

Paso A: Preparación de ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico



Se agregó hidrato de cloruro de estaño (II) (50 g, 0.29 mol) a una solución de ácido 2,4-dicloro-5-nitrobenzoico (preparado según un procedimiento publicado por (Golstein, H. y Schaaf, E., Helv. Chim. Acta, 1957, 57(23), 132))(10.0 g, 0.045 mol) en EtOH (200 mL). La mezcla se agitó a 70 °C durante 0.5 h, se enfrió y se vertió sobre hielo. El pH de la mezcla se ajustó a 8 ($NaHCO_3$ saturado). La suspensión se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 5 h y se reacidificó hasta pH 5 (HOAc glacial). La suspensión blanca resultante se extrajo continuamente con acetato de etilo, los extractos se combinaron, se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para dar la amina deseada como un sólido blancuzco (8.8 g, 96%).

Ácido 5-amino-2,4-diclorobenzoico: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.30 (s, 1 H), 7.27 (s, 1 H).

Se agregó anhídrido acético (27 mL) al ácido 5-amino-2,4-diclorobenzoico (8.0 g, 0.041 mol) en HOAc glacial (150 mL). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 0.5 h y se concentró para dar la acetamida deseada como un sólido blanco (9.6 g, 96%).

Ácido 5-acetamido-2,4-diclorobenzoico: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.32 (s, 1 H), 7.62 (s , 1 H), 2.19 (s, 3 H).

Se agregó ácido 5-acetamido-2,4-diclorobenzoico (9.6 g, 0.039 mol) en pequeñas porciones en el transcurso de 30 min a una solución en agitación enfriada con hielo de ácido nítrico fumante (1.8 mL, 0.043 mol) y ácido sulfúrico concentrado (120 mL). Una vez que se completó la adición, se agregaron más ácido nítrico fumante (17 mL) y ácido sulfúrico concentrado (80 mL) a intervalos de 30 min y 60 min. La mezcla de reacción se dejó después en agitación durante otras 2.5 h a 0 °C, se permitió que alcanzara 12-16 °C y se dejó en agitación a esta temperatura hasta que todo el material de partida se consumió (alrededor de 3 h). La solución se vertió en hielo y se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para dar ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico como un sólido anaranjado (9.8 g, 86%).

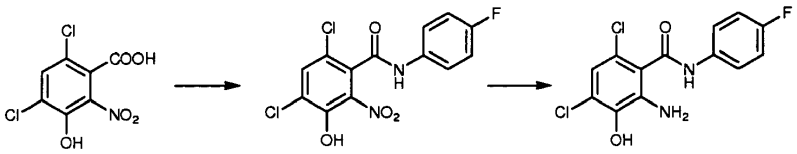
Ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 8.01 (s, 1 H), 2.13 (s, 3 H).

Se agregó ácido 3-acetamido-4,6-dicloro-2-nitrobenzoico (9.7 g, 0.033 mol) a una solución de KOH (18.7 g, 0.034 mol) en H_2O (85 mL). La solución se calentó a reflujo durante 18 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se agregó HCl conc. para ajustar el pH a 0. La mezcla se diluyó con acetato de etilo y H_2O y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Las capas se separaron; la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x), los extractos se combinaron con la capa orgánica original, se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio, se secaron y se concentraron para dar ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico como un sólido rojo oscuro (7.4 g, 89%); p.f. 188-189 °C (bibl. p.f. (Linderberg, M., Hellberg, S., Bjork, S. et al, Eur. J. Med. Chem., 1999, 34, 729-744):

186 °C (dec)).

Ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.79 (s, 1 H); espectro de masas: *m*/*z* 250, 252, 254 (M^+ - 1, 100%, 66%, 11%).

Paso B: Preparación de 2-amino-4,6-dicloro-N-(4-fluorofenil)-3-hidroxibenzamida



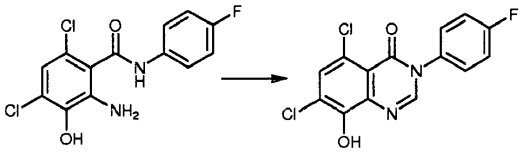
Se agregó CDI (2.2 g, 0.013 mol) a una solución en agitación de ácido 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzoico (3.0 g, 0.012 mol) en THF anhidro (30 mL) y DMF (2 mL). Después de 40 min, se agregó 4-fluoroanilina (4 mL, 0,042 mol). La solución se calentó a reflujo durante toda la noche, se enfrió y se concentró hasta obtener un aceite viscoso marrón oscuro. El aceite se purificó por cromatografía en gel de SiO_2 (diclorometano/metanol, 19:1 - 9:1) para dar 4,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-2-nitrobenzamida como un aceite marrón claro (2.7 g, 65%).

4,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-2-nitrobenzamida: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.58 (m, 2 H), 7.44 (s, 1 H), 7.07 (m, 2 H).

Una suspensión de hidrato de cloruro de estaño (II) (8.8 g, 0.039 mol), 4,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)-3-hidroxi-2-nitrobenzamida (2.7 g, 0.008 mol) y EtOH (70 mL) se calentó a 70 °C durante 1 h y se permitió que se enfriara hasta temperatura ambiente. La mezcla se vertió en hielo, se basificó hasta pH 8 ($NaHCO_3$ sat.), y se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h antes de reacidificar hasta pH 6.5 con HOAc glacial. La suspensión se filtró; el filtrado se concentró para dar un sólido beige. El sólido beige se combinó con la torta de filtración y se extrajo con acetato de etilo caliente (5x). Los extractos se combinaron para dar 2-amino-4,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)-3-hidroxibenzamida como un sólido (2.0 g, 79%).

2-amino-4,6-dicloro-*N*-(4-fluorofenil)-3-hidroxibenzamida: ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.69 (m, 2 H), 7.09 (m, 2 H), 6.73 (s, 1H).

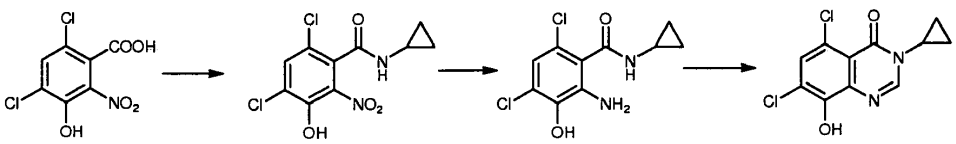
Paso C: Preparación de 5,7-dicloro-3-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3H-quinazolin-4-ona (1055)



Una solución de CDI (0.65 g, 4.0 mmol) y ácido fórmico (0.17 mL, 3.6 mmol) en THF anhidro (18 mL) y DMF (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Después se le agregó una solución de la amina del paso B (1.01 g, 3.2 mmol) en THF (15 mL), la solución se calentó a reflujo durante 15 h y se concentró. El sólido marrón resultante se lavó con acetato de etilo para dar el compuesto del título como agujas blancas (0.49 g, 47%).

5,7-dicloro-3-(4-fluorofenil)-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona:^{1}H NMR ($CDCl_3/CD_3OD$, 9:1): δ 8.10 (br, 1 H), 7.50 (s, 1 H), 7.36 (m, 2 H), 7.21 (m, 2 H); espectro de masas: *m*/*z* 325, 327, 329 (M^++ 1, 100%, 66%, 11%).

(B) 5,7-dicloro-3-ciclopropil-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona (1061)



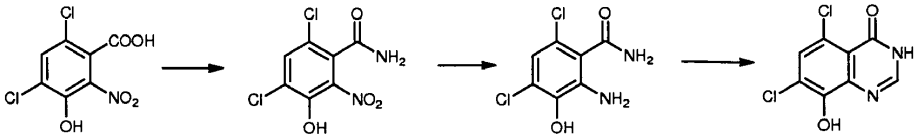
Los compuestos siguientes se prepararon usando los métodos descritos en el ejemplo 3: por lo tanto, reemplazando 4-fluoroanilina por ciclopropilamina en el paso B (la reacción se realizó en un tubo sellado a 70 °C) dio, después de la cromatografía en gel de SiO_2 (diclorometano/MeOH, 9:1), 4,6-dicloro-*N*-ciclopropil-3-hidroxi-2-nitrobenzamida

(43%).- ^{1}H NMR (CD_3OD): δ 7.37 (s, 1 H), 2.73 (m, 1 H), 0.74 (m, 2 H), 0.59 (m, 2 H); espectro de masas: *m*/*z* 289, 291, 293 (M^+ - 1, 100%, 66%, 11%).

La reducción de 4,6-dicloro-*N*-ciclopropil-3-hidroxi-2-nitrobenzamida con hidrato de cloruro de estaño (II) usando las condiciones descritas en el paso B dio 2-amino-4,6-dicloro-*N*-ciclopropil-3-hidroxibenzamida (93%). - ^{1}H NMR (CD_3OD) : δ 6.67 (s, 1 H), 2.86 (m, 1 H), 0.79 (m, 2 H), 0.62 (m, 2 H).

El acoplamiento mediado por CDI de ácido fórmico con 2-amino-4,6-dicloro-*N*-ciclopropil-3-hidroxibenzamida (como se describió en el paso C) dio, después de lavar con acetato de etilo y MeOH, 5,7-dicloro-3-ciclopropil-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona como un sólido blanco (40%). - ^{1}H NMR ($CDCl_3/CD_3OD$, 9:1): δ 8.30 (s, 1 H), 7.46 (s, 1 H), 3.22 (m, 1 H), 1.21 (m, 2 H), 0.94 (m, 2 H); espectro de masas: *m*/*z* 271, 273, 275 (M^++ 1, 100%, 66%, 11%).

(C) 5,7-dicloro-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona (1067)



Una solución de ácido 2,4-dicloro-5-hidroxi-6-nitrobenzoico (paso A) (4.40 g, 17.6 mmol) y cloruro de tionilo (2 mL, 27 mmol) en tolueno (60 mL) se calentó a reflujo durante 1 h y se dejó que se enfriara hasta temperatura ambiente. La solución se agregó a NH_4OH conc. (40 mL) a 0 °C. Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después se concentró para dar 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzamida cruda como un sólido marrón. - ^{1}H NMR (CD_3OD) : δ 7,33 (s, 1 H); espectro de masas: *m*/*z* 249,251,253 (M^+- 1, 100%, 66%, 11%).

La reducción de 4,6-dicloro-3-hidroxi-2-nitrobenzamida con hidrato de cloruro de estaño (II) según las condiciones descritas en el paso B dio 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxibenzamida como un sólido beige (2.5 g, 62% (2 pasos)). - ^{1}H NMR (CD_3OD) : δ 6.69 (s, 1 H).

De acuerdo con el procedimiento descrito en el paso C, 2-amino-4,6-dicloro-3-hidroxibenzamida y ácido fórmico en presencia de CDI dieron, después de lavar el producto crudo con MeOH, 5,7-dicloro-8-hidroxi-3*H*-quinazolin-4-ona como un sólido blanco (36%). - ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 8.12 (s, 1 H), 7.55 (s, 1 H); espectro de masas: *m*/*z* 229, 231, 233 (M^+ - 1, 100%, 66%, 11%).

Los ensayos siguientes se utilizaron en la evaluación de nuevos compuestos de acuerdo con la invención a fin de determinar su idoneidad para ser utilizados en los métodos de la invención

Ejemplo 5 - Evaluación de los compuestos de fórmula Ia

Los ensayos siguientes se utilizaron en la evaluación de los compuestos de fórmula Ia para determinar su idoneidad para ser utilizados en la invención

Ensayo 1. Ensayo fluorométrico de H_2O_2

Se usó un ensayo fluorométrico para probar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la generación de peróxido de hidrógeno por Aβ en presencia de cobre basado en diacetato de diclorofluoresceína (DCF; Molecular Probes, Eugene OR). La solución de DCF (5 mM) en dimetilsulfóxido al 100% (previamente purgado con argón durante 1 h a 20 °C) se desacetiló en presencia de NaOH 0.025 M durante 30 min y se neutralizó a pH 7.4 hasta una concentración final de 1 mM. Se preparó una solución madre de peroxidasa de rábano (HRP) a una concentración de 1 µM a pH 7.4. Las reacciones se llevaron a cabo en PBS, pH 7.4 en una placa de 96 pocillos (volumen total = 250 µl/pocillo). Las soluciones de reacción contenían Aβ 1-42 a concentraciones en el intervalo de 50 nM a 1 µM, se preparó quelato de cobre-glicina (Cu-Gly) agregando $CuCl_2$ a glicina en una relación 1:6 y se agregó a Aβ en la proporción 2Cu-Gly:1Aβ), reductores incluida dopamina (5 µM) o ácido ascórbico, DCF desacetilada 100 µM, y HRP, 0.1 µM. También puede estar presente EDTA 1-10 µM u otro quelante como control para el cobre libre, pero no fue necesario para que el ensayo funcionara. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 60 min. Se pueden incluir como controles positivos estándares de catalasa (4000 unidades/ml) y H_2O_2 (1-2.5 µM) en PBS pH 7.4. La fluorescencia se registró utilizando un lector de placas con filtros de excitación y emisión a 485 nM y 530 nM, respectivamente. La concentración de H_2O_2 se puede establecer comparando la fluorescencia con los estándares de H_2O_2. La inhibición de la producción de H_2O_2 por Aβ se evaluó incluyendo una concentración conocida de compuesto(s) de prueba en los pocillos de prueba.

Ensayo 2. Ensayos de neurotoxicidad

Cultivos primarios de neuronas corticales

Se prepararon cultivos corticales según se describió previamente (White *et al.*, 1998). Se extrajeron córtex embrionarios del día 14 de ratón BL6Jx129sv, se disecaron sin meninges y se disociaron en tripsina al 0.025% (peso/vol). Las células disociadas se distribuyeron en placas de cultivo de 48 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/ml en MEM con 25% (vol/vol) de FCS y 5% (vol/vol) de HS y se incubaron a 37 ℃ durante 2 h. Después se reemplazó el medio con medio Neurobasal (Invitrogen Life Technologies) y suplementos B27 (Invitrogen Life Technologies). Los cultivos se mantuvieron a 37 ℃ en 5% de CO_2. Antes de la experimentación, el medio de cultivo se reemplazó con medio neurobasal y B27 sin antioxidantes (Invitrogen Life Technologies).

Cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo

Se extrajeron cerebelos de ratones, 5 a 6 días después del nacimiento (P5-6), se disecaron sin meninges y se disociaron en tripsina al 0.025%. Las neuronas granulares del cerebelo (CGN) se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos a una concentración de 350 000 células/cm^2 en BME (Invitrogen Life Technologies) complementado con 10% de suero fetal bovino (FCS), glutamina 2 mM y KCl 25 mM. Se agregó sulfato de gentamicina (100 µg/mL) a todo el medio distribuido en placa y los cultivos se mantuvieron a 37 ℃ en 5% de CO_2.

Ensayo 3. Ensayo de viabilidad celular

(a) Ensayo MTS de viabilidad celular

Se determinó la viabilidad celular usando el ensayo MTS. El medio de cultivo se reemplazó con medio neurobasal recién preparado más suplementos B27 menos antioxidantes. Volumen 1/10 de solución MTS (Cell Titre 96 Aqueous One, Promega Corporation) y se incubó a 37 ℃ durante 2 h. Se midieron alícuotas de 200 microlitros con un espectrofotómetro a 560 nm.

(b) Ensayo LDH de viabilidad celular

Se determinó la muerte celular a partir de los sobrenadantes del cultivo exentos de suero y residuos celulares usando el kit de detección de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (LDH) (Boehringer Ingelheim) según las instrucciones del fabricante.

(c) Ensayo de neurotoxicidad de Aβ y neuroprotección de Aβ

Se cultivaron células neuronales corticales durante cinco días según el ensayo 2. El día seis se reemplazó el medio neurobasal (NB) (Invitrogen Life Technologies) y el suplemento B27 (Invitrogen Life Technologies) con medio NB y suplemento B27 (sin antioxidantes). El día seis, se agregaron individualmente los compuestos de prueba a los cultivos de células neuronales.
Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 100% hasta una concentración de 2.5 mM (10 mM si se había pesado un exceso del compuesto por vial - después diluida a 2.5 mM).
Se diluyó en serie 1 en 10 la solución madre 2.5 mM para dar soluciones de trabajo 250 µM, 25 µM, y 2.5 µM.

Preparación de Aβ:

Aβ se disolvió inicialmente en NaOH 20 mM hasta una concentración de 1 mM y se sometió a ultrasonido durante 5 minutos. Después el péptido se diluyó en H_2O y 10 X PBS hasta una concentración final de 200 µM de Aβ en 1 X PBS. El péptido se volvió a someter a ultrasonido durante 5 minutos y luego se hizo girar a 14 000 rpm durante 5 min y se transfirió a un tubo nuevo.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 100% hasta una concentración de 2.5 mM (10 mM si se había pesado un exceso del compuesto por vial - después diluida a 2.5 mM). La solución madre 2.5 mM se diluyó en serie 1 en 10 [en medio NB y B27 (sin antioxidantes)] para dar soluciones de trabajo 250 µM, 25 µM, 2.5 µM. Los compuestos de prueba no se agregaron directamente a las células, sino que se agregaron a la “placa de fármaco” de 48 pocillos según se indica a continuación:

Preparación de la “placa de fármaco”.

A una placa de 48 pocillos agregar:

Pocillo 1: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante)* + 24 µl de compuesto de prueba 25 µM + 60 µl de diluyente de Aβ**

Pocillo 2: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 250 µM + 60 µl de diluyente de Aβ
Pocillo 3: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de diluyente de compuesto de prueba*** + 60 µl de Aβ1-42
Pocillo 4: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 25 µM + 60 µl de Aβ1-42
Pocillo 5: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 25 µM + 60 µl de Aβ1-42
Pocillo 6: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 250 µM + 60 µl de diluyente de Aβ1-42
Pocillo 7: 515 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de diluyente de compuesto de prueba + 60 µl de diluyente de Aβ1-42
Pocillo 8: 600 µl de NB + B27 (sin antioxidante)
N.B. 60 µl de Aβ1-42 equivale a 20 µl de Aβ1-42 por pocillo que equivale a Aβ1-42 20 µM

La placa de fármaco se incubó a 37 ºC durante 15 minutos. Se agregaron 200 µl de cada pocillo por triplicado a la placa de células correspondiente. La placa de células se incubó a 37 ºC durante 4 días.

* Medio NB + B27 (sin antioxidantes),
** Diluyente de Aβ NaOH 2 mM, 1 X PBS
*** Diluyente de PBT DMSO al 10% en NB + B27 (sin antioxidante)

Finalización del ensayo:

Al 4º día después de tratar las células el ensayo se finalizó agregando MTS a las células.

(d) Ensayo de citotoxicidad del compuesto de prueba

Se cultivaron células neuronales corticales durante cinco días según el ensayo 2 en medio NB y suplemento B27.

El día seis los compuestos de prueba se agregaron a los cultivos de células neuronales en medio NB y suplemento B27 sin antioxidantes.

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO al 100% hasta una concentración de 2.5 mM (10 mM si se había pesado un exceso del compuesto por vial - después diulida a 2.5 mM). Se diluyó en serie 1 en 10 la solución madre 2.5 mM para dar soluciones de trabajo 250 µM, 25 µM, y 2.5 µM. Los compuestos de prueba no se agregaron directamente a las células, sino que se agregaron a la “placa de fármaco” de 48 pocillos según se indica a continuación:

Preparación de la “placa de fármaco”.

A una placa de 48 pocillos agregar:

Pocillo 1: 576 µl de NB + B27 (sin antioxidante)* + 24 µl de compuesto de prueba 2.5 µM
Pocillo 2: 576 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 25 µM
Pocillo 3: 576 µl de NB + B27(sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 250 µM
Pocillo 4: 576 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 2.5 µM
Pocillo 5: 576 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 25 µM
Pocillo 6: 576 µl de NB + B27(sin antioxidante) + 24 µl de compuesto de prueba 250 µM
Pocillo 7: 576 µl de NB + B27 (sin antioxidante) + 24 µl de diluyente del compuesto de prueba**
Pocillo 8: 600 µl de NB + B27 (sin antioxidante)

La placa de fármaco se incubó a 37 ºC durante 15 minutos. Se agregaron 200 µl de cada pocillo por triplicado a la placa de células correspondiente. La placa de células se incubó a 37 ºC durante 4 días (se probaron dos compuestos en cada placa de células)

* Medio NB + B27 (sin antioxidantes),
** Diluyente de PBT DMSO al 10% en NB + B27 (sin antioxidantes)

Al finalizar el ensayo se agregó un volumen 1/10 de MTS por cada pocillo de placa (es decir 25 µl/250 µl). Las placas se incubaron a 37 ºC durante 2 horas y después se leyó la absorbancia a 560 nm.

Ensayo 4. Ensayo de caspasa

Para medir la actividad de caspasa en cultivos neuronales, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con solución salina de control (pH 7.4) y se agregó tampón de extracción de células helado directamente a los

cultivos. El tampón de extracción consistía en Tris 20 mM (pH 7.4), sacarosa 1 mM, EDTA 0.25 mM, ditiotreitol 1 mM (DTT), PMSF 0.5 mM, Triton X-100 (Tx-100) al 1% y 1 µg/mL de pepstatina y aprotinina. Luego de la incubación durante 15 min en hielo, el tampón de extracción se retiró, se centrifugó durante 5 min a 4 ºC en una microcentrifuga y se agregaron 100 µl de sobrenadante a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se agregaron 100 µL de sustrato 200 µM (DEVD-pNA, VEID-pNA o IETD-pNA para caspasas 3, 6 y 8, respectivamente) a cada pocillo, para dar una concentración final de sustrato de 100 µM. Las placas se incubaron a 37 ºC durante 2, 4, 6 o 24 h y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 415 nm (Abs 415). La lectura de absorbancia se comparó con un estándar conocido de pNA solo.

Ensayo 5. Ensayo de anexina V

Para determinar el nivel de unión de anexina V a las células, se lavaron dos veces los cultivos con solución salina de control (pH 7.4) seguido de la adición de anexina V-FITC a una concentración de aproximadamente 0.5 µg/mL en solución salina de control (pH 7.4). También se agregó yoduro de propidio (10 µg/mL) a los cultivos al mismo tiempo. Las células se incubaron en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se lavaron tres veces con solución salina de control recién preparada. El análisis de fluorescencia FITC (ex. 488 nm, em. 510 nm) se realizó con un microscopio Leica DMIRB. Se tomaron fotografías con un accesorio de cámara Leica MPS 60 usando película en color ASA400, y los negativos se escanearon en Adobe Photoshop v2.0.1.

Ensayo 6. Ensayo de oxidación de lipoproteína

Se pueden usar dos ensayos diferentes de peroxidación lipídica mediada por metal. El primer ensayo implica medir la actividad oxidativa de proteínas metalizadas. Esta se determina mezclando proteína metalizada dializada o nativa (en las concentraciones indicadas) con 0.5 mg/mL de LDL durante 24 horas (37 ºC). La peroxidación lipídica (LPO) se mide utilizando un kit de ensayo de peroxidación lipídica (LPO 486, Oxis International Inc. Portland, OR) según las instrucciones del kit. El nivel de LPO se determina comparando la absorbancia (486 nm) con la de LDL sola (100% LPO). El segundo ensayo se usa para medir la actividad LPO de las proteínas nativas en presencia de Cu libre, no unido a proteínas. Esto implica agregar péptidos no metalizados (140 µM) a 0.5 mg/mL de LDL junto con Cu-gly 20 µM y determinar LPO como se hizo para las proteínas metalizadas. El nivel de LPO se determina comparando la absorbancia (486 nm) con la de LDL + Cu-gly (100% de LPO). Como control negativo, también se expone LDL a soluciones dializadas Cu-gly comparables a las utilizadas para metalizar con Cu las proteínas.

Ensayo 7. Citotoxicidad inducida por proteínas metalizadas con Cu

Se mezclan proteínas o péptidos sintéticos con soluciones de metal-glicina en una concentración equimolar o 2 veces la concentración de metal respecto a la concentración de proteína. Las mezclas de metal-proteína se incuban toda la noche a 37 ºC y después se dializan extensivamente (24 h contra dos cambios de dH_2O (3 L/cambio) a temperatura ambiente) usando vasos de minidiálisis con un corte a 3500 kilodalton (Pierce, Rockford, IL). La diálisis de las proteínas contra PBS de pH 7.4 resultó en proteínas metalizadas con actividad idéntica a la diálisis con dH_2O.

Para determinar sus efectos neurotóxicos, las proteínas metalizadas, las proteínas nativas o los péptidos se agregan a cultivos primarios de neuronas corticales de 2 días de antigüedad. Los cultivos también se exponen a Cu-gly (5 o 10 µM) o LDL. Los cultivos de control positivos se tratan con Cu-gly + LDL o el producto de LPO, 4-hidroxi-nonenol (HNE, Sigma Chemicals). Los cultivos se analizan para determinar la muerte celular con el kit de ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Molecular Biochemicals, Nunawading, Australia) según las instrucciones del fabricante.

Ensayo 8. Ensayo de naranja de acridina para pérdida de acidificación lisosómica mediada por Aβ.

Se tratan neuronas corticales de ratón cultivadas con Aβ1-42 (20 µM) durante 16 h y después se tiñen con naranja de acridina (NA) 5 mg/ml durante 5 min a 37 ºC. La fluorescencia inducida por NA se mide con un filtro rojo en un microscopio de fluorescencia. NA es una base débil lisosomotrópica que se acumula en los compartimientos endosómicos/lisosómicos y presenta fluorescencia naranja durante la incubación. La NA es secuestrada dentro de los lisosomas, mientras haya un gradiente de protones sustancial en las membranas lisosómicas. El tratamiento de las células con Aβ1-42 interrumpe el gradiente de protones de la membrana lisosómica y relocaliza la NA en el citosol, como se indica por la pérdida de fluorescencia naranja dentro de 16-24 h.

Ensayo 9. Ensayo de solubilización de amiloide de cerebro humano

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de evaluar la capacidad de un compuesto de prueba para movilizar Aβ desde la fase insoluble a la fase soluble de un extracto de tejido de un cerebro humano con EA *post mortem*.

Hasta 0.5 g de corteza que contenía placa sin meninges se homogeneizó usando un homogeneizador DIAX 900 (Heudolph y Co, Kelheim, Alemania) u otro dispositivo adecuado durante tres períodos de 30 segundos a toda

velocidad en hasta 2 ml de solución salina amortiguada con fosfato helada, pH 7.4. Para obtener la fracción extraíble con la solución salina amortiguada con fosfato, el homogeneizado se centrifugó a 100 000 x g durante 30 min y se eliminó el sobrenadante. Alternativamente, el tejido se liofilizó, después se pulverizó para formar un polvo que luego se pesó en alícuotas para extraer como se mencionó antes. Se retiró una alícuota de 10 µl del sobrenadante después de la centrifugación y se mezcló con un volumen igual de tampón de muestra 2XTris-Tricina SDS, pH 8.3, que contenía 8% de SDS y 10% de 2-mercaptoetanol. Después las muestras se calentaron durante 10 min a 90 ºC y se separaron por electroforesis en gel. La fracción insoluble de las muestras corticales se obtuvo resuspendiendo la muestra sedimentada inicial en 1 ml de solución salina amortiguada con fosfato. Después una alícuota de 50 µl de esta suspensión se llevó a ebullición en 200 ml de tampón de muestra como el indicado antes.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con Tris-Tricina se realizó cargando muestras apropiadamente diluidas en geles de gradiente de 10% a 20% (Novex, San Diego, CA) seguido de transferencia a una membrana de nitrocelulosa 0.2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA). Aβ se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal W02, que detecta residuos 5 a 8, 17 (u otro anticuerpo adecuado) junto con anti-IgG de ratón en conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Dako, Dinamarca) y se visualizó usando quimioluminiscencia potenciada (por ej. ECL; Amersham Life Science, Buckinghamshire, Reino Unido). Cada gel incluyó tres carriles que contenían 0.5, 1 y 2 ng de $A\beta_{40}$ sintético (Keck Laboratory, Yale University, New Haven, CT) como estándares de referencia.

Se escanearon las películas de transferencia usando un sistema de imagenología adecuado como el sistema de documentación en gel de UVP, y se realizó la densitometría usando un software adecuado, por ejemplo UVP Labworks. El rango dinámico de la película/el escáner se determinó usando una tabla escalonada (No. 911ST600, Kodak, Rochester NY), una película calibrada expuesta por el fabricante para proporcionar pasos de intensidad creciente conocida. El rango cuantificable de la intensidad de señal para el análisis densitométrico de las bandas de Aβ mono y diméricas se basó en la comparación con una curva obtenida por escaneo y densitometría de la tabla escalonada. Las muestras en las cuales la intensidad de señal es baja después del ensayo preliminar se pueden volver a ensayar usando patrones sintéticos de menor o mayor concentración.

Todas las muestras se analizaron varias veces y las diluciones y cargas de los geles se ajustaron para que estuvieran en la región cuantificable de la curva estándar. La Aβ insoluble estuvo compuesta por la fracción sedimentable derivada de la placa amiloide insoluble de las muestras corticales anteriores y la fracción soluble que contenía Aβ soluble monomérica y/u oligomérica.

Se corrieron varios geles por cada compuesto de prueba con un control de PBS incluido en cada gel. Cada gel contenía diversas concentraciones del compuesto de prueba. Se utilizó una prueba t de student para comparar la media del valor más alto obtenido por el compuesto de prueba para cada gel a cualquier concentración, con la media de los valores de PBS tomados de los múltiples geles. Por consiguiente se puede hacer una determinación de si el aumento promedio en la solubilización obtenido por cualquier compuesto de prueba es significativo en comparación con PBS solo. Los compuestos de prueba con una puntuación (+) son compuestos que lograron un aumento estadísticamente significativo en la solubilización de la placa con respecto a la de PBS solo. Un compuesto de prueba con una puntuación (-) es un compuesto que no logra un aumento estadísticamente significativo en la solubilización de la placa con respecto a la de PBS solo.

Ensayo 10. Partición de metal

Para analizar los efectos de la partición de diversos metales, incluidos zinc y cobre, después de la extracción de tejido cerebral en presencia de un compuesto de prueba, se prepararon fracciones solubles e insolubles de un extracto de tejido cerebral humano para el ensayo de solubilización de amiloide. Se analizaron los metales en las dos fracciones mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente luego del pretratamiento apropiado con ácido nítrico y/o peróxido de hidrógeno, en caso necesario.

Ensayo 11. Efecto de la administración de los compuestos de prueba sobre los depósitos de Aβ en animales transgénicos

Se dispone de modelos de ratón transgénicos para una serie de trastornos neurológicos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996); la enfermedad de Parkinson (Masliah et al., 2000); la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELA) (Gurney et al., 1994); la enfermedad de Huntington (Reddy et al., 1998); y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) (Telling et al., 1994). Encontramos que uno de los modelos transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, el ratón transgénico APP2576 (Hsiao et al., 1996) también tiene una alta incidencia de cataratas. Estos modelos animales son adecuados para probar los compuestos de la invención.

Se utilizaron ratones transgénicos de la cepa APP2576 (Hsiao et al., 1996). Se eligieron ratonas de 8 a 9 meses de vida y se dividieron en grupos para el tratamiento.

Las ratonas se sacrificaron a intervalos, y se examinaron sus cerebros para determinar si el tratamiento con los

compuestos de prueba había disminuido la formación de amiloide en el cerebro, y la identificación del protocolo de administración más eficaz. Se determinaron los niveles de Aβ soluble e insoluble en el cerebro y el suero, utilizando inmunotransferencias tipo Western calibradas según la metodología descrita para el ensayo 9. Ensayo de solubilización del amiloide cerebral.

Se analizaron otras ratonas de cada grupo durante un período de hasta ocho meses respecto al desempeño cognitivo, utilizando un laberinto acuático de Morris según métodos estándar. Un operador a ciegas midió cada día la salud general y el bienestar de los animales, utilizando una escala de cinco puntos enteros que califica subjetivamente una combinación de características, que incluyen actividad motora, alerta y signos de salud general.

Ensayo 12. Propiedades fisicoquímicas

Cálculos de superficie polar (SP)

Los valores de superficie polar se calcularon usando el programa basado en la web disponible a través de "Molinspiration", un paquete para el cálculo de propiedades moleculares.

Mediciones turbidimétricas de solubilidad

La solubilidad estimada se midió tanto a pH 2.0 como a pH 6.5. Estos valores están dentro del intervalo de pH que se puede prever a lo largo del tracto gastrointestinal proximal en los seres humanos.

Los compuestos se disolvieron en DMSO a concentraciones adecuadas y luego se agregaron en concentraciones conocidas a HCl 0.01 M (pH aprox. = 2.0) o a tampón isotónico de fosfato de pH 6.5, la concentración final de DMSO fue de 1%. Luego las muestras se analizaron por nefelometría para determinar un rango de solubilidad. [según D. Bevan y R. S. Lloyd, Anal. Chem. 2000, 72,1781, 1781-1787].

Valores de cLog P

Se determinaron los valores de Log P teóricos usando el software de ACD Log P. Los valores citados se calcularon a partir de una base de datos sin entrenamiento y se refirieron a las especies no ionizadas.

Ensayo 13. Penetración de la barrera hematoencefálica

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO y se les agregó solución salina amortiguada con fosfato (PBS) para obtener soluciones a una concentración de 50 µM en PBS con 1.25-2.5% de DMSO. Se agregaron trazas de ^{14}C-sacarosa a cada solución madre de infusión (aprox. 0.01 µCi/mL) para que actuara como marcador impermeable de la barrera hematoencefálica (BHE) para evaluar la integridad de la BHE durante cada perfusión y para estimar el volumen del espacio vascular residual (EVR) en muestras de tejido cerebral (es decir el volumen de líquido remanente dentro del lumen de los vasos sanguíneos al final de cada perfusión).

Se anestesiaron ratas Sprague Dawley macho adultas (180-190 g) con inyecciones intraperitoneales de uretano (25% p/v) a una dosis de 1.0 mL/100 g de peso corporal. Se expuso quirúrgicamente la arteria carótida común derecha y se canuló para perfusión de la circulación cerebral. Después la arteria carótida externa derecha (que abastece a los tejidos fuera del cráneo) se ligó distal a su bifurcación de la arteria carótida común derecha para que toda la solución de infusión pasara al cerebro a través de la arteria carótida interna derecha remanente. Después se expuso el corazón y se seccionó transversalmente inmediatamente antes del comienzo de la infusión. La velocidad de la infusión se controló mediante una bomba para que administrara 3.2 mL/min (aprox. 85% del suministro normal de sangre al cerebro para este tamaño de rata). La cánula de infusión contenía inicialmente un prelavado de 0.5 mL de PBS heparinizada (10 UI/ml) cuya función es enjuagar los vasos sanguíneos y evitar que la sangre coagule y bloquee los vasos pequeños.

Después de 1.5 minutos, la bomba de infusión se detuvo automáticamente, se retiró la cánula de la arteria carótida y luego se recogió una muestra de la solución de infusión (1-1.5 mL) de la punta de la cánula de infusión. Después se separó el cerebro por disección y se dividió en 3 partes; el hemisferio derecho junto con el mesencéfalo derecho, el hemisferio izquierdo junto con el mesencéfalo izquierdo y el cerebelo (cerebelo, puente de Varolio y tronco encefálico). Sólo la parte derecha del cerebro se usó para las mediciones sucesivas porque la perfusión a través de la arteria carótida interna derecha abastece preferencialmente al hemisferio derecho y al mesencéfalo derecho (el hemisferio izquierdo y el cerebelo reciben una perfusión colateral variable). Las muestras de tejido cerebral de cada animal se congelaron a -30° C, se analizaron alícuotas, homogeneizadas y pesadas, por LC-MS para obtener la concentración cerebral total. El análisis se llevó a cabo usando el instrumento Micromass Triple Quad. La fase móvil consistió en un gradiente de acetonitrilo/agua (que contenía ácido fórmico al 0.05%) y la columna fue una Phenomenex Luna CN.

Se analizaron pequeñas alícuotas de cada muestra de tejido cerebral y la solución de infusión correspondiente mediante recuento de centelleo líquido para determinar el nivel de ^{14}C-sacarosa. El espacio vascular residual (EVR) en cada muestra de tejido del cerebro se calculó dividiendo la concentración medida de sacarosa en el tejido cerebral (dpm/mg) entre su concentración en la solución de infusión correspondiente (dpm/µL). Este es el volumen de líquido que permanece dentro de los vasos sanguíneos al final de cada perfusión. Multiplicando este EVR por la concentración del compuesto de prueba en la solución de infusión se obtiene la cantidad residual total de compuesto de prueba que está presente dentro de los vasos sanguíneos en cada muestra de tejido cerebral (es decir: lo que no cruzó la BHE). Restando esto de la concentración cerebral total se obtiene la cantidad de fármaco en cada muestra de tejido cerebral que está fuera de los vasos sanguíneos (es decir: que cruzó la BHE). Dividiendo esta concentración cerebral corregida por el EVR se obtiene el coeficiente de absorción cerebral (ecuación 1).

Ecuación 1

$$\text{Coef. de absorción cerebral} = \frac{[\text{cerebro ng.mg}^{-1}] - [\text{EVR ng.µl}^{-1}]}{[\text{solución de infusión ng.µL}^{-1}]}$$

Se realizaron en total 5 a 6 experimentos de perfusión cerebral para cada uno de los compuestos de prueba y se calcularon coeficientes medios de absorción cerebral.

Los coeficientes mayores a 50% indican compuestos que entran en el cerebro extremadamente rápido; los coeficientes entre 10 y 50% indican compuestos que entran en el cerebro bien; los coeficientes menores de 10% (no observados) indicarían compuestos que entran muy lentamente en el cerebro y no serían adecuados para la administración terapéutica; los coeficientes menores de 1% (no observado) indicarían compuestos que están efectivamente excluidos del cerebro.

Ensayo 14. Inmunohistoquímica de cerebro de ratón transgénico

En este ensayo se utilizó el ratón transgénico APP2576 (Hsiao et al., 1996) al que se hace referencia en el ensayo 11. Se cortó coronariamente el tejido contralateral cerebral de ratón fijado con formalina. Se tomaron cortes (10 µm) de los sitios correspondientes y se trataron con ácido fórmico al 80% para recuperar el antígeno. El anticuerpo primario utilizado fue el anticuerpo monoclonal 1E8, que reconoce epítopos entre los residuos 18 y 22 de Aβ (SmithKline Beecham, Reino Unido). Se desarrolló inmunorreactividad con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano (usando un cromógeno 3,3'-diaminobencidina) (Dako) y fosfatasa alcalina (usando fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo y cromógeno cloruro de nitroazul de tetrazolio) (Dako). La abundancia de placa por corte fue evaluada por dos operadores a ciegas respecto al tratamiento, según la escala siguiente:

0 = no hay placas aparentes
1 = placas presentes pero muy escasas
2 = varias placas presentes
3 = numerosas placas visibles en zonas restringidas
4 = placas abundantes y no restringidas a ningún área en particular.

Cuando correspondió se asignaron valores intermedios por ejemplo 2.5. Se usó la prueba t de student para comparaciones entre grupos.

Ensayo 15. Perfil farmacocinético

- Se administró infusión intravenosa de compuesto de prueba a 2 ratas; 2 mg/kg en un vehículo adecuado y se tomaron muestras de sangre arterial hasta 24 horas después.
- Se realizó la administración oral del compuesto de prueba a 2 ratas; 30 mg/kg en un vehículo adecuado a través de sonda nasogástrica y se tomaron muestras de sangre arterial hasta 24 horas después.
- Se determinaron las concentraciones plasmáticas del compuesto de prueba por un método analítico adecuado.

Cálculos:

$$CL_{total} = \frac{\text{Dosis}_{IV}}{AUC_{IV}} \qquad V_{d\beta} = \frac{CL_{total}}{\beta} \qquad BA(\%) = \frac{AUC_{oral} * \text{Dosis}_{IV}}{AUC_{IV} * \text{Dosis}_{oral}}$$

CL_{total} = depuración plasmática total después de la administración IV
$V_{d\beta}$ = volumen de distribución durante la fase de eliminación después de la administración IV
BA = biodisponibilidad oral
AUC_{IV} = área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito después de la administración IV
AUC_{oral} = área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito después de la administración oral
β = constante de velocidad de eliminación terminal después de la administración IV

Ensayo 16. Determinación de los niveles plasmáticos de los compuestos de prueba en el ratón

PBT 1061

La administración oral a cuatro ratones de PBT 1061 a una concentración de 30 mg/kg como una suspensión en Na-carboximetilcelulosa (CMC), se realizó por sonda nasogástrica. Dos ratones se sacrificaron 30 minutos después de la administración y dos ratones se sacrificaron 60 minutos después de la administración. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y el plasma se separó por centrifugación.

Se determinó la concentración de PBT 1061 por LC/MS usando el instrumento ZQ. La fase móvil consistió en un gradiente de acetonitrilo (ACN)/agua (que contenía ácido fórmico al 0.05%) y la columna fue una columna Phenomenex Polar-RP 4 µM 80A (50 x 2 mm) .

Las muestras de plasma de ratón se inyectaron directamente luego de la precipitación de proteína con ACN. El método analítico en plasma fue lineal en el rango de 125 a 10 000 ng/ml (R^2 = 0.9992). Se utilizó diazepam como estándar interno. La recuperación de PBT 1061 del plasma fue ~ 100%.

La concentración de PBT1061 en plasma de ratón después de la administración oral de 30 mg/kg se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de PB1061 en plasma de ratón después de la administración oral de 30 mg/kg

ID del ratón	Dosis (mg/kg)	Tiempo (min)	Conc. (ng/ml)
2703	30	30	1826.61
2743	30	30	5475.88
2740	30	60	1115.24
2801	30	60	2417.55

Tabla 3

Ensayo	Ensayo 1	Ensayo 9	Ensayo 3(d)	Ensayo 3(c)	Ensayo 12	Ensayo 12	Ensayo 12	Ensayo 12	Ensayo 16	Ensayo 13
	Peróxido CI_{50} (μM)	Solubilización de amiloide cerebral[a]	Citotoxicidad (% de viables a 1 y 10 μM)	Neuroprotección (% de inhibición de toxicidad de Abeta)	clogP	Superficie polar (SP)	Solubilidad a pH 6.5	Solubilidad en HCl 0.01 M, pH 2.0	Concentración plasmática en ratones	Perfusión cerebral en rata
PBT - 1055	0.75		98, 67	29	3.33	52.9	3-6.3 μg/mL	3-6.3 μg/mL		Entre 10 y 50%
PBT - 1061	0.45	(+)	91, 77	16	2.11	52.9	12.5-25 μg/mL	3,1-6.2 μg/mL	Referirse a Tabla 1	>50%
PBT - 1049	1.60		92, 87	11	0.49					
PBT - 1067	0.95		103, 89		1.12	61.7	25-50 μg/mL	12.5-25 μg/mL		

a (+) = eficaz en la solubilización de placas a más de 1 concentración con respecto a PBS, (-) = no eficaz en la solubilización de placas con respecto a PBS.

Ejemplo 6 - Ensayo clínico del compuesto para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Ejemplo de referencia)

Se llevó a cabo un ensayo clínico de fase II para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer a fin de estudiar los efectos del tratamiento con PBT-1 oral en un ensayo clínico piloto aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de fase 2 de pacientes con EA moderadamente grave. Se distribuyeron al azar 36 sujetos [18 placebo y 18 PBT-1, 32 completaron el ensayo], y se estratificaron en grupos de más y menos gravemente afectados. El efecto del tratamiento fue estadísticamente significativo para prevenir el deterioro cognitivo en 36 semanas en los pacientes más gravemente afectados (valor inicial de ADAS-cog ≥ 25). El desempeño del grupo de los menos gravemente afectados (ADAS-cog < 25) se deterioró insignificantemente en este intervalo, por lo tanto los cambios cognitivos no se pudieron discriminar en este estrato. El nivel de $A\beta_{42}$ plasmático declinó en el grupo de PBT-1 pero aumentó en el grupo del placebo ($p<0.001$). Los niveles plasmáticos de Zn aumentaron significativamente (≈30 %) en el grupo de PBT-1.

Dosificación

Varias consideraciones dirigieron la elección de la dosis. En estudios previos en ratones transgénicos, dosis de 20-30 mg/kg of PBT-1 por vía oral diariamente durante 5 días por semana fueron notablemente eficaces para inhibir la acumulación de Aβ luego de 2 a 3 meses de tratamiento. La dosis humana equivalente de 1500-2250 mg/día es próxima a la dosis prescrita de PBT-1 como antibiótico (600 mg po qid). Sin embargo, esta magnitud de dosis administrada durante meses, plantearía problemas acerca de la toxicidad de NMOS.

La dosis inicial de 3.3 mg/kg/día, suponiendo 75 kg de peso promedio, es del mismo orden de magnitud que la dosis eficaz en el modelo de ratón transgénico, pero sólo una décima parte de la dosis del antibiótico.

Como no se cuenta con datos del estudio de ratones transgénicos acerca de la eficacia de dosis menores a 20 mg/kg/día, razonamos que un efecto beneficioso podría requerir un período de tratamiento más prolongado que las 9-12 semanas de duración del estudio en ratones (Cherny et al., 2001). Por consiguiente se eligió una duración del ensayo de 36 semanas con una dosis promedio que es aproximadamente un tercio de la dosis eficaz en los ratones transgénicos. La dosis final de 10 mg/kg/día es la mitad de una dosis eficaz en ratones.

La dosis inicial de 3.3 mg/kg/día fue del mismo orden de magnitud que la dosis eficaz en el modelo de ratón transgénico, pero sólo una décima parte de la dosis antiinfecciosa. El estudio se impulsó para detectar efectos bioquímicos sobre los niveles de metales y Aβ que serían de la misma magnitud que los observados en el estudio transgénico.

Procedimientos experimentales

Temas éticos: En cumplimiento de las leyes australianas referentes al consentimiento por parte de individuos cuya función cognitiva podría estar deteriorada al extremo de ser incapaces de tomar decisiones o hacer juicios informados, se obtuvo un “Consentimiento para procedimientos especiales” administrado por el Tribunal Victoriano Civil y Administrativo para cada participante que no fue capaz de otorgar el consentimiento por sí mismo. Además, se obtuvo el consentimiento de terceros de todos los cuidadores. Todos los sujetos se estabilizaron con donepezilo antes de comenzar el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de ética e investigación clínica de la Royal Melbourne Hospital Research Foundation.

Población de estudio: El estudio tuvo lugar en la unidad de ensayos clínicos de EA, en el Mental Health Research Institute of Victoria y en el Royal Melbourne Hospital. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: consentimiento informado; un diagnóstico de probable EA según los criterios NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 1984); una puntuación de 18 a 45 en la Escala de evaluación cognitiva de la EA (ADAS-cog) (Rosen et al., 1984); una puntuación de 10 a 24 en el Mini examen del estado mental (MMSE) (Folstein et al., 1975); haber tomado donepezilo 5 mg o 10 mg durante al menos 6 meses; pariente o cuidador dispuesto y capaz de respaldar el ensayo; capacidad de completar los exámenes del ensayo; funciones sensoriales primarias intactas.

Los pacientes fueron excluidos si tenían antecedentes o evidencia clínica de neuropatía periférica u óptica o tenían enfermedades coexistentes o antecedentes que pudieran haber afectado su función cognitiva, la conducción nerviosa o enfermedades que pudieran haber confundido el perfil de efectos adversos. Los factores siguientes se obtuvieron al inicio para determinar si se correlacionaban con las mediciones de los resultados: edad, género, IQ premórbido [evaluado con la prueba nacional de lectura para adultos (NART)], años de escolaridad, y apolipoproteína alotipo E (ApoE).

Diseño del estudio: Se trató de un diseño aleatorizado, doble ciego, con grupo paralelo, controlado con placebo. Se seleccionó a 36 pacientes y sus cuidadores para participar y a los pacientes se les asignó aleatoriamente en una relación 1:1 recibir PBT-1 o placebo. La duración del estudio fue de 36 semanas. La dosis oral de PBT-1 fue de 125

mg dos veces al día en las semanas 0 a 12, se incrementó a 250 mg dos veces al día en las semanas 13 a 24, y finalmente, 375 mg dos veces al día en las semanas 25 a 36.

Procedimientos del estudio: Los procedimientos de evaluación selectiva consistieron en una historia clínica completa, un examen físico, neurológico y oftálmico, hemograma y análisis de orina y pruebas psicométricas (ADAS-cog, MMSE). Se llevaron a cabo pruebas de conducción nerviosa y respuesta evocada visual entre las visitas de evaluación selectiva e inicial para proporcionar una medida inicial. Se extrajo sangre para la alotipificación de ApoE, los niveles plasmáticos iniciales de metales y Aβ antes de la asignación aleatoria. Todos los pacientes continuaron con la dosis de donepezilo que tenían al ingresar al estudio y todos los pacientes recibieron 100 mg de vitamina B_{12} intramuscular cada cuatro semanas.

Se extrajeron muestras de sangre mediante venopunción antecubital excepto las semanas 12, 24 y 36 en que se extrajeron mediante catéter implantado. El cambio de procedimiento no afectó las lecturas bioquímicas excepto para los niveles de Zn que se encontró que estaban consecuentemente deprimidos ~10% (probablemente como resultado de diferencias en la activación de las plaquetas). Por consiguiente, los datos de Zn para esos intervalos se omitieron en el análisis.

Medidas de resultado: La variable primaria de eficacia clínica fue un cambio desde el valor inicial en la puntuación de ADAS-cog que se llevó a cabo al inicio y en las semanas 4, 12, 24 y 36. Esta medida se eligió para permitir la comparación de los efectos del tratamiento con medicamentos actuales como donepezilo, para el que los ensayos de eficacia también utilizaron ADAS-cog como medida primaria de resultado (Rogers et al., 1998). Aunque numerosas pruebas neuropsicológicas se pueden considerar como medidas secundarias, fue necesario evitar fatigar a los sujetos en las revisiones. Por lo tanto, la única otra prueba cognitiva fue el Mini examen del estado mental (MMSE). También se realizó una CIBIC+ (entrevista clínica basada en la impresión de cambio que incorpora información del cuidador), un índice de observación subjetivo. Se determinaron los niveles plasmáticos de Aβ, y los niveles plasmáticos de zinc y cobre cada cuatro semanas.

Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima con doble captura de anticuerpo (ELISA) para la detección de *A*β: Se recubrieron placas de poliestireno con mAb G210 (para Aβ40) o mAb G211 (para Aβ42). Las placas se lavaron y se les agregó mAb WO2 biotinilado. El anticuerpo unido se detectó con Europio marcado con estreptavidina (Perkin Elmer, Vic Australia). Se calcularon los valores obtenidos de pocillos por triplicado basándose en curvas estándar generadas en cada placa. Luego se ensayaron muestras plasmáticas complementadas con Aβ1-40 y Aβ1-42 sintéticos para confirmar la confiabilidad de la medición en todo el rango de concentración de interés.

Niveles de metales: Los metales se midieron por espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado como se describió previamente (Cherny et al., 2001).

Control farmacológico: En las semanas 12, 24 y 36, se analizaron las concentraciones sanguíneas de PBT-1 por HPLC con estudios de validación adecuados (Centre for Pharmaceutical Research, University of South Australia).

Medidas de seguridad: Se llevó a cabo un informe estándar de eventos adversos y en cada visita se documentaron las pruebas bioquímicas, el funcional renal y hepático, el hemograma completo, y los niveles séricos de vitamina B_{12} y folato. Para evaluar la neuropatía periférica y óptica se realizó un examen neurológico en cada visita y se realizaron estudios de respuestas evocadas visuales, conducción nerviosa y examen oftálmico en la visita de evaluación selectiva, la visita de la semana 16 y antes de la visita final. Se hizo un ECG en la evaluación selectiva y en las semanas 12, 24 y 36.

Preparación de datos y análisis estadístico: El monitoreo y el manejo de los datos fueron realizados por contratistas independientes (Kendle International and Health Research Solutions, Melbourne). La evidencia de eficacia fue indicada por una diferencia significativa en el cambio respecto a los valores iniciales entre los grupos de tratamiento. El análisis de varianza fue el método principal de evaluación de la significación estadística siendo la gravedad de la enfermedad del grupo de tratamiento al inicio el factor principal del diseño. Se introdujeron covariables potencialmente significativas cuando fue necesario. Se analizaron las diferencias entre grupos en las medidas de categorización usando métodos estadísticos exactos para maximizar la potencia. Basándose en la suposición de una correlación de 0. 60 entre ocasiones de medición, la potencia estadística para detectar un efecto de una desviación estándar de diferencia en el cambio entre los grupos desde el inicio hasta la semana 36 habría sido aproximadamente el 80% si se hubieran incluido 15 sujetos por grupo. Como se había observado una tasa de deserción del 15% en poblaciones similares, se incluyeron 18 pacientes en cada grupo.

Resultados

Inclusión de sujetos y demografía: Se incluyeron 36 sujetos en un período de 12 meses comenzando en abril de 2000 (Fig. 1). De esos, 32 tuvieron datos suficientes para análisis por protocolo. Se perdieron 2 sujetos de cada grupo.

El factor gravedad de la enfermedad al inicio se creó, como se había planificado, mediante división de la muestra en 2 grupos en la mediana de la puntuación ADAS-cog al inicio (valores <25, ≥25), separando los grupos en menos gravemente y más gravemente afectados (n = 8 y 8 en el grupo de tratamiento y n = 7 y 9 en el grupo del placebo, respectivamente).

Los grupos no difirieron en los parámetros demográficos, biológicos y clínicos al inicio (Tabla 4), salvo por el grupo de tratamiento que tenía una media de IQ premórbido mayor que el grupo del placebo según se estimó usando NART (111.4 en comparación con 104.9; t(30) = 2.27, p = 0.031) y un menor nivel de hormona estimulante de la tiroides (TSH) (1.14 en comparación con 2.00 mU/L; t(30) = 4.400, p<0.001). NART y TSH se incorporaron provisionalmente más tarde en el análisis como covariables pero no se encontró que fueran significativas en ningún análisis.

Efectos clínicos: Los cambios respecto a los valores iniciales en la puntuación de ADAS-cog en las semanas 4, 12, 24 y 36 desde el inicio se sometieron a análisis de varianza de 2 vías con factores del grupo de tratamiento y gravedad de la enfermedad al inicio. Las medias de los cambios en la puntuación de ADAS-cog mostraron un mayor deterioro en el grupo tratado con placebo en cada intervalo de examen, en comparación con el grupo tratado con PBT-1 (Fig. 2A). Esta tendencia se acerca a la significación estadística en la semana 4 [F(1,28) = 3.55, p = 0.070] y la semana 24 [(F(1,28) = 3.31, p = 0.080] (Fig 2A). Como se planificó en el protocolo, se examinó el efecto de gravedad de la enfermedad por estratificación de la muestra en sujetos menos o más gravemente afectados (valores de ADAS-cog al inicio <25, ≥25). Las pruebas de efectos simples dentro del nivel de gravedad mostraron la tendencia en los grupos combinados de ser separables en resultados no significativos para el estrato menos grave en todas las semanas y diferencias significativas en el estrato más graves en la semana 4 [F(1,28) = 7.73, p = 0.010] y la semana 24 [F(1,28) = 6.63, p = 0.016] (Fig 2B). Esta tendencia se mantuvo en la semana 36 pero escapó por poco de la significación estadística [F(1,28) = 3.62, p = 0.068]. En los grupos más gravemente afectados, la diferencia en el cambio medio respecto a los valores iniciales en la puntuación de ADAS-cog de PBT-1 en comparación con el placebo en las semanas 24 y 36 fue una diferencia de 7.37 (95% CI: 1.51 - 13.24) y 6.36 (95% CI: -0.50 - 13.23) respectivamente (Fig 2B).
Efectos sobre los niveles plasmáticos de Aβ, Zn y Cu*:* Al inicio, no hubo diferencias significativas en los niveles plasmáticos de $A\beta_{42}$ entre los grupos de tratamiento o los estratos de gravedad. La varianza en niveles individuales al inicio en $A\beta_{40/42}$ plasmático fue grande y resultó en una menor potencia del estudio para detectar cualquier diferencia significativa en los cambios medios entre grupos. Sin embargo, la referencia de niveles individuales de Aβ respecto a niveles de referencia el inicio disminuyó notablemente la varianza, y reveló efectos significativos del tratamiento. Aβ42 plasmático mostró una disminución significativa desde el inicio en el grupo tratado con PBT-1 desde la semana 20 en adelante; en el mismo tiempo, $A\beta_{42}$ plasmático en el grupo del placebo aumento (Fig 3A). Como se demostró antes la estratificación por gravedad de la enfermedad demostró que los cambios fueron evidentes sólo en los menos gravemente afectados (Fig. 3B).

La administración de PBT-1 se asoció a un aumento significativo (≈30%) de Zn plasmático total (Fig 4A) pero no tuvo efecto en el Cu plasmático (Fig 4B). Los niveles medios iniciales de Zn (9.4 µM) en los grupos de EA combinados estuvieron por debajo de los valores normativos relacionados con la edad (Wood y Zheng, 1997). El aumento de Zn plasmático inducido por el tratamiento con PBT-1 representó por consiguiente una normalización de los niveles. En contraposición, los niveles medios iniciales de Cu (13.1 µM) estuvieron dentro del rango normativo relacionado con la edad (Rahil-Khazen et al., 2000). La correlación de los niveles plasmáticos de $A\beta_{42/40}$ con los niveles de Zn/Cu analizados en las mismas ocasiones o en ocasiones subsiguientes no mostró asociaciones significativas.

Un resultado importante del tratamiento de los sujetos que padecen EA con PBT-1 ee el aumento paradójico en el Zn plasmático (Fig. 4A), que es compatible con una restauración en la comunicación mediada por ZnT3 del zinc sináptico con la sangre. Esto también indica que en contraste con un quelante metálico típico como desferrioxamina, el mecanismo de acción de PBT-1 a esta dosis no es el de un quelante grosero de tejido. La afinidad relativamente débil de PBT-1 por los metales parece ser insuficiente para causar un marcado agotamiento sistémico de metales en presencia de un equilibrio reestablecido de la homeostasis de metales.

Concentraciones sanguíneas de PBT-1: Los niveles en el estado estacionario pre administración de PBT-1 a dosis diarias totales de 250, 500 y 750 mg fueron 4.03 ± 2.10, 6.74 ± 3.70, 7.60 ± 2.15 µg/ml, respectivamente, y no mostraron correlaciones significativas con ADAS-cog, niveles de metales o Aβ, analizados en las mismas ocasiones o en ocasiones subsiguientes.

Tabla 4 - Demografía al inicio y variables clínicas clave

Variable	Muestra total	Grupo de Clioquinol	Placebo	Valor de P
	(n = 32)	**(n = 16)**	**(n = 16)**	
Media de la edad (DE; mín-máx)	72.50 (8.37; 56-87)	73.19 (8.61; 58-87)	71.81 (8.35; 56-87)	P=0.65†
Género (n; masculino en%)	17 (53.1%)	8 (47.1%)	9 (52.9%)	P=1.00‡
Estado de ApoE				
ApoE4 heterocigoto n (%)	15 (46.9%)	7 (43.8%)	8 (50.0%)	P=1.00‡
ApoE4 homocigoto n (%)	3 (9.4%)	2 (12.5%)	1 (6.3%)	
IQ premórbido estimado media de NART, (DE; mín-máx)	108.1 (8.86; 91-124)	111.4 (8.04; 94-121)	104.9 (8.26; 91-124)	P=0.03†
ADAS-Cog	26.31 (7.27; 15-46)	25.56 (7.67; 15-46)	27.06 (7.01; 19-41)	P=0.57†
Media de edad del primer diagnóstico (DE; mín-máx)	70.09 (7.98; 54-83)	70.88 (8.50; 57-83)	69.31 (7.61; 54-83)	P=0.59†
Media de la duración de la enfermedad (años) (DE; mín-máx)	2.41 (1.19; 1-5)	2.31 (1.08; 1-4)	2.56 (1.32; 1-5)	P=0.66†
† Prueba t muestra independiente (todas las pruebas 30 *df*) ‡ Prueba bilateral exacta.				

References cited in the description and examples are listed on the following pages, and are incorporated herein by this reference.

REFERENCES

Atwood et al., J. Biol. Chem., 1998, 273(21), 12817-12826.

Beyreuther K, Christen Y, Masters CL (eds) Neurodegenerative Disorders: Loss of Function Through Gain of Function. Springer. Berlin. 2001. 189pp.

Brower V. Harnessing the immune system to battle Alzheimer's: Some of the most promising approaches to fight Alzheimer's diseases aim to develop vaccines. EMBO Rep 2002;3:207-9.

Bush AI, Masters CL. Clioquinol's return. Science 2001; 292:2251-2252.

Bush AI. Therapeutic targets in the biology of Alzheimer's disease. Current Opinion in Psychiatry 2001; 14:341-348.

Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. Neuron 2001; 30:665-676.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Haines, J. L., and Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in the late onset familial disease. Science 261, 921-923.

Curtain, C.C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R.A., Norton, R.S., Beyreuther, K., Barrow, C.J., Masters, C.L., Bush, A.I., and Barnham, K.J. (2001) Alzheimer's disease amyloid β binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. J. Biol. Chem. 276, 20466-20473.

Czech, C., Forstl, H., Hentschel, F., Monning, U., Besthorn, C., Geigerkabisch, C., Sattel, H., Masters, C., and Beyruether, K. (1994) Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 243, 291-292.

Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller. P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann. K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β-amyloid peptides Aβ 42 and Aβ 40 in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 5856-5861.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J. Psychiatr. Res. 1975; 12:189-198.

Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H., and Austen, B. M. (1999) The role of cholesterol in the biosynthesis of b-amyloid. NeuroReport 10, 1699-1705.

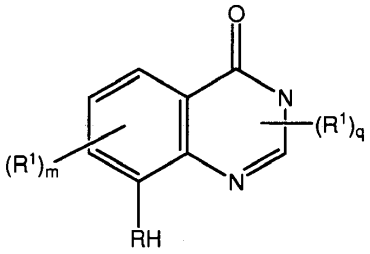
Friedhoff, L. T., Cullen, E. I., Geoghagen, N. S., and Buxbaum, J. D. (2001) Treatment with controlled-release lovastatin decreases serum concentrations of human β-amyloid (Aβ) peptide. Int. J. Neuropsychopharmacol. 4, 127-130.

Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Berthelette P., Blackwell C., Carr T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnsonwood K., Khan K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah

E., Mcconlogue L., Montoyazavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J., NATURE , 1995, 373 (6514): 523-527.
Golstein, H. and Schaaf, E., Helv. Chim. Acta, 1957, 57(23), 132.
Gurney M.E., Pu H.F., Chiu A.Y., Dalcanto M.C., Polchow C.Y., Alexander D.D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y.W., Deng H.X., Chen W.J., Zhai P., Sufit R.L., Siddique T., SCIENCE, 1994, 264 (5166): 1772-1775.
Hartmann, T. (2001) Cholesterol, Aβ and Alzheimer's disease. Trends Neurosci. 24,S45-S48.
Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice SCIENCE; 274(5284):99-102.
Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA et al. The Aβ peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. Biochemistry 1999; 38:7609-7616.
Iyer, R.N. and Dhar, M.L., J. Sci. Ind. Res., 1956, 15C, 1-7.
Ji, S. R., Wu, Y., and Sui, S. F. (2002) Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of β-amyloid peptide (Aβ 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. J. Biol. Chem. 277,6273-6279.
Lee J-Y, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh J-Y. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2002: Early edition.
Lee, S.J., Konishi, Y., Yu, D.T. et al, J. Med. Chem.,1995, 38, 3547-3557.
Linderberg, M., Hellberg, S., Bjork, S. et al, Eur. J. Med. Chem., 1999, 34, 729-744.
Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagara Y., Sisk A., Mucke L., SCIENCE, 2000, 287 (5456): 1265-1269.
McKhann G, Drachman D, Folstein MF, Katzman R, Price D, Stadlen E. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology 1984; 34:939-944.
Nunan, J., and Small, D. H. (2000) Regulation of APP cleavage by α-, β- and δ-secretases. FEBS Lett. 483, 6-10.
Petersen, R.C, Stevenas, J.C., Ganguli, M., Tangalos, E.G., Cummings, J.L., and DeKosky, S.T. Practice parameter: Early detection of dementia: Mild cognitive impairment Neurology 2001 56 1133-1142.
Reddy P.H., Williams M., Charles V., Garrett L., Pike-Buchanan L., Whetsell W.O., Miller G., Tagle D.A., NATURE GENETICS, 1998, 20 (2): 198-202.
Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. Donepezil Study Group. Neurology 1998; 50:136-45.
Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's disease. Am J Psychiatry 1984; 141:1356-64.
Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandervert, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid-β attenuates Alzheimer's disease like pathology in the PDAPP mouse. Nature 400, 173-177.
Selkoe, D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. Physiol Rev 81 (2): 741-766.
Shearman MS, Beher D, Clarke EE et al. L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid β-protein precursor β-secretase activity. Biochemistry 2000; 29:8698-704.
Shiraki, H. The neuropathology of subacute myelo-optico-neuropathy (NMOS) in the humans: With special reference to the quinoform intoxication. Jpn J Med Sci Biol 1975; 28 (suppl): 101-164.
Simons M, Schwärzler F, Lütjohann D et al. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: a 26-week randomised, placebo-controlled, double-blind trial. Ann of Neurol In Press.
Sinha S, Anderson JP, Barbour R et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein β-secretase from human brain. Nature 1999;402:537-40.
St George-Hyslop, P.H. (2000) Molecular genetics of Alzheimer's disease. Biol. Psychiatry 47, 183-199.
Telling G.C., Scott M., Hsiao K.K., Foster D., Yang S.L., Torchia M., Sidle K.C.L., Collinge J., Dearmond S.J., Prusiner S.B., PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA,11 Oct 1994, 91 (21): 9936-9940.
Tani, J., Yamada, Y., Oine, T. et al, J. Med. Chem., 1979, 22, 95-99.
Valdez-Gonzalez, T., Inagawa, J., and Ido, T. (2001) Neuropeptides interact with glycolipid receptors: a surface plasmon resonance study. Peptides 22; 1099-1106.
White et al., J Neuroscience, (1998) 18, 6207-6217.
Yassin MS, Ekblom J, Xilinas M, Gottfries CG, Oreland L. Changes in uptake of vitamin B(12) and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. J Neurol Sci 2000; 173:40-44.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de fórmula Ia, sus sales, hidratos, solvatos, tautómeros, isómeros geométricos y/o estereoisómeros en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento, el mejoramiento y/o la profilaxis de las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer:



Ia

en el cual

R es O o S;

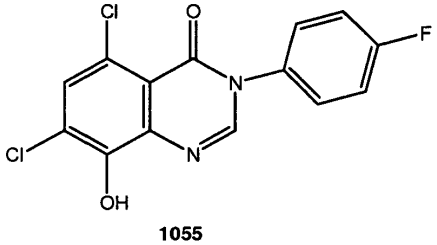
R^1 se elige independientemente entre H, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6}alquenilo opcionalmente sustituido; C_{2-6}alquinilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido; heterociclilo opcionalmente sustituido; CN; alo; CF_3; SO_3H; y OR^2, SR^2, SOR^2, SO_2R^2, NR^2R^3, $(CH_2)_nNR^2R^3$, $HCNOR^2$, $HCNNR^2R^3$, $CONR^2R^3$, $CSNR^2R^3$, $NCOR^2$, CSR^2, COR^2, CO_2R^2, CSR^2 o $SO_2NR^2R^3$ donde R^2 y R^3 se eligen independientemente entre H, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6}alquenilo opcionalmente sustituido; C_{2-6}alquinilo opcionalmente sustituido; arilo opcionalmente sustituido o heterociclilo opcionalmente sustituido y n es un número entero de 1 a 10; m es un úmero entero de 1 a 3; y q es un número entero de 1 a 2, donde el sustituyente opcional es C_{1-6}alquilo, CF_3, F, Cl, I, ciano, C_{1-6}alcoxi, arilo o heterociclilo; y donde arilo es un fenilo y heterociclilo es un grupo heteromonocíclico insaturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 3 átomos de nitrógeno, un grupo heteromonocíclico saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno o un grupo heteromonocíclico saturado de 5 o 6 miembros que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde R en el compuesto de fórmula Ia es O.

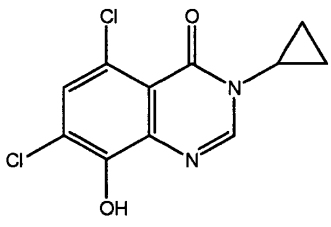
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde R^1 en el compuesto de fórmula Ia es halo, arilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, C_{1-6}alquilo opcionalmente sustituido, OR^2, SR^2, $(CH2)_nNR^2R^3$, $CONR^2R^3$ y $NCOR^2$ donde n, R^2, R^3, el sustituyente opcional, arilo y heterociclilo son los definidos en la reivindicación 1.

4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde R^1 en el compuesto de fórmula Ia es fluoro, yodo, cloro, fenilo opcionalmente sustituido, un grupo heteromonocíclico insaturado de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno, un grupo heteromonocíclico saturado de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 4 átomos de nitrógeno, un grupo heteromonocíclico saturado de 3 a 6 miembros opcionalmente sustituido que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, C_{1-4}alquilo opcionalmente sustituido, C_{2-6}cicloalquilo opcionalmente sustituido, C_{1-6}alcoxi opcionalmente sustituido, tio opcionalmente sustituido, $CH_2NR^4R^5$ en el cual R^4 y R^5 se eligen independientemente entre H y C_{1-4}alquilo o $CONH(CH_2)_2R^6$ en el cual R^6 es heterociclilo opcionalmente sustituido, y donde el sustituyente opcional y el heterociclilo son los definidos en la reivindicación 1.

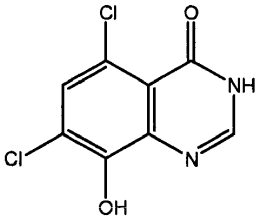
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el compuesto de fórmula Ia es de la manera siguiente:



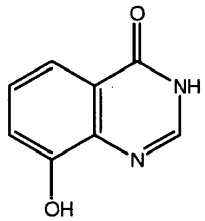
1055



1061



1067



1049

6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medicamento está destinado a ser administrado para frenar, disminuir o detener el deterioro cognitivo.

7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medicamento está destinado a ser administrado por vía oral, tópica o parenteral.

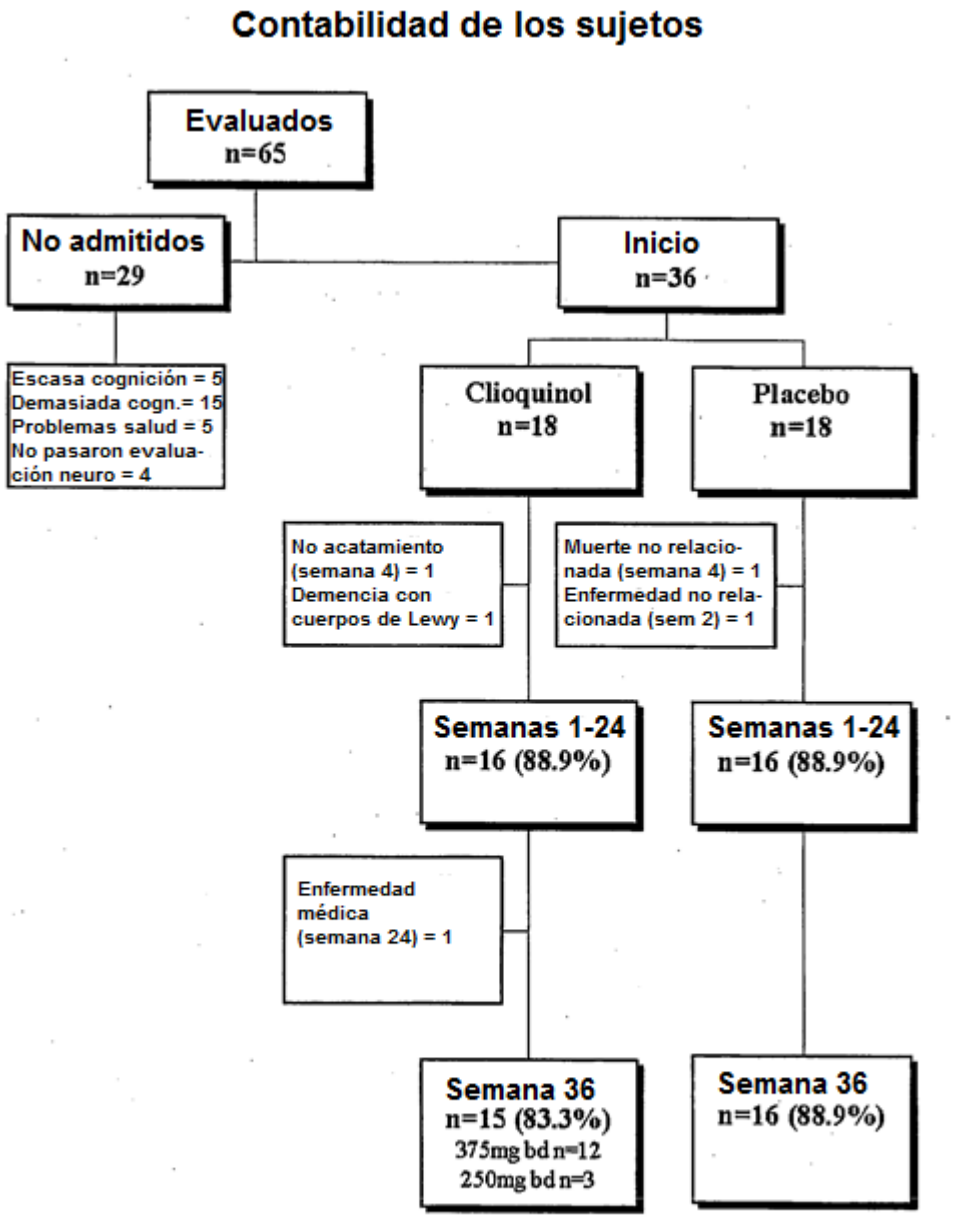

Contabilidad de los sujetos
Evaluados
n=65
No admitidos
n=29
Inicio
n=36
Escasa cognición = 5
Demasiada cogn.= 15
Problemas salud = 5
No pasaron evaluación neuro = 4
Clioquinol
n=18
Placebo
n=18
No acatamiento (semana 4) = 1
Demencia con cuerpos de Lewy = 1
Muerte no relacionada (semana 4) = 1
Enfermedad no relacionada (sem 2) = 1
Semanas 1-24
n=16 (88.9%)
Semanas 1-24
n=16 (88.9%)
Enfermedad médica (semana 24) = 1
Semana 36
n=15 (83.3%)
375mg bd n=12
250mg bd n=3
Semana 36
n=16 (88.9%)

Fig. 1

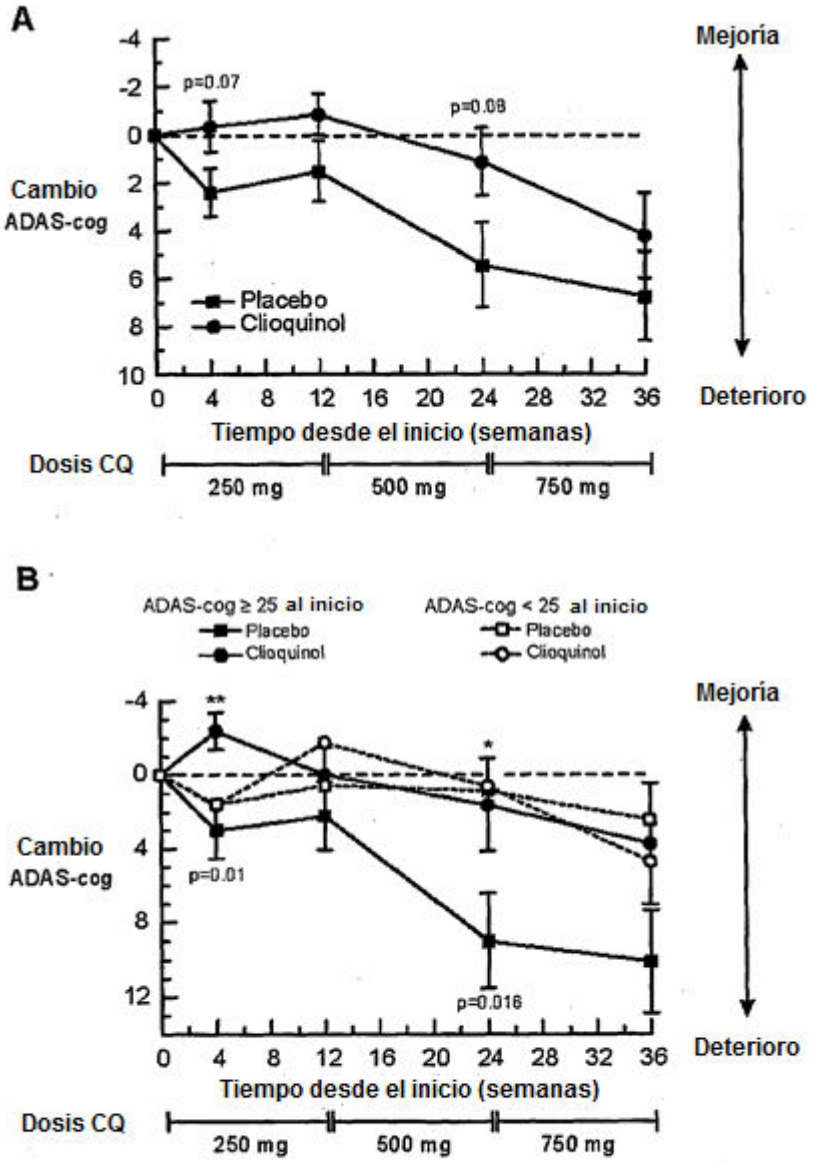

A
Mejoría
Cambio ADAS-cog
p=0.07
p=0.08
Placebo
Clioquinol
Deterioro
Tiempo desde el inicio (semanas)
Dosis CQ
250 mg
500 mg
750 mg
B
ADAS-cog ≥ 25 al inicio
Placebo
Clioquinol
ADAS-cog < 25 al inicio
Placebo
Clioquinol
Mejoría
Cambio ADAS-cog
p=0.01
p=0.016
Deterioro
Tiempo desde el inicio (semanas)
Dosis CQ
250 mg
500 mg
750 mg

Fig. 2

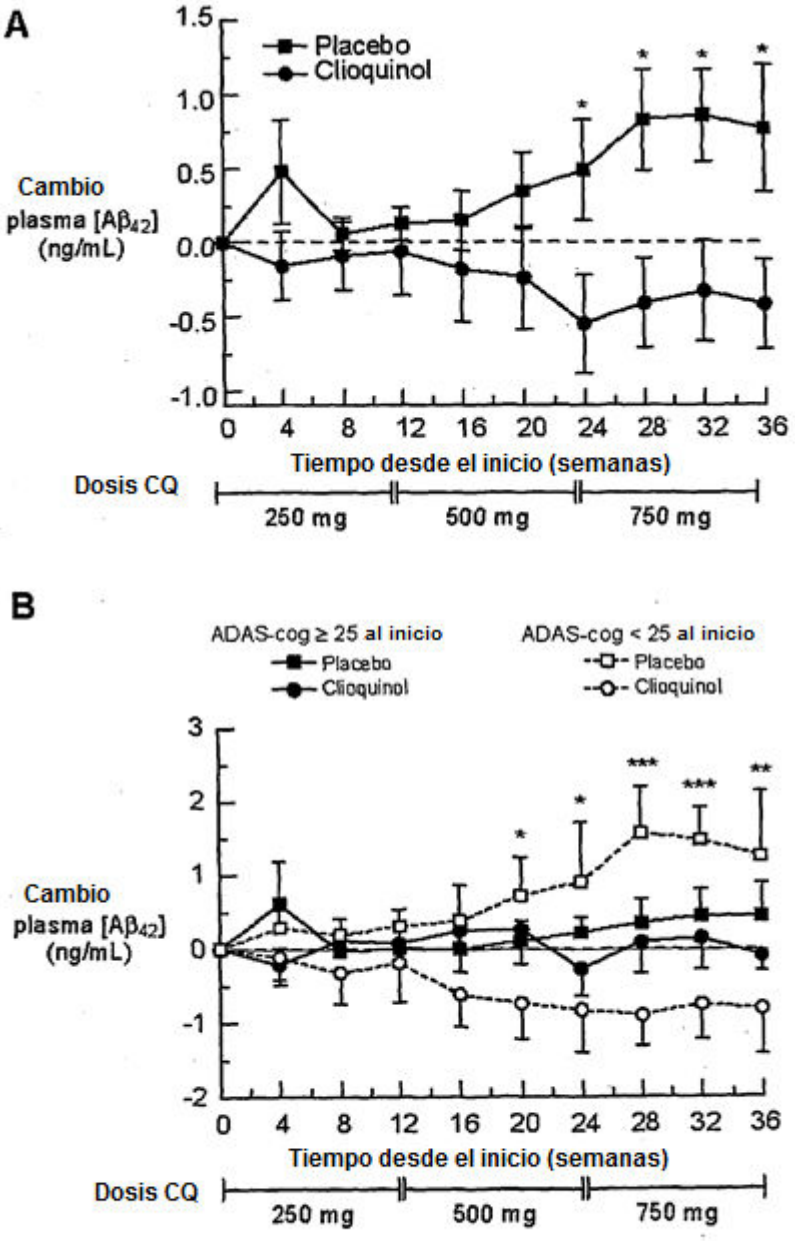

A
Placebo
Clioquinol
Cambio plasma [Aβ42] (ng/mL)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36
Tiempo desde el inicio (semanas)
Dosis CQ
250 mg
500 mg
750 mg
B
ADAS-cog ≥ 25 al inicio
Placebo
Clioquinol
ADAS-cog < 25 al inicio
Placebo
Clioquinol
Cambio plasma [Aβ42] (ng/mL)
3
2
1
0
-1
-2
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36
Tiempo desde el inicio (semanas)
Dosis CQ
250 mg
500 mg
750 mg

Fig. 3

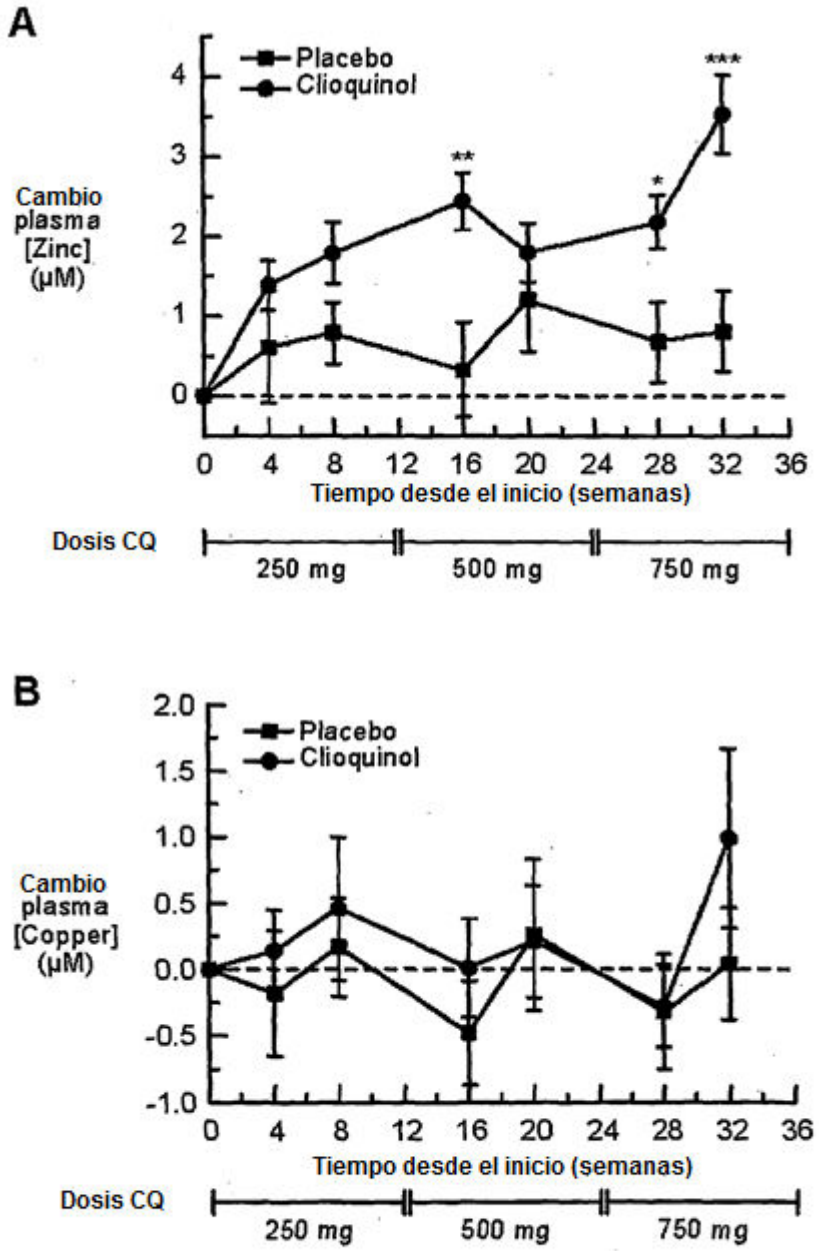

A
Placebo
Clioquinol
Cambio plasma [Zinc] (µM)
4
3
2
1
0
**
*
***
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36
Tiempo desde el inicio (semanas)
Dosis CQ
250 mg
500 mg
750 mg
B
Placebo
Clioquinol
Cambio plasma [Copper] (µM)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36
Tiempo desde el inicio (semanas)
Dosis CQ
250 mg
500 mg
750 mg

Fig. 4

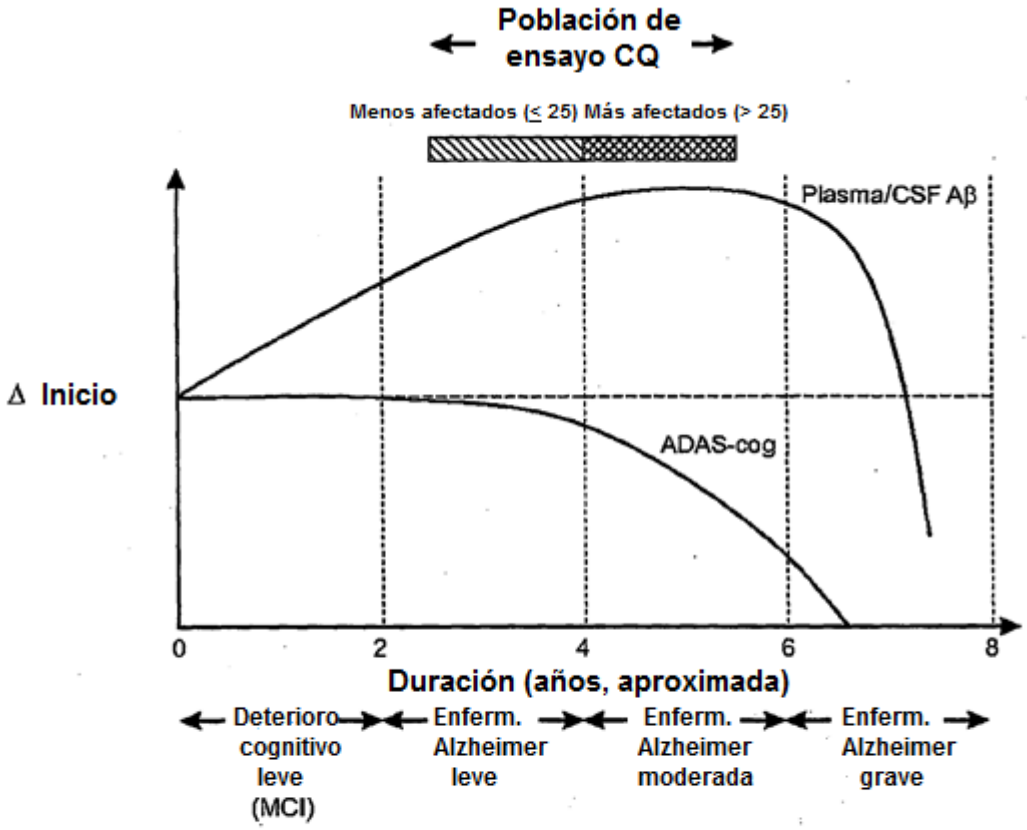

Población de ensayo CQ
Menos afectados (≤ 25) Más afectados (> 25)
Plasma/CSF Aβ
ADAS-cog
Δ Inicio
0
2
4
6
8
Duración (años, aproximada)
Deterioro cognitivo leve (MCI)
Enferm. Alzheimer leve
Enferm. Alzheimer moderada
Enferm. Alzheimer grave

Fig. 5