

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 063 428**

21 Número de solicitud: 202430825

51 Int. Cl.:

G16C 20/30 (2009.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.10.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.04.2026

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (40,00%)
Avda. de Cervantes 2
29071 Málaga (Málaga) ES;
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (40,00%) y
THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY
OF TEXAS SYSTEM (20,00%)

72 Inventor/es:

HIERREZUELO LEÓN, Jesús;
GÁLVEZ LLOMPART, María;
BLASCO SANTAMARÍA, María Luz;
GÓMEZ GUTIÉRREZ, Rubén;
VELA CORCIA, David;
ZANNI, Riccardo;
CÁMARA ALMIRÓN, Jesús;
GÓMEZ ANTEQUERA, María Luisa;
DE VICENTE MORENO, Antonio;
PÉREZ GARCÍA, Alejandro;
MORALES LOYOLA, Rodrigo;
GÁLVEZ ÁLVAREZ, Jorge y
ROMERO HINOJOSA, Diego

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **Identificación de compuestos con actividad antiagregante de proteínas y su uso en medicina**

57 Resumen:

Identificación de compuestos con actividad antiagregante de proteínas y su uso en medicina. La presente invención divulga un método para identificar compuestos con actividad antiagregante de proteínas mediante un enfoque de topología molecular y un experimento de polimerización cinética, así como su uso en medicina para el tratamiento de proteínas patológicas.

ES 3 063 428 A1

DESCRIPCIÓN

Identificación de compuestos con actividad antiagregante de proteínas y su uso en medicina

Sector técnico

- 5 La presente invención pertenece al campo de la medicina, particularmente al ámbito de las enfermedades neurodegenerativas.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas amiloides son estructuras macromoleculares con la capacidad de formar agregados y polímeros caracterizados por una distintiva morfología fibrilar rica en láminas β . Estas proteínas pueden teñirse con colorantes específicos, tales como el rojo Congo o la tioflavina T. Principalmente, incluyen proteínas bacterianas, péptidos amiloides- β y proteínas priónicas, entre otras.

15 Un fallo en el proceso normal de plegamiento de estas proteínas debido a una o más mutaciones en los genes que las codifican puede llevar a la pérdida de su función normal y desencadenar enfermedades donde proteínas plegadas de manera anormal se depositan en placas en tejidos específicos. Los sedimentos acumulados implican una pérdida gradual de función y muerte de las células en el sistema nervioso central y periférico, y las células perdidas no son reemplazadas de manera suficiente, por lo que
20 el daño se vuelve permanente.

Estas enfermedades se conocen como proteopatías o proteinopatías, trastornos conformacionales de proteínas, o enfermedades asociadas a errores de plegamiento proteico. Hasta la fecha se ha descubierto un amplio número de proteinopatías incluyendo enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de
25 Parkinson, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, la enfermedad de Huntington y otras amiloidosis cerebrales y periféricas. Entre las causas de desajuste conformacional de proteínas, se sospecha que cambios en factores ambientales (como el pH, condiciones redox u osmóticas) o mutaciones en el gen de la proteína juegan un papel crítico.

30 De forma interesante, se ha descrito que varias proteínas forman estructuras amiloides y siguen características comunes como la birrefringencia en luz polarizada cruzada tras el teñido con rojo Congo, o la estructura fibrilar característica bajo microscopía electrónica. No obstante, también se consideran un tipo de amiloidosis aquellos agregados proteicos no fibrilares, que carecen de birrefringencia y que se encuentran

en enfermedades como los depósitos de proteína A β en los cerebros de pacientes con Alzheimer. La denominada proteína amiloide- β (A β) es un péptido de entre 39 y 43 aminoácidos de longitud derivado de la proteólisis de la proteína precursora de A β (APP). A β es el principal componente bioquímico en las placas seniles amiloides observadas en cerebros de personas con Alzheimer. Aunque no se ha dilucidado completamente, la polimerización de los monómeros de β -amiloide ocurre después de la formación de un núcleo, en un proceso caracterizado por una fase inicial antes de que ocurra la agregación, seguido de una rápida polimerización tras la nucleación.

En relación con la ubicación de la escisión en la APP, se identifican dos principales isoformas (A β 40 y A β 42) de A β . Ambas isoformas están presentes en las placas seniles; sin embargo, A β 42 es el componente principal o exclusivo de las placas neuríticas y se asocia mayormente con la enfermedad debido a su naturaleza hidrofóbica aumentada y su propensión a formar estructuras amiloides, mientras que A β 40 es drásticamente más abundante en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Aunque la variante A β 42 es probablemente un factor clave en la patogénesis del Alzheimer debido a su mayor toxicidad, estudios recientes sugieren que el péptido crea un ambiente que favorece la agregación de otra proteína (la proteína tau) y facilita la acumulación de tau endógena en los axones distróficos cercanos.

Otra proteína relevante susceptible de formar oligómeros, protofibrillas y fibrillas maduras que causan disfunción neuronal, es la α -sinucleína (α -sin). Esta proteína es el principal componente de los cuerpos de Lewy, asociados con la muerte de células productoras de dopamina en la sustancia negra, un signo patológico importante en la enfermedad de Parkinson. Esta afección afecta a más de seis millones de personas en el mundo y causa problemas de movimiento, como rigidez, lentitud y temblores.

Otro ejemplo de proteopatías es causado por los priones, que son partículas infecciosas que intervienen en el prurigo lumbar, una enfermedad degenerativa transmisible de ovejas y cabras con características que se asemejan en gran medida a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en humanos. Los priones están compuestos por una proteína con desordenes en el plegamiento que tiene una resistencia extrema a tratamientos físicos y químicos, y pueden transmitir su forma mal plegada a variantes normales de la misma proteína. Estas dos enfermedades, junto con otros trastornos relacionados como la enfermedad de desgaste crónico (CWD) en ciervos o la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) en ganado (comúnmente conocida como "enfermedad de las vacas locas"), se clasifican como encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSEs). Todas ellas son enfermedades progresivas que afectan la

estructura del cerebro u otros tejidos nerviosos en mamíferos, sin que se conozca un tratamiento médico efectivo, y causan graves daños en la industria ganadera.

A pesar de la extensa investigación, hasta la fecha, el tratamiento y la terapia disponibles para estas enfermedades se limitan a aliviar los síntomas o reducir la progresión de la enfermedad. Muchas estrategias terapéuticas han sido evaluadas tanto en modelos
5 experimentales como en ensayos clínicos. Los ensayos clínicos exigen un gran número de pacientes y requieren un seguimiento prolongado, lo cual incrementa el coste, pero tiene una tasa de éxito muy baja. En los últimos años, han surgido más terapias centradas en el silenciamiento génico postranscripcional, también conocida como
10 terapia génica, como una herramienta médica prometedora para tratar estas enfermedades.

Más allá de los problemas neurodegenerativos, el término amiloide se ha incluido tradicionalmente para referirse a una clase muy heterogénea de proteínas con una
15 variedad de funciones que son esencialmente diferentes de las características patológicas descritas anteriormente. A pesar de ello, los llamados amiloides funcionales siguen un proceso de agregación análogo, con similitudes en su estructura cuaternaria, independientemente de su variabilidad en la secuencia de aminoácidos, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, desde humanos hasta bacterias. Un número
20 significativo de procesos fisiológicos importantes para la supervivencia microbiana está asociado con los amiloides funcionales. Se sabe que estas entidades proteicas atípicas participan en una miriada de procesos, como la adhesión celular bacteriana y la formación de *biofilms*, la reproducción, la citotoxicidad y la virulencia.

Para las bacterias Gram-positivas, un modelo representativo para estudiar las características amiloides es la proteína TasA en *Bacillus subtilis*. TasA es el principal
25 componente de la matriz extracelular en los *biofilms* de esta cepa bacteriana. Además, TasA es necesaria para la formación de *biofilms* junto con otros componentes de la matriz extracelular, ya que la ausencia de la proteína resulta en una película plana y frágil en cultivos líquidos estáticos. Las propiedades amiloides de TasA han sido ampliamente estudiadas en los últimos años. Los factores que afectan la polimerización
30 de TasA se han investigado in vitro, confirmando la estructura cuaternaria típica caracterizada por un patrón de láminas β cruzadas, en el cual las cadenas β unidas por enlaces de hidrógeno se alinean perpendicularmente al eje de la fibrilla. Además, las características propiedades de tinción útiles para la identificación de amiloides también
35 están presentes en las fibrillas de TasA. Un sistema homólogo también existe en la especie estrechamente relacionada *Bacillus cereus*, que incluye miembros que pueden

causar enfermedades en humanos. Recientemente se han reportado diferencias en la plataforma amiloide molecular, especialmente en los componentes estructurales, y en la forma en que ocurre la polimerización en las dos versiones de este sistema amiloide.

Por lo tanto, existe un gran interés en identificar nuevos compuestos terapéuticos que
5 alteren, reduzcan o bloqueen selectivamente la agregación de proteínas amiloides vinculadas a proteinopatías relevantes.

En trabajos previos, el modelo de TasA, como paradigma de una proteína amiloide bacteriana formadora de *biofilm* bien estudiada, ha permitido identificar inhibidores de *biofilms* que actúan sobre proteínas amiloides. *Parthenolide* es un producto natural
10 aislado de *Tanacetum parthenium* que ha mostrado propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias. Un trabajo publicado en 2013 introdujo *Parthenolide* como un agente *anti-biofilm* que reduce la formación de fibras de TasA, incluso destruyendo *biofilms* preformados. Mathema, V. B.; Koh, Y.; Thakuri, B. C. y Sillanpää, M. 2012. Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory
15 Activities. *Inflammation*. 35:560–565.

Uno de los métodos más prometedores en el diseño de fármacos asistido por computadora es la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR). Esta metodología permite una predicción rápida y precisa de muchas propiedades biológicas y fisicoquímicas. Generalmente, las metodologías QSAR utilizan descriptores físicos,
20 químicos o matemáticos para caracterizar los compuestos y establecer una relación con la propiedad que se quiere modelar. El QSAR basado en topología molecular emplea descriptores topológicos y topoquímicos para obtener el modelo predictivo.

Definida como una parte de la química matemática, la topología molecular se relaciona básicamente con la asimilación entre moléculas y grafos, de modo que puede
25 representar estructuras moleculares a través de índices teóricos de grafos. Además, se centra en la conectividad de los átomos en las moléculas y no en características geométricas como ángulos, distancias o estructura tridimensional, lo cual es común en los enfoques estándar o convencionales. De esta manera, la teoría de grafos y disciplinas relacionadas se establecen como herramientas básicas para el desarrollo de
30 la topología molecular. Mediante este enfoque, se han obtenido excelentes resultados en el diseño y selección de nuevos fármacos en diferentes campos médicos.

El documento de patente P201930440 divulga un método QSAR para detectar inhibidores de la quitina desacetilasa; el objetivo de dicho documento es totalmente diferente al de la presente invención, que es la identificación de compuestos con
35 actividad antiagregante de proteínas. Por lo tanto, aunque ambas invenciones utilizan

un enfoque QSAR, los modelos y las funciones de discriminación empleadas son muy diferentes en ambos documentos debido a las diferencias químicas de las moléculas objetivo. Además, los experimentos de laboratorio realizados para validar los objetivos también son distintos.

5

Descripción de la invención

El término "agregación de proteínas" en esta solicitud se refiere a cualquier acumulación de proteínas con desordenes en el plegamiento asociada con la progresión negativa de una enfermedad de agregación proteica.

10 El término "oligómero" se refiere a agregados de proteínas con desórdenes en el plegamiento formados por pocas (generalmente de 2 a 20) unidades de la proteína monomérica. A los oligómeros se les atribuyen comúnmente propiedades perjudiciales aumentadas, que incluyen toxicidad, actividad de iniciación (propagación) y difusión a través de tejidos y barreras biológicas.

15 Los términos restantes en esta especificación tienen el significado general comúnmente atribuido en el ámbito.

La presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto con actividad antiagregante de proteínas que comprende el paso de:

20 a) Obtener para dicho compuesto un valor para una función de discriminación DF1, donde:

$$DF1 = (1.003 \times nN) - (2.374 \times nR10) - (4.125 \times ICR) - (9.523 \times GATS1v) \\ 5 + (4.309 \times ESpm08x) - 35.762$$

donde:

- nN indica el número de átomos de nitrógeno,
- 25 • nR10 el número de anillos de 10 miembros,
- ICR es el índice de información centrado radialmente,
- GATS1v es el índice de autocorrelación de Geary a distancia topológica 1/ponderado por el volumen atómico de Van der Waals,
- ESpm08x es el momento espectral a distancia topológica 8 de la matriz de
- 30 adyacencia ponderado por grados de enlaces;

ES 3 063 428 A1

y verificar si el valor de DF1 obtenido para dicho compuesto en el paso a) es mayor que 0, donde en el caso de que el valor de DF1 obtenido sea mayor que 0, dicho compuesto tiene actividad antiagregante de proteínas.

En una realización particular, el método comprende además el paso b): Obtener para dicho compuesto un valor para una función de discriminación DF2, donde:

$$DF2 = (2.269 \times nN) - (36.288 \times PCR) - (6.076 \times EEig11r) + 20(9.792 \times VEA1) + 12.631$$

donde:

- nN es el número de átomos de nitrógeno,
- PCR es la relación entre el recuento de caminos múltiples sobre el recuento total de caminos,
- EEig11r es el autovalor a distancia topológica 11 de la matriz de adyacencia ponderado por integrales de resonancia,
- VEA1 es la suma de los coeficientes del autovector de la matriz de adyacencia;

y verificar si el valor de DF2 obtenido en el paso b) para dicho compuesto es mayor que 0, donde en el caso de que el valor de DF1 obtenido sea mayor que 0, dicho compuesto tiene actividad antiagregante de proteínas.

En una realización particular, el compuesto es un compuesto químico. Cualquier compuesto químico puede ser sometido al método de la invención para determinar si dicho compuesto químico tiene actividad antiagregante de proteínas, por ejemplo, aquellos compuestos químicos que se encuentran en bases de datos en línea.

La actividad antiagregante de proteínas comprende actividad anti-amiloide y actividad *anti-biofilm*. DF1 y DF2 son modelos diferentes: DF1 identifica el patrón quimio-matemático vinculado a la actividad dual anti-amiloide y *anti-biofilm*, mientras que DF2 captura únicamente la actividad anti-amiloide.

La actividad anti-amiloide se refiere a la capacidad de una proteína para polimerizar siguiendo un orden específico previamente descrito y que depende únicamente de la propia proteína. La actividad *anti-biofilm* comprende un conjunto de elementos que forman parte de la composición del *biofilm*. Así, un inhibidor de *biofilm* puede definirse como un compuesto químico que afecta no solo a la proteína, sino a otros elementos que componen la matriz extracelular. Por lo tanto, algunos compuestos identificados mediante el método de la invención y que poseen actividad antiagregante de proteínas

tendrán tanto actividad anti-amiloide como *anti-biofilm*, mientras que otros compuestos solo tendrán actividad *anti-biofilm*, ya que probablemente actuarán sobre otros elementos de la matriz extracelular.

5 La actividad anti-amiloide es muy específica y está dirigida a una proteína que presenta características amiloides. La actividad *anti-biofilm* no es tan específica, ya que la formación de *biofilm* involucra varios componentes.

10 El término "agregación de proteínas" se refiere a una forma de agregados de proteínas en la que los agregados forman fibras no ramificadas con propiedades de tinción, incluida la unión específica al colorante Rojo Congo, y muestran birrefringencia verde cuando se examinan entre polarizadores cruzados en un microscopio de luz, según se define en "Advances in Protein Chemistry and Structural Biology" Volumen 84, 2011, pág. 1-40. Este término comprende agregados formados por proteínas/péptidos presentes en humanos, animales, bacterias y hongos, entre otros.

15 Ejemplos de proteínas/péptidos presentes en humanos son: proteínas β -amiloide, proteínas priónicas, α -sinucleína, Huntingtina con expansión de poliglutamina, Atrophina-1, Ataxinas, Receptor de andrógenos, Tau hiperfosforilada, péptidos amiloides A β , SOD1, TDP-43, ANF amiloide, proteína AL, proteína AH, proteína ATTR, péptidos A β 2M, Alys, IAPP, amilina, AIns, Amiloide sérica A, ACys, AGel, AApoA1, Apro, AFib, Abri, Pmel17, β -2 microglobulina, Cistatina C, Transtiretina (TTR), Calcitonina, 20 Prolactina, Insulina, Estefina B (cistatina B), Mioglobina, Catelicidina, Secretina, Corticoliberina, GIP (polipéptido inhibidor gástrico), Urocortina, Obestatina, Glucagón, Defensina-6 y β -endorfina.

Otras proteínas/péptidos que pueden agregarse son las descritas en la base de datos AmyPRO (<https://amypro.net>), que contiene 162 entradas hasta el 17 de abril de 2023. 25 AmyPro: una base de datos de proteínas con regiones amiloidogénicas validadas; Mihaly Varadi, Greet De Baets, Wim F. Vranken, Peter Tompa y Rita Pancsa; Nucleic Acids Res. 2017 Oct 13.

Ejemplos de proteínas/péptidos presentes en el reino Animalia incluyen proteínas de corion en insectos y peces, así como espidroínas en *Nephila clavipes*.

30 Ejemplos de proteínas/péptidos presentes en bacterias incluyen TasA de *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, proteínas Curli y Chaplins en *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Streptomyces coelicolor*.

Ejemplos de proteínas/péptidos presentes en hongos incluyen HET en *Podospira anserina*, y URE2p y Sup35p en *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización particular, los agregados de proteínas amiloides están formados por una o más proteínas amiloides, preferiblemente una o más proteínas amiloides como las definidas anteriormente.

5 En otra realización particular, la actividad anti-amiloide comprende actividad antiagregante frente a una o más de las siguientes proteínas amiloides: TasA de *B. subtilis*, péptidos amiloides A β de *Homo sapiens*, α -sinucleína de *Homo sapiens* y proteínas priónicas.

En otra realización particular, los pasos a) y b) se realizan simultáneamente, o bien el paso b) se lleva a cabo antes que el paso a).

10 En otra realización particular, el método de la invención comprende el paso c):

- obtener para dicho compuesto un valor predictivo de logaritmo de la concentración inhibitoria media (LIC₅₀) de actividad antiagregante de proteínas, donde:

$$\text{LIC}_{50} = (-1.321 \times nX) - (79.292 \times \text{JGI8}) + (85.529 \times \text{JGI10}) + 0.979;$$

15 donde:

- nX es el número de átomos de halógeno,
- JGI8 es el índice de carga topológica media de orden 8, y
- JGI10 es el índice de carga topológica media de orden 10.

20 Y verificar si el valor de LIC₅₀ obtenido en el paso c) para dicho compuesto es menor que +2, donde si dicho valor es menor que +2, el compuesto se identifica como un compuesto con actividad antiagregante de proteínas. LIC₅₀=2 es equivalente a IC₅₀=100 μ M.

25 En una realización particular, si el valor de LIC₅₀ obtenido para dicho compuesto es menor que +1.7, el compuesto se identifica como un compuesto con actividad antiagregante de proteínas, ya que LIC₅₀=1.7 es equivalente a IC₅₀=50 μ M.

En otra realización particular, si el valor de LIC₅₀ obtenido para dicho compuesto es menor que +1.3, el compuesto se identifica como un compuesto con actividad antiagregante de proteínas, dado que LIC₅₀=1.3 es equivalente a IC₅₀=20 μ M.

30 Para fortalecer la actividad antiagregante de proteínas de los compuestos identificados mediante el método de la invención, se puede realizar un experimento de polimerización cinética. En una realización particular, el método de la invención comprende al menos

un experimento de polimerización cinética de una proteína, preferiblemente una proteína amiloide, en presencia del compuesto con actividad antiagregante de proteínas identificado como se ha definido anteriormente. Este experimento es útil para determinar si el compuesto identificado tiene actividad *anti-biofilm* y/o anti-amiloide.

- 5 En una realización particular, el experimento de polimerización cinética comprende probar la actividad *anti-biofilm* del compuesto identificado con actividad antiagregante de proteínas en presencia de un cultivo en suspensión de *Bacillus subtilis*, lo que implica poner dicho compuesto en contacto con una cepa de *Bacillus subtilis*, preferiblemente en un cultivo en suspensión, y observar si se desarrolla de forma típica un *biofilm*. El
- 10 protocolo utilizado fue descrito en Romero, D.; Vlamakis, H.; Losick, R.; y Kolter, R. 2011. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibers in *B. subtilis* *biofilms*. *Molecular Microbiology*. 80(5): 1155-1168. Un compuesto efectivo será aquel que afecte la robustez de la película de *biofilm*, de modo que cuanto más delgada sea en comparación con el grupo de control, mayor actividad antiagregante de proteínas
- 15 tendrá dicho compuesto.

Otros experimentos para probar la actividad *anti-biofilm* de los compuestos identificados son: Enumeración directa de bacterias en *biofilms*, Ensayo en la interfaz aire-líquido y Ensayo de *biofilm* en colonia. Estos ensayos son bien conocidos en el sector, por lo que una persona con conocimientos en la materia sabría cómo llevarlos a cabo utilizando

20 conocimientos generales y protocolos estándar.

En otra realización particular, la proteína amiloide utilizada para el experimento de polimerización cinética es una proteína TasA purificada de *B. subtilis*, en lugar de o además de probar su actividad en presencia de *Bacillus subtilis*.

- 25 En otra realización particular, el compuesto con actividad antiagregante de proteínas (actividad anti-amiloide) tiene al menos un 50% de eficacia en la prevención de la formación de fibras amiloides de TasA en *B. subtilis*.

En otra realización particular, el experimento de polimerización cinética comprende probar la actividad anti-amiloide del compuesto identificado con un péptido amiloide, por ejemplo, el péptido A β , preferiblemente los péptidos A β 42 y/o A β 40.

- 30 En otra realización particular, el experimento de polimerización cinética comprende probar la actividad anti-amiloide del compuesto identificado con una proteína amiloide, por ejemplo, la proteína α -sinucleína.

En otra realización particular, el experimento de polimerización cinética es un experimento de *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA) de un prion infeccioso

con el compuesto identificado con actividad antiagregante de proteínas. En particular, los priones infecciosos utilizados son las cepas Rocky Mountain Laboratory (RML) y/o la cepa de priones 301C. El protocolo para dicho experimento fue descrito en Saborio, G. P.; Permanne, B. y Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature. 411: 810-813.

En una realización preferida, el experimento de polimerización cinética con un péptido y/o proteína amiloide y/o el experimento PMCA (actividad anti-amiloide) se realiza después del experimento de polimerización cinética del compuesto identificado con actividad antiagregante de proteínas (actividad *anti-biofilm*) en presencia de *Bacillus subtilis*.

En otra realización particular, el método de la invención comprende obtener para un compuesto un valor de una función de discriminación DF1, donde dicho valor de DF1 es mayor que 0; luego, obtener para dicho compuesto un valor de una función de discriminación DF2, donde dicho valor de DF2 es mayor que 0; después obtener un valor predictivo de logaritmo de la concentración inhibitoria media (LIC₅₀) de la actividad antiagregante de proteínas, donde dicho valor de LIC₅₀ es menor que +2; y finalmente realizar al menos un experimento de polimerización cinética como se ha descrito anteriormente.

En otra realización particular, el método de la invención comprende obtener para un compuesto un valor de la función de discriminación DF1, donde dicho valor de DF1 es mayor que 0; luego, obtener para dicho compuesto un valor predictivo de LIC₅₀ de actividad antiagregante de proteínas, donde dicho valor de LIC₅₀ es menor que +2; y luego realizar al menos un experimento de polimerización cinética como se ha descrito anteriormente.

En otra realización particular, el método de la invención comprende obtener para un compuesto un valor de la función de discriminación DF1, donde dicho valor de DF1 es mayor que 0; y luego realizar al menos un experimento de polimerización cinética como se ha descrito anteriormente.

En otra realización particular, el método de la invención comprende obtener para un compuesto un valor de la función de discriminación DF1, donde dicho valor de DF1 es mayor que 0; luego, obtener para dicho compuesto un valor de la función de discriminación DF2, donde dicho valor de DF2 es mayor que 0; y finalmente realizar al menos un experimento de polimerización cinética como se ha descrito anteriormente.

En otra realización particular, el método de la invención comprende obtener para un compuesto un valor de la función de discriminación DF1, en donde dicho valor de DF1 es mayor que 0; y luego, obtener para dicho compuesto un valor de la función de discriminación DF2, en donde dicho valor de DF2 es mayor que 0.

- 5 En otra realización particular, el método de la invención comprende obtener para un compuesto un valor de la función de discriminación DF1, en donde dicho valor de DF1 es mayor que 0; luego, obtener para dicho compuesto un valor de la función de discriminación DF2, en donde dicho valor de DF2 es mayor que 0, y luego obtener para dicho compuesto un valor predictivo del logaritmo de la concentración inhibitoria media
10 (LIC₅₀) en la actividad antiagregante de proteínas, en donde dicho valor de LIC₅₀ es inferior a +2.

Otro objeto de la invención se relaciona con un compuesto químico identificado mediante el método descrito anteriormente con actividad antiagregante de proteínas. Es decir, dicho compuesto altera el perfil de polimerización cinética de una proteína
15 amiloide.

En una realización particular, dicho compuesto se caracteriza por que:

- dicho compuesto tiene un valor de DF1 mayor que 0.

En otra realización particular, dicho compuesto se caracteriza por que:

- dicho compuesto tiene un valor de DF1 mayor que 0, y
- 20 - dicho compuesto tiene un valor de DF2 mayor que 0, o
- dicho compuesto además tiene un valor de LIC₅₀ inferior a 2, preferiblemente inferior a 1.7, más preferiblemente inferior a 1.3.

En una realización particular, dicho compuesto se caracteriza por que:

- dicho compuesto tiene un valor de DF1 mayor que 0,
- 25 - preferiblemente dicho compuesto tiene un valor de DF2 mayor que 0, y
- dicho compuesto además tiene un valor de LIC₅₀ inferior a 2, preferiblemente inferior a 1.7, más preferiblemente inferior a 1.3.

En otra realización particular, el compuesto identificado mediante el método descrito anteriormente se selecciona entre:

- 30 - 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico.

ES 3 063 428 A1

- ácido 8-carbamoil-2-(furano-2-il)imidazo[1,5-a]pirimidina-4-carboxílico,
- ácido 6-cloro-1H-indol-2-carboxílico,
- ácido 2-((3-metilfurano-2-carboxamido)metil)furano-3-carboxílico,
- 5-amino-3-fenil-2-tioxo-2,3-dihydrothiazole-4-carboxamida,
- 5 - ácido 6-cloroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxílico,
- 5-(tiofen-2-il)-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida,
- [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina-2-carboxamida,
- 3,6-diamino-N-(2-carbamoilfenil)-5-cianotieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida,
- 3,6-diamino-5-ciano-N-(3,4-difluorofenil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida,
- 10 - 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
- ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,
- 6-etil 8-metil (Z)-5-amino-7-(furano-2-il)-2-(furano-2-ilmetileno)-3-oxo-2,3-dihidro-7H-tiazolo[3,2-a]piridina-6,8-dicarboxilato,
- 15 - ácido 3-amino-2-((2,6-dimetilfenil)carbamoil)-6-oxo-6,7-dihydrothieno[2,3-b]piridina-5-carboxílico,
- (1S,2S)-1,2-bis(pentafluorofenil)etilendiamina,
- (1R,2R)-1,2-bis(pentafluorofenil)etilendiamina,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 20 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida,
- N"-[(E)-[(tiofen-2-il)metilideno]amino]guanidina,
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiotirano-3,5-dicarbonitrilo,
- pirazina-2,3,5-tricarboxamida,
- 4-(3-bromobencil)-1H-pirazol-3,5-diamina,
- 25 y sus combinaciones.

Preferentemente,

- ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,

- 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina.
- 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,
- (1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilendiamina,
- 5 - (1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilendiamina,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida,
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiotirano-3,5-dicarbonitrilo,

y sus combinaciones.

- 10 Otro objeto de la invención, la invención se refiere al uso de un compuesto químico identificado mediante el método descrito anteriormente con actividad antiagregante de proteínas.

El método de la invención es útil para identificar compuestos que previenen la agregación de compuestos macromoleculares que forman estructuras amiloides, la mayoría de los cuales están involucrados en proteínas patológicas, como enfermedades neurodegenerativas o infecciones bacterianas que producen un *biofilm*.

15

Otro objeto de la invención se refiere a un compuesto detectado mediante el método descrito anteriormente, para su uso como medicamento.

Los términos "tratamiento" y "tratamiento médico", según se usan en este contexto, se refieren al manejo médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, condición patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, condición patológica o trastorno, e incluye también el tratamiento causal, es decir, tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, tratamiento diseñado para aliviar los síntomas en lugar de curar la enfermedad, condición patológica o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad asociada, condición patológica o trastorno; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, condición patológica o trastorno asociado. Se entiende que el tratamiento, aunque esté destinado a curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, condición patológica

20

25

30

o trastorno, no necesita resultar necesariamente en la cura, mejora, estabilización o prevención. Los efectos del tratamiento pueden medirse o evaluarse como se describe aquí y como se conoce en el arte, según sea adecuado para la enfermedad, condición patológica o trastorno involucrado. Dichas mediciones y evaluaciones pueden hacerse en términos cualitativos y/o cuantitativos. Así, por ejemplo, las características o rasgos de una enfermedad, condición patológica o trastorno y/o los síntomas de una enfermedad, condición patológica o trastorno pueden reducirse a cualquier efecto o a cualquier cantidad. En el contexto de un sujeto que sufre de una proteinopatía, los términos "tratamiento" y "tratamiento médico" se refieren al manejo médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar o estabilizar dicha enfermedad.

Según se usa en este documento, el término "sujeto" incluye, pero no se limita a, animales, plantas, bacterias, virus, parásitos y cualquier otro organismo o entidad. El sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, cobaya o roedor), un pez, un ave, un reptil o un anfibio. El sujeto puede ser un invertebrado, más específicamente un artrópodo (por ejemplo, insectos y crustáceos). El término no denota una edad o sexo particular. Así, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean masculinos o femeninos, están comprendidos. Un paciente se refiere a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. En un aspecto, los compuestos descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto que comprenda a un ser humano o a un animal, incluyendo, pero no limitándose a, un ratón, perro, gato, caballo, bovino u ovino y similares, que necesite alivio o mejora de una condición médica reconocida.

Otro objeto de la invención se refiere a uno o más de los compuestos identificados mediante el método descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento de proteinopatías en un sujeto.

En esta especificación, el tratamiento de las proteinopatías comprende alterar selectivamente, reducir o bloquear la agregación de proteínas amiloides responsables de los síntomas de la enfermedad.

En una realización particular, las proteinopatías comprenden enfermedades neurodegenerativas e infecciones bacterianas que producen un *biofilm*.

En otra realización particular, las enfermedades neurodegenerativas son seleccionadas del grupo que consiste en: enfermedad de Parkinson (α -sinucleína), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (priones), huntingtina con expansión de poliglutamina en la

enfermedad de Huntington, Atrofina-1 en la atrofia dentatorubral-palidoluisiana (DRPLA), Ataxinas en Ataxia Espinocerebelosa (SCA1-3), AR en Atrofia Muscular Espinal-Bulbar (SBMA), Tau hiperfosforilada y/o péptidos amiloides A β en enfermedad de Alzheimer o demencia frontotemporal con parkinsonismo, SOD1 y TDP-43 en
 5 esclerosis lateral amiotrófica (ELA), amiloide ANF en amiloidosis atrial, AL y AH en amiloidosis sistémica primaria, ATTR en amiloidosis sistémica senil y neuropatía amiloide familiar I, A β 2M en amiloidosis relacionada con hemodiálisis, Alys en amiloidosis sistémica hereditaria no neuropática, IAPP o amiloide en diabetes tipo II, AIns en amiloidosis localizada por inyección, amiloide A sérica en amiloidosis sistémica
 10 secundaria, ACys en angiopatía amiloide cerebral hereditaria, AGel en amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, AApoA1 en neuropatía amiloide familiar II, Apro en pituitarias envejecidas y prolactinomas, AFib en amiloidosis familiar o Abri en demencia familiar británica. Además, priones infecciosos involucrados en la enfermedad de Kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
 15 (GSS), insomnio familiar fatal, prurigo lumbar, enfermedad de desgaste crónico y encefalopatía esponjiforme bovina.

En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es el Alzheimer, y el compuesto para su uso en el tratamiento de dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en:

- 20
- ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
 - 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
 - ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,
 - (1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,

25

 - (1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,
 - 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida,
 - 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,
- y sus combinaciones,
- 30 preferiblemente:
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y

- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,
y sus combinaciones.

En una realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos discutidos en el párrafo anterior es, como mínimo, de 1 μM , preferiblemente al menos 10 μM , aún más preferiblemente al menos 20 μM , aún más preferiblemente al menos 30 μM , aún más preferiblemente al menos 40 μM , aún más preferiblemente al menos 50 μM , aún más preferiblemente al menos 60 μM , aún más preferiblemente al menos 90 μM , hasta 1000 μM , preferiblemente 500 μM o hasta 300 μM .

En otra realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos puede ser aproximadamente de 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 12 μM , 14 μM , 15 μM , 16 μM , 18 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM , 35 μM , 40 μM , 45 μM , 50 μM , 55 μM , 60 μM , 65 μM , 70 μM , 75 μM , 80 μM , 85 μM , 90 μM , 95 μM , 100 μM , 110 μM , 120 μM , 125 μM , 130 μM , 140 μM , 150 μM , 160 μM , 170 μM , 175 μM , 180 μM , 190 μM , 200 μM , 220 μM , 240 μM , 250 μM , 260 μM , 280 μM , 300 μM , 320 μM , 340 μM , 350 μM , 360 μM , 380 μM , 400 μM , 420 μM , 440 μM , 450 μM , 460 μM , 480 μM , 500 μM .

En otra realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es Parkinson, y el compuesto para su uso en el tratamiento de dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en:

- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,
y sus combinaciones, a una concentración de al menos 5 μM .

En una realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos discutidos en el párrafo anterior es, como mínimo, de 7 μM , preferiblemente al menos 10 μM , aún más preferiblemente al menos 20 μM , aún más preferiblemente al menos 30 μM , aún más preferiblemente al menos 40 μM , aún más preferiblemente al menos 50 μM , aún más preferiblemente al menos 60 μM , aún más preferiblemente al menos 90 μM , hasta 1000 μM , preferiblemente hasta 500 μM , o hasta 300 μM .

En otra realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos puede ser aproximadamente de 8 μM , 9 μM , 10 μM , 12 μM , 14 μM , 15 μM , 16 μM , 18 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM , 35 μM , 40 μM , 45 μM , 50 μM , 55 μM , 60 μM , 65 μM , 70 μM , 75 μM , 80 μM , 85 μM , 90 μM , 95 μM , 100 μM , 110 μM , 120 μM , 125 μM , 130 μM , 140 μM , 150 μM , 160 μM , 170 μM , 175 μM , 180 μM , 190 μM , 200 μM , 220 μM , 240 μM , 250 μM , 260

ES 3 063 428 A1

μM , 280 μM , 300 μM , 320 μM , 340 μM , 350 μM , 360 μM , 380 μM , 400 μM , 420 μM , 440 μM , 450 μM , 460 μM , 480 μM , 500 μM .

En otra realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, causada por proteínas priónicas, y el compuesto para su uso en el

5 tratamiento de dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en:

- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,

y sus combinaciones, a una concentración de al menos 90 μM .

10 En otra realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos puede ser aproximadamente de 95 μM , 100 μM , 110 μM , 120 μM , 125 μM , 130 μM , 140 μM , 150 μM , 160 μM , 170 μM , 175 μM , 180 μM , 190 μM , 200 μM , 220 μM , 240 μM , 250 μM , 260 μM , 280 μM , 300 μM , 320 μM , 340 μM , 350 μM , 360 μM , 380 μM , 400 μM , 420 μM , 440 μM , 450 μM , 460 μM , 480 μM , 500 μM .

15 La actividad *anti-biofilm* en el caso de infecciones bacterianas que producen un *biofilm* también es terapéutica, ya que muchas bacterias causan infección en sujetos tras la penetración de la piel con dispositivos médicos (por ejemplo, un bisturí), usando su *biofilm* para obtener acceso. Además, los *biofilms* bacterianos los vuelven resistentes a los antibióticos, ya que impiden que los antibióticos ejerzan su efecto en las bacterias.

20 En otra realización particular, las bacterias que producen infecciones bacterianas con *biofilm* se seleccionan del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* y *Salmonella spp.*

En una realización particular, el compuesto para uso contra infecciones bacterianas que producen un *biofilm* se selecciona del grupo que consiste en:

- 25
- Ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
 - 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
 - Ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,
- 30
- (1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,

- (1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,

5 y sus combinaciones.

En una realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos discutidos en el párrafo anterior es al menos de 1 μM , preferiblemente al menos 10 μM , más preferiblemente al menos 20 μM , aún más preferiblemente al menos 30 μM , aún más preferiblemente al menos 40 μM , aún más preferiblemente al menos 50 μM , aún más preferiblemente al menos 60 μM , aún más preferiblemente al menos 90 μM , hasta 1000 μM , preferiblemente 500 μM o hasta 300 μM .

En otra realización particular, la concentración de cualquiera de los compuestos puede ser aproximadamente de 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , 10 μM , 12 μM , 14 μM , 15 μM , 16 μM , 18 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM , 35 μM , 40 μM , 45 μM , 15 50 μM , 55 μM , 60 μM , 65 μM , 70 μM , 75 μM , 80 μM , 85 μM , 90 μM , 95 μM , 100 μM , 110 μM , 120 μM , 125 μM , 130 μM , 140 μM , 150 μM , 160 μM , 170 μM , 175 μM , 180 μM , 190 μM , 200 μM , 220 μM , 240 μM , 250 μM , 260 μM , 280 μM , 300 μM , 320 μM , 340 μM , 350 μM , 360 μM , 380 μM , 400 μM , 420 μM , 440 μM , 450 μM , 460 μM , 480 μM , 500 μM .

Como se mostrará más adelante en los ejemplos de la patente, el uso médico contra 20 infecciones bacterianas que producen un *biofilm* incluye la inhibición de la producción del *biofilm* o la inhibición del crecimiento bacteriano. La inhibición de la producción del *biofilm* o su destrucción puede deberse a la inhibición de una proteína polimérica como TasA, o a otros mecanismos.

Otras proteínas funcionales tipo amiloide incluyen FapC (*Pseudomonas*) y gingipaínas 25 (*Porphyromonas gingivalis*) en enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer, la toxina de *B. fragilis* (*Bacteroides fragilis*), la molécula adhesina FadA (*Fusobacterium nucleatum*) y la toxina citoletal descendente (*Campylobacter jejuni*) en el cáncer colorrectal.

Se ha demostrado que proteínas como FapC forman fibras amiloides similares a las 30 encontradas en enfermedades neurodegenerativas y pueden incluso inducir la agregación de proteínas relacionadas con el Parkinson y el Alzheimer, como la α -sinucleína y la proteína Tau. Más adelante se mostrará que los compuestos identificados por el método de la invención son útiles en el tratamiento de dichas enfermedades

neurodegenerativas, por lo que existe una expectativa razonable de éxito en que dichos compuestos serán útiles contra otras infecciones bacterianas que producen *biofilms* o inducen la agregación de proteínas.

Cada uno de los términos "comprendiendo", "consistiendo esencialmente en" y "consistiendo en" puede ser reemplazado por cualquiera de los otros dos términos. El término "un" o "una" puede referirse a uno o a una pluralidad de elementos que modifica (por ejemplo, "un reactivo" puede significar uno o más reactivos) a menos que el contexto indique claramente que se describe uno de los elementos o más de uno de los elementos. El término "aproximadamente" utilizado aquí se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10 %; por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir un peso entre 90 gramos y 110 gramos). El uso del término "aproximadamente" al inicio de una lista de valores modifica cada uno de los valores (por ejemplo, "aproximadamente 1, 2 y 3" se refiere a "aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3"). Cuando se describe una lista de valores, la lista incluye todos los valores intermedios y todos los valores fraccionarios de estos (por ejemplo, la lista de valores "80%, 85% o 90%" incluye el valor intermedio 86% y el valor fraccionario 86.4%). Cuando una lista de valores es seguida por el término "o más," el término "o más" se aplica a cada uno de los valores listados (por ejemplo, la lista de "80%, 90%, 95% o más" se refiere a "80% o más, 90% o más, o 95% o más"). Cuando se describe una lista de valores, la lista incluye todos los rangos entre dos de los valores listados (por ejemplo, la lista de "80%, 90% o 95%" incluye los rangos de "80% a 90%", "80% a 95%" y "90% a 95%"). Algunas implementaciones de la tecnología se establecen en los ejemplos a continuación.

Aunque esta descripción contiene muchos detalles específicos, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, sino como una mera ilustración de algunas de las realizaciones preferidas de la misma en la actualidad, así como el mejor modo contemplado por el inventor para llevar a cabo la invención. La invención, tal como se describe aquí, es susceptible de varias modificaciones y adaptaciones que serían apreciadas por aquellos con conocimientos ordinarios en el arte al que se refiere la invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1: (A) Actividad *anti-biofilm* de algunos de los compuestos seleccionados a 100 μ M en cultivos estacionarios de *Bacillus subtilis* 3610 en medio MSgg a 28°C después de 72 horas de incubación. Se utilizó DMSO como control, ya que los compuestos fueron

preparados en este disolvente. (B) Micrografías de transmisión electrónica de compuestos seleccionados a 100 μM , tomadas después de 72 horas de incubación con la proteína amiloide de *B. subtilis* (TasA). Las barras de escala representan 200 nm. (C) Se utilizó tioflavina T y fluorescencia para estudiar la cinética de la polimerización de TasA en presencia de los compuestos seleccionados a 100 μM . (D) Curva de crecimiento de *B. subtilis* 3610 en medio líquido MSgg en ausencia y presencia de compuestos seleccionados a 100 μM . (E) Dinámica de expresión del promotor del gen *tasa*, medida mediante citometría de flujo de células de *B. subtilis* con la fusión de traducción PtasA-yfp insertada en el locus neutral amyE, tras 48 y 72 horas de incubación con compuestos seleccionados a 100 μM . El compuesto 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il) propanoico no permitió el crecimiento bacteriano, por lo que no se pudo realizar la medición de citometría de flujo.

Figura 2: (A) Cinética de la formación de fibrillas del péptido amiloide ($\text{A}\beta$ -42) monitorizada mediante fluorescencia de ThT. El gráfico muestra el efecto de algunos compuestos *anti-biofilm* seleccionados a 100 μM que reducen el perfil de agregación. (B) Micrografías de transmisión electrónica de muestras de péptido amiloide teñidas negativamente, tras la incubación con compuestos seleccionados. (C) Reducción de la polimerización del péptido amiloide ($\text{A}\beta$ -40) realizada con compuestos seleccionados a 100 μM .

Figura 3: Medición de fluorescencia de ThT para una muestra de α -sinucleína y tres concentraciones de compuestos seleccionados para evaluar su actividad antiagregante contra esta proteína amiloide.

Figura 4: (A) Detección de PrP^{Sc} tras la replicación del prion RML usando PMCA a tres concentraciones diferentes de los compuestos. Los productos de PMCA se evaluaron mediante Western blot. (B) El mismo procedimiento descrito en (A) se aplicó para PrP^{Sc} de priones 301C adaptados de BSE bovino en ratones. (C) Controles negativos que muestran que las reacciones no son inhibidas por DMSO y que las reacciones sin siembra no generan falsos positivos.

Figura 5: Representación esquemática del análisis de acoplamiento molecular de la molécula 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida contra TasA (a), $\text{A}\beta$ -40 (b), $\text{A}\beta$ -42 (c) y α -sinucleína (d).

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Modelado de actividad antiagregante de proteínas e identificación de compuestos.**

Diversos compuestos han sido reportados en la literatura por su actividad anti-amiloide y antiagregante de proteínas, incluyendo actividad *anti-biofilm*: 1,2,3,4,6-Penta-O-galoyl-β-D-glucopiranososa, AA-861, Alexidina, BibC10, Clioquinol, Clotrimazol, curcumina, EGCG, o-Vanilina, Parthenolida, Quercetina y Ácido Tánico.

Partiendo de las estructuras químicas de estos compuestos (Tabla 1, columna izquierda), se desarrolló un enfoque de topología molecular para identificar compuestos con actividad antiagregante de proteínas. Los compuestos del grupo inactivo se obtuvieron a partir de compuestos que compartían similitudes químicas con los del grupo activo obtenidos de la base de datos Comprehensive Medicinal Chemistry (CMC), sin actividad antiagregante de proteínas experimental reportada en la literatura. Las estructuras químicas listadas en la Tabla 1 fueron convertidas en grafos y luego en descriptores topológicos 2D mediante teoría de grafos. Se aplicó un análisis discriminante lineal (ADL) para calcular una función discriminante (DF1).

$$DF1 = (1.003 \times nN) - (2.374 \times nR10) - (4.125 \times ICR) - (9.523 \times GATS1v) + (4.309 \times ESpm08x) - 35.762$$

$$N= 24 \quad \lambda= 0.440 \quad F =4.584 \quad p< 0.007$$

20 Donde:

- **N**: número de compuestos
- **λ**: Lambda de Wilks
- **F**: Parámetro de Fisher-Snedecor
- **p**: Significación estadística

25 Los descriptores en DF1 son: **nN** (número de átomos de nitrógeno), **nR10** (número de anillos de 10 miembros), **ICR** (índice de información centrado radialmente), **GATS1v** (índice de autocorrelación de Geary a distancia topológica 1/ponderado por el volumen atómico de Van der Waals) y **ESpm08x** (momento espectral a distancia topológica 8 de la matriz de adyacencia ponderado por grados de enlaces). Estos parámetros se calcularon usando el software DRAGON. R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, DRAGON-software para el Cálculo de Descriptores Moleculares, Versión 5.4, Talete srl, Milán, Italia, 2004.

ES 3 063 428 A1

Los compuestos activos (A) son aquellos que presentan un valor de DF1 superior a 0. Por lo tanto, este modelo es adecuado para clasificar compuestos químicos según su capacidad para exhibir actividad antiagregante de proteínas, aunque hay algunos compuestos incorrectamente clasificados solo con DF1, como la curcumina e Isoacitretina en la Tabla 1.

TABLA 1

Compuesto	nN	nR10	ICR	GATS1v	ESpm08x	DF ₁ ^b	CLASS ^c	P.A.
Grupo activo^a								
1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-D-glucopyranose	0	0	3,023	0,922	14,053	3,542	A	0,972
AA-861	0	0	3,07	0,548	12,858	1,761	A	0,854
Alexidine	10	0	3,725	1,108	12,075	0,382	A	0,596
BibC10	1	1	2,652	0,595	13,192	3,106	A	0,957
Clioquinol	1	1	1,738	0,475	12,536	5,192	A	0,994
Clotrimazole	2	0	2,032	1,165	13,216	3,715	A	0,976
curcumin	0	0	3,051	0,796	12,857	-0,527	I	0,372
EGCG	0	1	2,699	0,771	13,742	2,603	A	0,931
o-Vanillin	0	0	1,823	0,833	11,919	0,144	A	0,537
Parthenolide	0	1	1,496	0,85	12,877	3,085	A	0,956
Quercetin	0	1	2,461	0,733	13,12	1,266	A	0,781
Tannic acid	0	0	3,696	0,912	14,708	3,684	A	0,976
Grupo inactivo^a								
4-((3S,10S,12R,13S,14S,17R)-12,14-dihydroxy-3-(((2R,4S,5S,6R)-4-hydroxy-5-(((2S,4S,5S,6R)-4-hydroxy-5-(((2S,4S,5S,6R)-4-hydroxy-6-methyl-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phena	0	2	4,036	0,909	13,937	-5,760	I	0,003

ES 3 063 428 A1

nthren-17-yl)furan-2(5H)-one								
(2R,2'R,3R,3'R,4S,4'S,5R,5'R,6R,6'R)-methylene bis(2,3,4,5,6,7-hexahydroxyheptanoate)	0	0	3,212	1,163	12,557	-5,979	I	0,003
Acemannan	1	0	4,324	1,206	14,018	-3,677	I	0,025
Benzonaphthol	0	1	2,524	0,718	12,568	-1,230	I	0,227
Chlorproethazine	2	2	2,366	1,387	12,723	-6,649	I	0,001
Diacerein	0	2	2,552	0,796	13,28	-1,394	I	0,199
Doclothepin	2	0	2,403	1,334	12,755	-1,411	I	0,197
Ipxidine	10	0	3,932	1,161	12,113	-0,813	I	0,309
Isoacitretin	0	0	2,924	0,73	12,828	0,501	A	0,624
Kalafungin	0	2	2,243	0,88	13,128	-1,574	I	0,172
Salprotoside	0	0	2,67	0,965	13,01	0,095	I	0,525
Sulfinalol	1	0	3,075	0,789	12,712	-0,181	I	0,456

a Clasificación experimental de la actividad *anti-biofilm* y anti-amiloide de los compuestos utilizados como material de partida para realizar el primer ADL (A, activo; I, inactivo);

5 b Valor de la función discriminante, DF1, obtenido para cada compuesto ($DF1 = (1.003 \times nN) - (2.374 \times nR10) - (4.125 \times ICR) - (9.523 \times GATS1v) + (4.309 \times ESpm08x) - 35.762$); donde nN (número de átomos de nitrógeno), nR10 (número de anillos de 10 miembros), ICR (índice de información centrado radialmente), GATS1v (índice de autocorrelación de Geary a distancia topológica 1/ponderado por el volumen atómico de Van der Waals), y ESpm08x (momento espectral a distancia topológica 8 de la matriz de adyacencia ponderado por grados de enlaces).

10 c Clasificación obtenida aplicando DF1 (se elegirá un compuesto con actividad antiagregante de proteínas, con un compuesto dual *anti-biofilm* y anti-amiloide, A, si muestra un valor discriminante DF1 superior a 0).

P.A.: Probabilidad de ser activo. El modelo lo clasifica en el grupo que tiene la probabilidad más alta, expresada en la tabla como un porcentaje de 1.

15

Ejemplo 2: Modelado de actividad anti-amiloide e identificación de compuestos.

El segundo modelo tiene el objetivo de determinar la actividad antiagregante de proteínas de compuestos que no tienen actividad *anti-biofilm*. Se ha empleado una selección de compuestos con actividad amiloide IC₅₀ reportada en la literatura para desarrollar DF2. El grupo activo está compuesto por potentes compuestos anti-amiloides (IC₅₀ <20 μM), mientras que el grupo de compuestos inactivos comprende aquellos que exhiben una actividad anti-amiloide menos potente (IC₅₀ > 20 μM).

20

Las estructuras químicas listadas en la Tabla 2 se transformaron en grafos y, por lo tanto, se calcularon en descriptores topológicos 2D utilizando teoría de grafos con el software

ES 3 063 428 A1

DRAGON. Luego, se aplicó un análisis discriminante lineal (ADL) para calcular una función discriminante (DF2).

$$DF_2 = (2.269 \times nN) - (36.288 \times PCR) - (6.076 \times EEig11r) + (9.792 \times VEA1) + 12.631$$

5 N= 28 Wilks' Lambda= 0.319 F =12.292 p< 0.00001

Donde, nN (número de átomos de nitrógeno), PCR (relación del recuento de caminos múltiples sobre el recuento de caminos), EEig11r (valor propio 11 de la matriz de adyacencia de bordes ponderado por integrales de resonancia) y VEA1 (suma de coeficientes de los eigenvectores de la matriz de adyacencia).

10 Los compuestos activos (A) son aquellos que tienen un valor DF2 mayor que 0. Por lo tanto, este modelo es adecuado para clasificar compuestos químicos según su potencia como compuestos antiagregante de proteínas sin actividad *anti-biofilm*.

Los parámetros que permiten diferenciar entre actividad anti-amiloide y *anti-biofilm* están representados por los índices que componen los diferentes modelos dirigidos a
15 identificar el patrón químio-matemático de compuestos con dicha actividad.

TABLA 2

Compuestos	nN	PCR	EEig11r	VEA1	DF2 ^b	CLASS ^c	P.A.
Grupo activo^a							
Azure	3	1,446	0,204	3,8	2,936	A	0,950
Basic blue	4	1,422	1,296	4,126	2,633	A	0,933
Chicago	6	1,559	3,349	6,185	9,887	A	1,000
Congo	6	1,71	2,79	5,684	2,898	A	0,948
Daunomycin	1	1,302	2,631	4,945	0,089	A	0,522
Hematin	4	1,516	2,809	5,519	3,669	A	0,975
Hemin	4	1,487	2,735	5,692	6,865	A	0,999
Hexadecil	1	1	0,327	2,947	5,482	A	0,996
Meclocycline	2	1,258	2,436	4,862	4,326	A	0,987
MMM	1	1	-0,1	2,938	7,988	A	1,000
Neocuproine	2	1,487	0	3,714	-0,424	I	0,396
Norapo	1	1,33	0,677	4,023	1,917	A	0,872
Nordihidroguaretic	0	1,311	0,612	4,466	5,070	A	0,994
Rolitetracycline	3	1,288	2,514	4,925	5,650	A	0,996
Vanillin	0	1,314	-1	3,048	0,871	A	0,705
Grupo inactivo^a							
Curcumin	0	1,51	1,403	4,812	-3,569	I	0,027
Dihidroxibenzofenona	0	1,462	0,154	3,691	-5,215	I	0,005
Eosin	0	1,45	1,993	4,602	-7,033	I	0,001
Fenol red	0	1,312	1,942	4,114	-6,494	I	0,002
Indometacin	1	1,37	1,399	4,047	-3,687	I	0,024
Juglone	0	1,385	-0,521	3,365	-1,512	I	0,181

Lacmoid	2	1,537	2,351	4,955	-4,371	I	0,012
Myricetin	0	1,387	0,903	4,264	-1,434	I	0,193
Perphenazine	3	1,341	1,967	3,972	-2,282	I	0,093
Quinacrine	3	1,444	1,591	4,103	-2,452	I	0,079
Rifamycin	1	1,382	2,916	4,437	-9,521	I	0,000
Rodamine B	2	1,504	2,243	4,698	-5,034	I	0,006
Tioflavin T	2	1,394	0,588	3,851	0,720	A	0,673

- a** Clasificación experimental de la actividad anti-amiloide de los compuestos utilizados como material de partida para realizar el segundo análisis de discriminante lineal (LDA) (A, activo; I, inactivo);
- b** Valor de la función discriminante, DF2, obtenido para cada compuesto ($DF_2 = (2.269 \times nN) - (36.288 \times PCR) - (6.076 \times EEig11r) + (9.792 \times VEA1) + 12.631$); donde nN (número de átomos de nitrógeno), PCR (relación del recuento de caminos múltiples sobre el recuento de caminos, $EEig11r$ es el valor propio 11 de la matriz de adyacencia de bordes ponderado por integrales de resonancia) y VEA1 (suma de coeficientes de los autovectores de la matriz de adyacencia).
- c** Clasificación obtenida al aplicar DF2 (un compuesto se clasificará como un potente compuesto anti-amiloide, A, si tiene un valor discriminante DF2 mayor que 0; y como un compuesto no potente anti-amiloide, I, si tiene un valor discriminante DF2 menor que 0).
- P.A: Probabilidad de ser Activo.

Ejemplo 3: Modelado de la actividad antiagregante de proteínas LIC₅₀ y identificación de compuestos.

El tercer modelo se centra en predecir el valor LIC₅₀ para compuestos con actividad antiagregante de proteínas. Para construir el modelo se han empleado compuestos anti-amiloides reportados en la literatura con una potencia IC₅₀ < 20 µM. La propiedad ha sido modificada a LIC₅₀ para visualizar mejor el orden de magnitud de la propiedad. Se ha aplicado un análisis de regresión lineal múltiple para obtener la ecuación 3:

$$\log IC_{50} = (-1.321 \times nX) - (79.292 \times JGI8) + (85.529 \times JGI10) + 0.979;$$

$$R^2=0.816; \quad Q^2=0.577; \quad SEE=0.380; \quad F=16.273; \quad p < 0.0002$$

N: Número de muestras activas experimentalmente cuando fueron evaluadas

R²: Coeficiente de Determinación

Q²: Coeficiente de Predicción (determinado por validación cruzada)

15 SEE: Error Estándar de Estimación

F: Parámetro de Fisher-Snedecor

p: Significación estadística

logIC₅₀ incluye los siguientes descriptores: nX (número de átomos de halógeno), JGI8 (índice de carga topológica media de orden 8), y JGI10 (índice de carga topológica media de orden 10). Todos los descriptores reportados fueron calculados con el software Dragon. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Compuestos	nX	JGI8	JGI10	LIC ₅₀ exp ^a	LIC ₅₀ pred ^b
Azure	0	0,016	0	-1,046	-0,290
Basic Blue	1	0,015	0,01	-0,921	-0,676
Chicago	0	0,013	0,009	0,412	0,718
Congo	0	0,01	0,008	1,000	0,870
Daunomycin	0	0,015	0,008	0,874	0,474
Hematin	0	0,011	0,011	1,201	1,048
Hemin	0	0,01	0,01	0,678	1,041
Hexadecil	0	0,006	0,005	0,886	0,931

Meclocycline	1	0,015	0,008	-0,602	-0,847
MMM	0	0,007	0,006	1,202	0,937
Neocuproine	0	0	0	1,241	0,979
Norapo	0	0,02	0	-0,081	-0,607
Nordihidroguaretic	0	0,009	0,01	1,160	1,121
Rolitetracycline	0	0,015	0,007	0,272	0,388
Vanillin	0	0	0	0,789	0,979

a Valor experimental de inhibición (log)

b Valor calculado de inhibición (log)

5 **Ejemplo 4: Validación experimental de los compuestos identificados mediante el método de la invención**

En la Tabla 4 se enumeran 22 compuestos que se predice tienen actividad antiagregante de proteínas mediante el enfoque de topología molecular, junto con sus respectivos valores de DF1, DF2 y LIC₅₀. Las bases de datos comerciales de compuestos químicos de eMolecules, Sigma-Aldrich y Specs fueron sometidas al método de la invención para llegar a los 22 compuestos de la Tabla 4.

TABLA 4

Compuesto	DF ₁	Class.	P.A.	DF ₂	Class.	P.A.	LIC ₅₀ pred
2-amino-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)propanoic acid	4,346	A	0,987	4,319	A	0,987	0,186
8-carbamoyl-2-(furan-2-yl)imidazo[1,5-a]pyrimidine-4-carboxylic acid	6,070	A	0,998	8,146	A	1,000	-0,290
6-chloro-1H-indole-2-carboxylic acid	4,325	A	0,987	3,408	A	0,968	-0,342
2-((3-methylfuran-2-carboxamido)methyl)furan-3-carboxylic acid	1,322	A	0,790	5,588	A	0,996	0,107
5-amino-3-phenyl-2-thioxo-2,3-dihydrothiazole-4-carboxamide	6,540	A	0,999	5,673	A	0,997	0,979
6-chloroimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxylic acid	2,862	A	0,946	5,120	A	0,994	-0,342
5-(thiophen-2-yl)-7-(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide	9,688	A	1,000	10,117	A	1,000	-4,253
[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2-carboxamide	4,391	A	0,988	11,856	A	1,000	0,979
3,6-diamino-N-(2-carbamoylphenyl)-5-cyanothienol[2,3-b]pyridine-2-carboxamide	8,953	A	1,000	4,430	A	0,988	1,048

ES 3 063 428 A1

3,6-diamino-5-cyano-N-(3,4-difluorophenyl)thienol[2,3-b]pyridine-2-carboxamide	7,895	A	1,000	5,531	A	0,996	-2,003
2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine	7,209	A	0,999	4,898	A	0,993	-10,461
5-amino-7-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-1-ciclopropyl-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	5,233	A	0,995	11,919	A	1,000	-1,759
6-ethyl 8-methyl (Z)-5-amino-7-(furan-2-yl)-2-(furan-2-ylmethylene)-3-oxo-2,3-dihydro-7H-thiazolo[3,2-a]pyridine-6,8-dicarboxylate	3,322	A	0,965	2,589	A	0,930	0,370
3-amino-2-((2,6-dimethylphenyl)carbonyl)-6-oxo-6,7-dihydrothieno[2,3-b]pyridine-5-carboxylic acid	6,563	A	0,999	2,836	A	0,945	1,279
(1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethylenediamine	6,046	A	0,998	7,394	A	0,999	-12,901
(1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethylenediamine	6,046	A	0,998	7,394	A	0,999	-12,901
3-amino-5-bromo-1H-indole-2-carbohydrazide	8,807	A	1,000	8,929	A	1,000	-0,342
2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	6,550	A	0,999	4,052	A	0,983	-1,663
N''-[(E)-[(thiophen-2-yl)methylidene]amino]guanidine	3,559	A	0,972	6,551	A	0,999	0,979
2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4H-thiopyran-3,5-dicarbonitrile	10,411	A	1,000	6,215	A	0,998	-0,342
Pyrazine-2,3,5-tricarboxamide	4,461	A	0,989	10,469	A	1,000	0,979
4-(3-bromobenzyl)-1H-pyrazole-3,5-diamine	9,339	A	1,000	8,147	A	1,000	-0,342
(S)-2-amino-2-(1H-indol-3-yl)acetic acid	5,065	A	0,994	4,901	A	0,993	0,979

Estos compuestos fueron clasificados como Compuestos Activos (A) con los modelos DF1 y DF2. El LIC₅₀ predice la concentración mínima inhibitoria que poseen estos compuestos. Los 22 compuestos de la Tabla 4 tienen un valor de LIC₅₀ menor a 1.3, lo que equivale a un IC₅₀ de 20 mM.

5

Después de la selección de compuestos identificados como inhibidores de *biofilm* y/o amiloides mediante topología molecular, se realizó un experimento cinético de polimerización con algunos de estos compuestos.

Ejemplo 4.1 Actividad anti-biofilm contra *Bacillus subtilis* NCBI3610.

Los compuestos seleccionados se probaron primero contra un modelo formador de *biofilm* para evaluar su actividad *anti-biofilm*. Debido a su capacidad para formar películas flotantes robustas en cultivos líquidos estáticos, se eligió *Bacillus subtilis* para realizar una prueba de actividad de los compuestos seleccionados. Para evaluar el desarrollo del *biofilm* de *B. subtilis* NCIB3610, se utilizó un ensayo de formación de película en cultivos líquidos estáticos. Antes de aplicar los tratamientos, se cultivó *B. subtilis* en una placa de Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante la noche. Se tomó una colonia y se resuspendió en 5 mL de medio líquido LB, incubándose a 30 °C durante la noche con agitación. Las células se recolectaron (8,000g, 10 min) y se resuspendieron en cultivo MSgg (5 mM KH₂PO₄ y 100 mM MOPS a pH 7 suplementado con 2 mM MgCl₂, 700 μM CaCl₂, 50 μM MnCl₂, 50 μM FeCl₃, 1 μM ZnCl₂, 2 μM tiamina, 0.5% glicerol, 0.5% glutamato) para alcanzar una DO₆₀₀ de 0.1. Los compuestos identificados mediante topología molecular se disolvieron en DMSO y la solución stock se diluyó en la suspensión bacteriana para alcanzar una concentración final equivalente al IC₅₀ calculado, 100 y 1,000 μM. También se incluyó una solución acuosa con 2.65% de DMSO como control negativo. Las diferentes muestras (controles y compuestos) se cultivaron en medio MSgg en una placa de microtitulación de 24 pocillos y se incubaron sin agitación a 30 °C durante 48 y 72 horas. Los resultados positivos se seleccionaron en función de la alteración o ausencia de las típicas arrugas que se dan en la película. La Tabla 5 y la Figura 1A muestran la inhibición del *biofilm* de los compuestos seleccionados identificados por el método de la invención en *Bacillus subtilis*. Los compuestos que provocaron una inhibición del crecimiento celular también se evaluaron, en principio, como inhibidores del *biofilm*. Varios compuestos mostraron eficacia al alterar la morfología del *biofilm* en comparación con el control negativo.

25

TABLA 5

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (μM)	<i>Bacillus subtilis</i> NCBI3610
		<i>Biofilm morphology</i>
Agua (control)	-	<i>Biofilm normal</i>
DMSO (control)	339	<i>Biofilm normal</i>
2-amino-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)propanoic acid	100	<i>Biofilm alterado</i>
2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine	100	<i>Biofilm alterado</i>
5-amino-7-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-1-ciclopropyl-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	100	<i>Biofilm alterado</i>

(1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethylenediamine	100	<i>Biofilm</i> alterado
(1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethylenediamine	100	<i>Biofilm</i> alterado
3-amino-5-bromo-1 <i>H</i> -indole-2-carbohidrazide	100	Inhibición del crecimiento
2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	100	<i>Biofilm</i> alterado
2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	100	<i>Biofilm</i> alterado

Ejemplo 4.2 Actividad anti-amiloide contra la proteína TasA medida mediante fluorescencia de Tioflavina T (ThT).

5 Con el fin de confirmar la unión específica frente a una proteína amiloide de los compuestos identificados en el método de la invención (actividad anti-amiloide), se desarrolló una cuantificación de la formación de fibrillas utilizando Tioflavina T (una pequeña molécula que emite una fuerte fluorescencia al unirse a amiloides). Para ello, la proteína TasA, como el componente proteico principal de la matriz extracelular del *biofilm* de *Bacillus subtilis*, ha demostrado evidencia bioquímica de su naturaleza amiloide. De hecho, TasA forma filamentos con actividad de unión a colorantes como Tioflavina T o Rojo Congo, proporcionando un punto de partida para investigar el objetivo del compuesto seleccionado y corroborar su efectividad como inhibidor de *biofilm*. Por lo tanto, este experimento se realizó con los compuestos que dieron un resultado positivo en el experimento anterior.

Previamente, la proteína TasA fue purificada mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli* bajo condiciones desnaturizantes. Brevemente, se tomó una sola colonia transformada de *E. coli* BL21(DE3) y se cultivó en 10 mL de medio LB con 100 mg/mL de ampicilina a 37 °C bajo condiciones de agitación durante 5 h hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Las células se recolectaron (8,000 g, 10 min) y se resuspendieron en 1 L de medio LB suplementado con antibióticos y se incubaron toda la noche a 30 °C y 200 rpm hasta que la DO600 alcanzó 0.8, y se indujo con 0.75 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido. TasA se expresó a 30 °C durante 20 h. Las células se recolectaron (6000 g, 30 min, 4 °C) y se congelaron a -80 °C hasta su purificación. Las células se resuspendieron en el buffer A (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8) y se sonicaron sobre hielo (3 x 45 s, 40%), luego se centrifugaron (15000 g, 60 min, 4 °C). El pellet se resuspendió en el buffer A suplementado con 2% de Tritón X-100, se incubó a 37 °C bajo agitación durante 20 min y se centrifugó (50000 g, 10 min, 4 °C). El pellet se lavó exhaustivamente con buffer A, se centrifugó (50000 g, 10 min, 4 °C), se

resuspendió en condiciones desnaturalizantes (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, clorhidrato de guanidina 6M) y se incubó a 60 °C toda la noche hasta su solubilización completa. El lisado se aclaró mediante centrifugación (200000 g, 1 h, 16 °C). Los cuerpos de inclusión solubilizados se cargaron en una columna His Trap HP de 5 mL (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) previamente equilibrada en el buffer de unión (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 8 M urea, pH 8). Las proteínas se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de buffer de elución (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, 8 M urea, pH 8). Después del paso de cromatografía de afinidad, las proteínas se cargaron en una columna de desalinización HiPrep 26/10 (GE Healthcare) para intercambiar el buffer por ácido acético al 1% y pH 3. Las fracciones de purificación se cargaron en un SDS-PAGE de Tris-Tricina al 13% para verificar la pureza.

La fluorescencia de ThT se midió con un filtro de excitación de 440 nm y un filtro de emisión de 480 nm con una solución de 15 mM de ThT, 30 µM de proteína purificada, y los compuestos con actividad *anti-biofilm* se añadieron a una concentración final de 100 µM. Las mediciones se registraron por triplicado cada minuto, y se comparó el aumento de la intensidad de fluorescencia entre los compuestos y el control negativo durante un total de 72 horas (Figura 1C).

TABLA 6

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (µM)	Proteína TasaA (30 µM)	
		ThT incremento de la fluorescencia (a.u.) ^a	Fluorescencia (%) ^b
DMSO	339	60108	100
2-amino-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)propanoic acid	100	18752	31,20
2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine	100	51548	85,76
5-amino-7-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-1-ciclopropyl-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	100	39532	65,77
(1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethylenediamine	100	58379	97,12
(1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethylenediamine	100	53091	88,33
3-amino-5-bromo-1H-indole-2-carbohydrazide	100	18418	30,64
2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	100	23001	38,27
2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4H-thiopyran-3,5-dicarbonitrile	100	30005	49,92

^a Los valores representan la diferencia entre la intensidad de fluorescencia más alta y la más baja

^b Los valores representan el porcentaje de eficacia en términos de aumento de fluorescencia en comparación con el control. Cuanto menor es el valor, mayor es la actividad anti-amiloide.

Tabla 6 muestra la actividad anti-amiloide de los compuestos identificados por el método de la invención sobre la proteína TasA de *B. subtilis* 3610. El control, cuya eficacia para formar fibras amiloides que se enlazan con el tinte de tioflavina T, tiene un valor establecido de 100% de eficacia. Cuatro compuestos mostraron la actividad inhibidora de *biofilm* más significativa sobre TasA (aquellos con un valor de fluorescencia inferior al 50% en comparación con el control) a 100 µM:

- Ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopiran-3,5-dicarbonitrilo.

Ejemplo 4.2. Efecto de los compuestos en la curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* 3610

El ensayo de curva de crecimiento es una buena herramienta para evaluar si la concentración de los compuestos empleados en el ensayo de *biofilm* afecta al crecimiento bacteriano debido a toxicidad celular. De acuerdo con el ensayo de *biofilm*, dos compuestos identificados por topología molecular mostraron ausencia de bacterias después de 72 h en medio de cultivo estático, por lo que se espera que las curvas de crecimiento para estos compuestos no muestren fase exponencial.

Para realizar este ensayo, placas de 48 pocillos llenas con medio MSgg se inocularon con 5 µL de un pre-cultivo de *Bacillus subtilis* 3610 en cada pocillo, y la concentración final de cada compuesto se estableció en 100 µM. La dispersión óptica a 600 nm se midió en un espectrofotómetro (FLUORstar® Omega, BMG Labtech). La temperatura se fijó a 30 °C y agitación continua por un total de 15 horas.

La mayoría de los 8 compuestos seleccionados de las Tablas 5 y 6 no afectaron el crecimiento bacteriano en comparación con el control (Figura 1D). Sin embargo, dos compuestos inhibieron la fase exponencial durante el análisis:

- Ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico, y
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida.

Curiosamente, el efecto de estos dos compuestos sobre la formación de amiloides en la proteína TasA, estudiado previamente, fue notablemente diferente, como se muestra en la Tabla 6.

5 **Ejemplo 4.3. Análisis por microscopía electrónica**

La eficiencia en la inhibición de la polimerización de las fibras fue estudiada por microscopía electrónica después de 72 horas de incubación. También se investigaron los efectos de los compuestos seleccionados sobre la morfología de TasA. Para ello, muestras de proteína TasA purificada se incubaron en presencia de los compuestos que
10 afectaron las mediciones de fluorescencia de ThT para realizar la fibrilización a una concentración de 100 μ M. Además, una muestra tratada con DMSO se utilizó como control.

Para el análisis de tinción negativa, las soluciones de proteínas se colocaron sobre una rejilla recubierta de formvar/carbono durante 1 hora. El exceso de líquido se eliminó con
15 papel de filtro, y la rejilla se lavó con agua Milli-Q antes de teñirla con una solución acuosa al 1% de acetato de uranilo durante 1 minuto. Finalmente, cada rejilla se observó con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 20 TWIN a un voltaje de aceleración de 80 KV. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD AMT de 2k.

En el control tratado con DMSO, se observó un sistema de fibras esperado formando
20 una red, como se muestra en la Figura 1B. En contraste, los siguientes compuestos, que mostraron eficacia en reducir la fluorescencia de ThT por debajo del 50% (Tabla 6), solo formaron algunos agregados o fibras individuales, siendo consistente con los datos mostrados en los análisis cinéticos:

- Ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
- 25 - 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopiran-3,5-dicarbonitrilo.

Ejemplo 4.3. Citometría de flujo

Mediante citometría de flujo, se pueden analizar los niveles de expresión del gen del
30 promotor *tasA* en *B. subtilis* NCBI3610 para probar si los compuestos afectan la expresión de la proteína antes de la síntesis o, por el contrario, su actividad se desencadena en el paso de polimerización subsecuente.

ES 3 063 428 A1

Para este propósito, se realizó una fusión transcripcional con el promotor del gen *tasA* y una proteína fluorescente amarilla (YFP), insertada en el locus neutral *amyE* (*B. subtilis* NCBI3610 *amyE::PtasA-yfp*).

Las células silvestres y transformadas se cultivaron en medio MSgg a 30 °C en presencia de compuestos inhibidores de *biofilm*. Dos compuestos (ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico y 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida) fueron excluidos de este análisis debido a sus propiedades antibacterianas. A las 48 y 72 horas, se recuperaron colonias en 500 µL de tampón PBS y se trataron con sonicación leve (10-12 pulsos por segundo a una amplitud del 20%) para asegurar una resuspensión completa. Las células se recuperaron por centrifugación y se fijaron en para-formaldehído al 4% en PBS (200 µL). Después de 7 minutos de incubación a temperatura ambiente, el pellet resultante se lavó dos veces en PBS (500 µL).

Las ejecuciones de citometría de flujo se realizaron con una suspensión de células y compuestos en 500 µL de tampón GTE (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl; pH 8), y las células se midieron en un citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter) usando una excitación de 488 nm. La fluorescencia YFP se detectó con un filtro 550 SP, y los datos se recopilaron usando el software Gallios™ v1.2 y se analizaron con Flowing software v2.5.1. Se usaron controles negativos correspondientes a células bacterianas no teñidas para discriminar las poblaciones de bacterias teñidas en los experimentos relevantes y para el tinte (Figura 1E).

TABLA 7

Compuesto	Conc. (µM)	Células positivas / células totales		% de células positivas	
		48 h	72 h	48 h	72 h
DMSO	339	237877/24429	28504/28524	97,37	99,93
2-amino-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)propanoic acid	100	18032/18708	27827/27864	96,39	99,87
2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine	100	281/6154	2009/12301	4,57	16,33
(1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethyle nediamine	100	1029/9131	385/8729	11,27	4,41
(1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethyle nediamine	100	11271/19899	1844/10385	56,64	17,76
2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	100	27998/28027	28626/29104	99,90	98,36

2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	100	974/10462	9893/20110	9,31	49,19
---	-----	-----------	------------	------	-------

Tabla 7 muestra el efecto inhibitorio de compuestos seleccionados sobre el promotor del gen *tasA* en *B. subtilis* NCBI3610. Se utilizó un control de DMSO para confirmar el efecto inocuo del solvente. Los compuestos con el efecto más significativo y persistente sobre la expresión del promotor del gen *tasA*, de acuerdo con el análisis realizado, fueron:

- 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
- (1*S*,2*S*)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilendiamina, y
- (1*R*,2*R*)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilendiamina.

Esta es la razón por la cual estos 3 compuestos muestran menos efecto en la actividad cinética de polimerización con la proteína *TasA*, ya que afectan la expresión de la proteína antes de su síntesis. Compara la actividad de estos 3 compuestos en la Tabla 6 versus la Tabla 7.

Ejemplo 5: Validación experimental de la actividad anti-amiloide de los compuestos mediante experimento de polimerización acinética contra péptidos amiloides

El péptido amiloide de 4 kDa (péptido A β) fue aislado inicialmente como el componente principal de la acumulación de fibras amiloides en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y personas con síndrome de Down. Entre las diferentes especies de A β existentes, aquellas que comprenden 40 residuos de aminoácidos (A β 40) son las más abundantes (~80-90%), seguidas por las compuestas de 42 residuos de aminoácidos (A β 42, ~5-10%), que son más hidrofóbicas y propensas a adoptar formas fibrilógenas. Ambos péptidos son las especies principales depositadas en cerebros afectados.

Para probar la efectividad de los compuestos seleccionados contra dichos péptidos amiloides, se estudió su curva de cinética de polimerización en presencia del compuesto tioflavina T (15 mM). Las concentraciones del péptido y los compuestos seleccionados se establecieron respectivamente en 2 μ M y 100 μ M. Además, se utilizó un control con 2,65% de DMSO para asegurar que el efecto se debía únicamente a los compuestos. La solución resultante se incubó a temperatura ambiente y la fluorescencia de ThT se midió por triplicado con un filtro de excitación de 440 nm y un filtro de emisión de 480

nm, y se comparó el aumento en la intensidad de fluorescencia entre los compuestos y el control negativo (Figura 2A y B) y Tabla 8.

TABLA 8

COMPUESTO	CONC. (μM)	A β -42 (2 μM)		A β -40 (2 μM)	
		ThT incremento de fluorescencia (a.u.) ^a	Fluorescencia (%) ^b	ThT incremento de fluorescencia (a.u.) ^a	Fluorescencia (%) ^b
DMSO	339	122423	100	1477,25	100
2-amino-3-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)propanoic acid	100	119964	97,99	No evaluado	No evaluado
2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine	100	75421	61,61	No evaluado	No evaluado
5-amino-7-(4-carbamothioylpiperazin-1-yl)-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	100	75385	61,58	No evaluado	No evaluado
Bis(pentafluorophenyl)ethylenedia mine	100	90087	73,59	No evaluado	No evaluado
Bis(pentafluorophenyl)ethylenedia mine (1R,2R)-1,2-	100	76024	62,10	No evaluado	No evaluado
3-amino-5-bromo-1H-indole-2-carbohidrazide	100	1912	1,56	1,52	0,10
2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	100	4046	3,30	52,46	3,55
2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4H-thiopyran-3,5-dicarbonitrile	100	8607	7,03	72,46	4,91

^a Los valores representan la diferencia entre la intensidad de fluorescencia más alta y la más baja
^b Los valores representan el porcentaje de eficacia en términos de aumento de fluorescencia comparado con el control. Cuanto más bajo sea el valor de la fluorescencia, mayor será la actividad anti-amiloide.

Como se muestra en la Tabla 8, todos los compuestos probados mostraron algún nivel de eficacia inhibiendo la polimerización de una solución de péptido amiloide (A β -42). Los compuestos con la actividad anti-amiloide más fuerte según el análisis de fluorescencia de ThT realizado fueron:

- 5
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y
 - 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiofuran-3,5-dicarbonitrilo.
- 10

Ejemplo 5.1: Análisis de microscopía electrónica

Para probar el impacto de los diferentes compuestos sobre la disposición y morfología de las fibras del péptido beta amiloide (A β -42), se llevó a cabo un análisis de microscopía electrónica de una solución de péptido incubada con los compuestos identificados por el método de la invención a una concentración de 100 μ M.

15

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 4.3. Las soluciones de péptidos se colocaron en una rejilla recubierta de formvar/carbono durante 1 hora. El exceso de líquido se descargó sobre un papel filtro, y la rejilla se lavó con agua Mili-Q antes de ser teñida con una solución acuosa de acetato de uranilo al 1% durante 1 minuto. Las rejillas se observaron luego con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 20 TWIN con un voltaje de aceleración de 80 KV. Las imágenes fueron tomadas con una cámara CCD AMT 2k. Se utilizó una muestra de péptido con DMSO al 2,65% como control.

20

La Figura 2B muestra que, nuevamente, el efecto antiagregante más dramático se encuentra con los siguientes compuestos:

25

- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiofuran-3,5-dicarbonitrilo.

De hecho, la agregación amiloide y la posterior red fibrilar observada en el control tratado con DMSO ya no se establecen en las muestras tratadas con estos compuestos. En su lugar, se formaron pocos agregados pequeños con algunas fibras aisladas, como se puede ver en la Figura 2B.

30

Es digno de destacar el comportamiento distintivo de la siguiente molécula:

- 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico.

Este compuesto tiene una potente actividad *anti-biofilm* como se puede ver en las Tablas 5 y 6, donde muestra una notable eficacia en la reducción de la fluorescencia de Thioflavin T después de incubar dicho compuesto con TasA. Además, redujo considerablemente la fibrilización cuando se observó en microscopía electrónica (Figura 1B). Sin embargo, cuando se prueba contra el péptido amiloide, no se observan efectos sobre la formación de fibras. Por lo tanto, se hipotetiza que la actividad específica de este compuesto está dirigida a un amiloide funcional como el caso de TasA.

Ejemplo 6: Validación experimental de la actividad anti-amiloide de los compuestos mediante un experimento de polimerización cinética contra la alfa-sinucleína.

La proteína neuronal presináptica α -sinucleína (α -syn) contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson mediante formas oligoméricas solubles anormales, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos que puedan revertir o evitar la polimerización de la α -sinucleína es de gran interés en el campo de la medicina.

Se realizó un estudio basado en fluorescencia similar a los descritos anteriormente. Se probó la actividad de los siguientes compuestos:

- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida, y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiofuran-3,5-dicarbonitrilo.

Se utilizaron tres concentraciones diferentes de los compuestos (1, 10 y 100 μ M), mientras que las concentraciones de Thioflavin T y α -syn se fijaron en 15 y 2 μ M, respectivamente. Se midió la fluorescencia de ThT con un filtro de excitación de 440 nm y un filtro de emisión de 480 nm, y se registraron en quintuplicado cada minuto, comparándose el aumento de la intensidad de fluorescencia entre los compuestos y el control negativo durante un total de 500 horas.

TABLA 9

Compuesto	Concentración (μ M)	ThT incremento de fluorescencia (a.u.) ^a	Fluorescencia (%) ^b
DMSO	339	5583752,5	100
3-amino-5-bromo-1H-indole-2-carbohydrazide	100	616568,8	11,04
	10	997574,4	49,01
	1	3600518,4	64,48
	100	2716621,8	48,65
	10	4012770,6	71,87

2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	1	6308039,8	112,97
2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4H-thiopyran-3,5-dicarbonitrile	100	2607437,8	46,70
	10	4397670	78,76
	1	6012397,3	107,68
^a Los valores representan la diferencia entre la intensidad de fluorescencia más alta y la más baja ^b Los valores representan el porcentaje de eficacia en términos de aumento de fluorescencia comparado con el control. Cuanto más bajo sea el valor de la fluorescencia, mayor será la actividad anti-amiloide			

Tabla 9 muestra la eficacia de los compuestos seleccionados en inhibir la polimerización de α -sinucleína medida por el aumento de la fluorescencia de ThT a lo largo del tiempo. Cuanto mayor es la concentración probada, mayor es la eficacia en inhibir la polimerización, siendo el efecto más fuerte a 100 μ M con los tres compuestos. Curiosamente, el compuesto 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida mostró, una vez más, la mayor capacidad para inhibir la formación de polímeros de α -sinucleína. Aún se observó una buena actividad anti-amiloide cuando se probaron concentraciones bajas (10 μ M y 1 μ M).

10

Ejemplo 7: Validación experimental de la actividad anti-amiloide de los compuestos mediante un experimento de polimerización cinética contra la proteína priónica

Algunos de los compuestos identificados con el método de la invención fueron probados adicionalmente para determinar su efectividad contra otras proteínas amiloides de relevancia clínica significativa. Los agentes infecciosos proteicos llamados priones son responsables de la transmisión de enfermedades priónicas, como las encefalopatías espongiiformes transmisibles (TSEs) en algunos animales con potencial zoonótico conocido. Las TSEs son causadas por la acumulación de una forma anormal de la proteína priónica (PrPSc), que es una versión mal plegada de la proteína normal PrPC.

La PrPSc es un polímero de tamaño variable que puede formar grandes agregados fibrilares, semejantes a las fibras amiloides, y es el principal componente del agente infeccioso. Al igual que otras proteínas amiloides, la PrPSc presenta una notable resistencia a la proteólisis u otros procesos de degradación, por lo que la identificación de nuevos agentes químicos con la capacidad de inhibir su polimerización sigue siendo una necesidad no satisfecha.

25

Para probar la eficacia en la inhibición de la polimerización de la proteína priónica de los compuestos seleccionados, se utilizaron cepas de RML (cepas priónicas adaptadas a

ratón derivadas de material natural de Prúrigo lumbar en ovejas) y 301C (cepas priónicas adaptadas a ratón de encefalopatías espongiformes bovinas).

Se realizó la técnica de *Cyclic Amplification of Prion protein Missfolding* (PMCA, por sus siglas en inglés) en presencia de los compuestos seleccionados como se describió previamente en Saborio, G. P et al. Para las cepas RML, se probaron muestras en tres concentraciones (10^{-4} a 10^{-6} , diluciones de un extracto cerebral al 10% p/v recolectado de un ratón clínicamente enfermo), mientras que las 301C solo se fijaron a una concentración de 10^{-7} . Finalmente, los compuestos seleccionados fueron investigados en concentraciones de 1, 10 y 100 μM .

Los tubos de PCR se cargaron con las cepas priónicas y los compuestos identificados por el método de la invención y se colocaron en un adaptador que se situó en el soporte de placas de un microsonicador (modelo Misonix 4000). Las muestras se sometieron a ciclos de incubación de 30 minutos a 37 °C seguidos de un pulso de 20 segundos de sonicación con una amplitud de 75. Las muestras se incubaron sin agitación sumergidas en el baño de agua del sonicador. Los ciclos estándar de PMCA consistieron de 144 ciclos. Después de un ciclo, una alícuota de 10 μL del material amplificado se diluyó en 90 μL de homogeneizado cerebral normal (NBH) y se realizó un nuevo ciclo de PMCA.

Las muestras de control y amplificadas fueron digeridas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína K a 37 °C durante 1 hora y agitadas a 450 rpm (para visualizar los priones resistentes a PK asociados con la enfermedad), y la reacción se detuvo añadiendo un tampón de muestra NuPAGE LDS. Las proteínas se fraccionaron luego mediante SDS-PAGE al 4-12%, se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL y se probó con el anticuerpo 6D11 (Covance) (dilución 1:5,000). Las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas mediante el sistema de detección western blot ECL Plus y cuantificadas por densitometría utilizando un sistema de bioimagen UVP EC3. También se probaron controles con DMSO a diferentes concentraciones para confirmar que el disolvente no afectaba la polimerización de los priones.

TABLA 10

Compuesto	Concentración (μM)	RML			301C
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
DMSO	339	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	33.9	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	3.39	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto

3-amino-5-bromo-1 <i>H</i> -indole-2-carbohidrazide	100	activa	activa	activa	activa
2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	100	Sin efecto	Sin efecto	activa	activa

Tabla 10 resume el efecto inhibitor de los dos compuestos seleccionados identificados. No se encontró actividad por debajo de 100 μM en ninguna de las concentraciones de prion probadas.

- 5 Nuevamente, el compuesto 3-amino-5-bromo-1*H*-indol-2-carbohidrazida mostró el efecto más fuerte a 100 μM . Dicha actividad se confirmó en cualquier dilución de prion y para ambas especies. El compuesto 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4*H*-tio-piran-3,5-dicarbonitrilo fue capaz de inhibir la cepa priónica RML en la dilución más baja (10^{-6}), así como la única dilución priónica 301C probada (10^{-7}), por lo que estos compuestos son
- 10 buenos inhibidores en varias diluciones de proteína priónica, y el método de la invención también es útil para identificar compuestos que puedan ser utilizados contra enfermedades priónicas.

Ejemplo 8: Acoplamiento molecular de proteínas amiloides con compuestos seleccionados

15 Se realizó un experimento de acoplamiento molecular para mapear las interacciones entre los compuestos con mejor actividad antiagregante de proteínas y las proteínas estudiadas en esta invención. Los análisis también pudieron confirmar los sitios de unión potenciales para estos compuestos. Se adquirieron las estructuras proteicas disponibles

20 correspondientes de la Protein Databank, incluyendo la proteína TasA, los péptidos amiloides (A β -42 y A β -40) y α -sinucleína. El acoplamiento molecular automático y el análisis termodinámico se realizaron utilizando el servidor web SwissDock (www.swissdock.ch/docking) y Autodock Vina.

25 SwissDock se basa en el algoritmo de acoplamiento EADock DSS. Las energías de unión se estiman utilizando CHARMM (Química en HARvard Macromolecular Mechanics), un algoritmo de simulación molecular implementado dentro del software SwissDock, por lo que las energías más favorables se evalúan mediante FACTS (Fast Analytical Continuum Treatment of Solvation). Finalmente, los resultados se puntúan y clasifican según el parámetro de ajuste completo (Kcal/mol) y la energía libre estimada

30 (ΔG) (Kcal/mol). Tanto los resultados de modelado como de acoplamiento se visualizaron utilizando el software UCSF Chimera v1.8.

ES 3 063 428 A1

Los cuatro compuestos seleccionados para este experimento mostraron la mejor actividad antiagregante de proteínas:

- 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 5 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofen-3-carboxamida y
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tio-piran-3,5-dicarbonitrilo.

TABLA 11

Receptor	Ligando	Fullfitness ^a (Kcal/mol)	ΔG^b (Kcal/mol)	HB ^c	Residuos	Distancia (Å)
Tasa	2-amino-3-(5-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propanoic acid	-1229.16	-4.00	2	S54, K68	2.75, 2.46
	3-amino-5-bromo-1 <i>H</i> -indole-2-carbohydrazide	-1228.12	-4.68	2	D202	1.86, 1.9
	2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	-1261.19	-0.89	2	A53, K68	2.39, 2.31
	2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	-1282.2	9.77	2	N56, K68	2.15, 2.26
Aβ-42	2-amino-3-(5-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propanoic acid	-457.73	-5.729	2	D1, E22	1.53, 1.87
	3-amino-5-bromo-1 <i>H</i> -indole-2-carbohydrazide	0.00 ^d	-4.7	1	Q15	2.14 10
	2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	-486.78	5.3	1	E22	1.92
	2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	-508.5	11.43	2	A21, N27	2.65, 1.89
Aβ-40	2-amino-3-(5-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propanoic acid	-457.61	-5.74	2	D1, E22	1.85, 1.87
	3-amino-5-bromo-1 <i>H</i> -indole-2-carbohydrazide	0.00 ^d	-4.6	3	Q15, E22	1.95, 2.47, 2.16
	2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	-486.77	5.22	1	E22	1.92
	2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	-508.42	11.42	2	E22, N27	1.94, 2.45
α-synuclein	2-amino-3-(5-hydroxy-1 <i>H</i> -indol-3-yl)propanoic acid	-6494.28	-13	1	E61	1.8
	3-amino-5-bromo-1 <i>H</i> -indole-2-carbohydrazide	0.00 ^d	-6.7	1	T64	1.86
	2-amino-4-(3,4-difluorophenyl)thiophene-3-carboxamide	-6529.8	-6.51	3	E61	1.88, 2.3, 2.29
	2,6-diamino-4-(3-fluorophenyl)-4 <i>H</i> -thiopyran-3,5-dicarbonitrile	-6544.03	10.53	0		

^a Valor de puntuación del análisis de SwissDock

^b Energía libre de Gibbs

^c Enlaces de Hidrogeno

^d Valor de puntuación de Autodock Vina expresado como desviación cuadrática media (Root-mean square deviation)

Según los datos mostrados en la Tabla 11, los compuestos con las mejores características de interacción con las proteínas estudiadas son:

- 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico ácido
- 5 - 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirán-3,5-dicarbonitrilo

Aunque el primer compuesto no mostró actividad contra la proteína amiloide (A β -42), los resultados obtenidos para este compuesto sugieren que la interacción puede tener una menor eficacia en la prevención de la amiloidosis. En cambio, el segundo compuesto forma enlaces de hidrógeno en sitios de unión diferentes, y la evidencia experimental confirma que tiene las mejores características inhibitorias contra todas las proteínas β -amiloides probadas.

En conjunto, los resultados de acoplamiento molecular brindan evidencia computacional que respalda la actividad específica de estos compuestos en la prevención de la agregación proteica, a través de su unión a las proteínas β -amiloides, lo que refuerza los datos experimentales presentados en esta especificación.

REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de un compuesto con actividad antiagregante de proteínas que comprende (a) obtener para dicho compuesto un valor para una función discriminante DF1, en el que:

$$DF1 = (1.003 \times nN) - (2.374 \times nR10) - (4.125 \times ICR) - (9.523 \times GATS1v) \\ 5 + (4.309 \times ESpm08x) - 35.762$$

donde:

- nN es el número de átomos de nitrógeno,
- nR10 es el número de anillos de 10 miembros,
- ICR es el índice de información centrado radialmente,
- GATS1v es el índice de autocorrelación Geary a distancia topológica 1/ponderado por el volumen atómico de van der Waals,
- ESpm08x es el momento espectral a distancia topológica 8 de la matriz de adyacencia ponderada por los grados de enlaces; y

verificar si el valor de DF1 obtenido en (a) para dicho compuesto es mayor que 0, donde en el caso de que el valor de DF1 obtenido sea mayor que 0, dicho compuesto tiene actividad antiagregante de proteínas.

2. Método según la reivindicación 1 en el que además comprende (b) obtener para dicho compuesto de la reivindicación 1 un valor para una función discriminante DF2, en el que:

$$DF_2 = (2.269 \times nN) - (36.288 \times PCR) - (6.076 \times EEig11r) + \\ (9.792 \times VEA1) + 12.631$$

donde:

- nN es el número de átomos de nitrógeno,
- PCR es la relación entre el recuento de caminos múltiples sobre el recuento total de caminos,
- EEig11r es autovalor a distancia topológica 11 de la matriz de adyacencia ponderado por integrales de resonancia,
- VEA1 es la suma del coeficiente del autovector de la matriz de adyacencia; y

verificar si el valor DF2 obtenido en (b) para dicho compuesto es mayor que 0, donde en el caso de que el valor de DF2 obtenido sea mayor que 0 en ambos casos, dicho compuesto es identificado como un compuesto con actividad antiagregante de proteínas.

3. Método según la reivindicación 2 en el que los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente, o en el que el paso (b) se realiza antes del paso (a).

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el compuesto es un compuesto químico.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la actividad antiagregante de proteínas comprende actividad anti-amiloide y/o actividad *anti-biofilm*.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la actividad antiagregante de proteínas comprende actividad antiagregante contra una o más de las siguientes proteínas amiloides: TasA de *B. subtilis*, péptidos amiloides A β de *Homo Sapiens*, α -sinucleína de *Homo Sapiens* y proteínas priónicas.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende (c) obtener para dicho compuesto un valor predictivo del logaritmo de la actividad anti-amiloide de la concentración inhibidora media (LIC₅₀) de actividad antiagregante de proteínas, en el que:

$$LIC_{50} = (-1.321 \times nX) - (79.292 \times JGI8) + (85.529 \times JGI10) + 0.979;$$

donde:

- nX es el número de átomos de halógeno,
- JGI8 es el índice de carga topológica medio de orden 8, y
- JGI10 es el índice de carga topológica medio de orden 10;

y comprobar si el valor LIC₅₀ obtenido en la etapa (c) para dicho compuesto es inferior a +2, en cuyo caso dicho compuesto se identifica como compuesto con actividad antiagregante de proteínas.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende al menos un experimento de polimerización cinética con un compuesto con actividad antiagregante de proteínas identificado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Método según la reivindicación anterior en el que el experimento de polimerización cinética comprende probar la capacidad de una especie de bacteria seleccionada del género *Bacillus* para desarrollar un *anti-biofilm* en presencia de dicho compuesto.

10. Método según la reivindicación anterior en el que las bacterias se seleccionan del género *Bacillus*, especie *B subtilis*, más específicamente *Bacillus subtilis* NCBI3610.

11. Método según la reivindicación 8 en el que el experimento de polimerización cinética comprende poner en contacto una proteína amiloide o péptido amiloide con un compuesto con actividad antiagregante de proteínas identificado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

5

12. Método según la reivindicación 11 en el que la proteína amiloide se selecciona entre proteína TasA, péptido A β , proteína α -sinucleína y priones.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende
10 determinar

- un valor para una función de discriminación DF1,
- un valor para una función de discriminación DF2,
- un valor predictivo del logaritmo de la actividad anti-amiloide de la concentración inhibidora media (LIC₅₀) de actividad antiagregante de proteínas, y
- 15 - al menos un experimento de polimerización cinética.

14. Compuesto con actividad antiagregante de proteínas identificado mediante el método descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

20 15. Uso del compuesto según la reivindicación anterior y/o identificado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Uso de un compuesto según la reivindicación anterior en el que el compuesto químico se selecciona entre:

- 25 - 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
- ácido 8-carbamoil-2-(furano-2-il)imidazo[1,5-a]pirimidina-4-carboxílico,
- ácido 6-cloro-1H-indol-2-carboxílico,
- ácido 2-((3-metilfurano-2-carboxamido)metil)furano-3-carboxílico,
- 5-amino-3-fenil-2-tioxo-2,3-dihidrotiazole-4-carboxamida,
- 30 - ácido 6-cloroimidazo[1,2-a]piridina-2-carboxílico,
- 5-(tiofen-2-il)-7-(trifluorometil)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida,
- [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidina-2-carboxamida,
- 3,6-diamino-N-(2-carbamoilfenil)-5-cianotieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida,
- 3,6-diamino-5-ciano-N-(3,4-difluorofenil)tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida,
- 35 - 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
- ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,

- 6-etil 8-metil (Z)-5-amino-7-(furano-2-il)-2-(furano-2-ilmetileno)-3-oxo-2,3-dihidro-7H-tiazolo[3,2-a]piridina-6,8-dicarboxilato,
 - ácido 3-amino-2-((2,6-dimetilfenil)carbamoil)-6-oxo-6,7-dihidrothieno[2,3-b]piridina-5-carboxílico,
 - 5 - (1S,2S)-1,2-bis(pentafluorofenil)etilendiamina,
 - (1R,2R)-1,2-bis(pentafluorofenil)etilendiamina,
 - 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida,
 - N''-[(E)-[(tiofen-2-il)metilideno]amino]guanidina,
 - 10 - 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiotirano-3,5-dicarbonitrilo,
 - pirazina-2,3,5-tricarboxamida,
 - 4-(3-bromobencil)-1H-pirazol-3,5-diamina,
- y combinaciones de los mismos.
- 15 17. Compuesto identificado mediante el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso como medicamento.
18. Compuesto identificado mediante el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de proteinopatías.
- 20 19. Compuesto para su uso según la reivindicación anterior, en el que las proteinopatías comprenden enfermedades neurodegenerativas e infecciones bacterianas que producen un *anti-biofilm*.
- 25 20. Compuesto para su uso según la reivindicación anterior en el que las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan del grupo que consiste en: enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Huntington, enfermedad de atrofia dentatorubral-palidoluysiana, ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal-bulbar, enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo,
- 30 esclerosis lateral amiotrófica, amiloidosis atrial, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica senil, neuropatía amiloide familiar I, amiloidosis relacionada con hemodiálisis, amiloidosis sistémica hereditaria no neuropática, diabetes tipo II, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis sistémica secundaria, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, neuropatía amiloide familiar II, prolactinomas hipofisarios envejecidos, amiloidosis familiar,
- 35 demencia familiar británica, enfermedad de Kuru, síndrome de Gerstmann-Sträussler-

Scheinker, insomnio familiar fatal, prúrigo lumbar, enfermedad de desgaste crónico y encefalopatía espongiiforme bovina.

21. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 18-20 en el que la enfermedad neurodegenerativa es Alzheimer y el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
- 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
- ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,
- (1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,
- (1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida,
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo, y
- combinaciones de ellos.

22. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 18-20 en el que la enfermedad neurodegenerativa es Parkinson y el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
 - 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida,
 - 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,
- y combinaciones de ellos;

a una concentración de al menos 5 μ M.

23. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 18-20 en el que la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
 - 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,
- y combinaciones de ellos;

a una concentración de al menos 90 μ M.

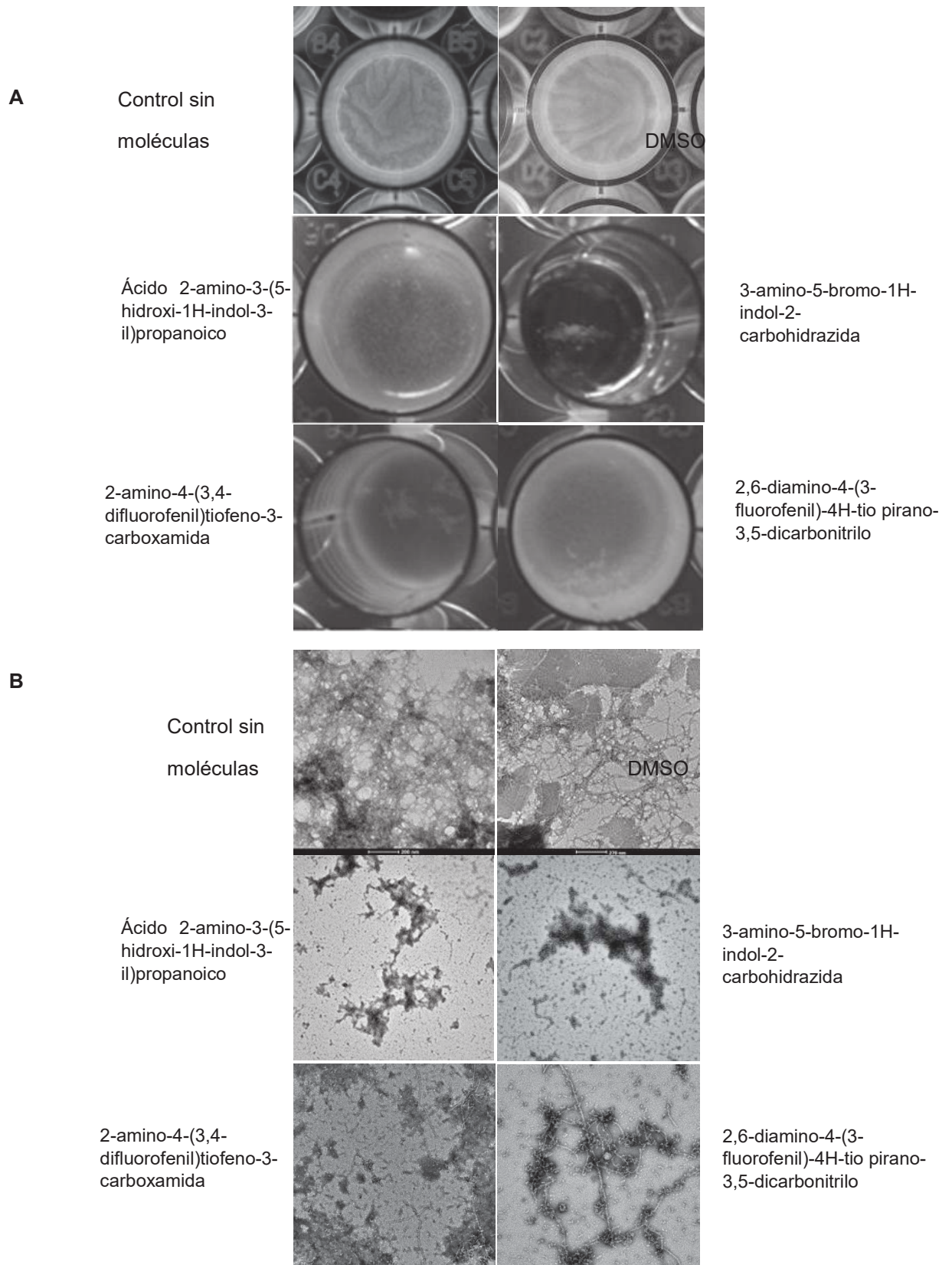
24. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 18-19 en el que las infecciones bacterianas que producen un *anti-biofilm* se seleccionan del

grupo que consiste en *Escherichia Coli*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* y *Salmonella spp.*

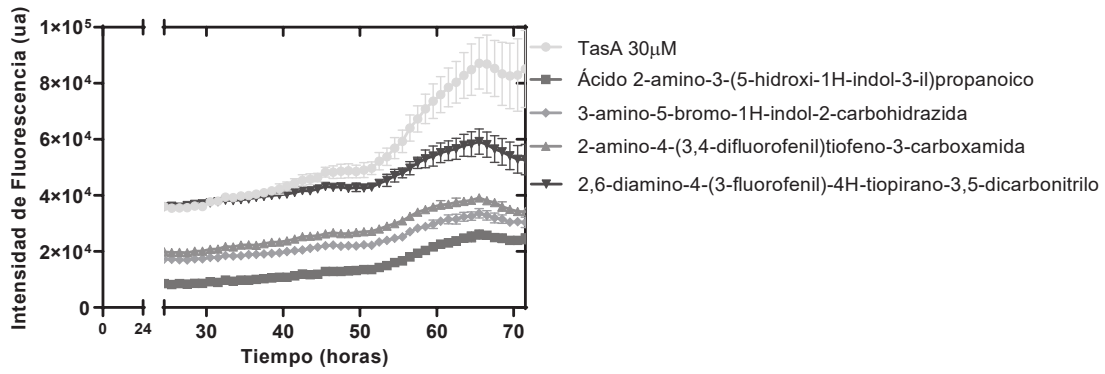
25. Compuesto para su uso según la reivindicación anterior en el que el compuesto se
5 selecciona del grupo que consiste en:

- ácido 2-amino-3-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)propanoico,
- 2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-bifenil]-4,4'-diamina,
- ácido 5-amino-7-(4-carbamotioilpiperazin-1-il)-1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxo-
1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico,
- 10 - (1S,2S)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,
- (1R,2R)-1,2-Bis(pentafluorofenil)etilenodiamina,
- 3-amino-5-bromo-1H-indol-2-carbohidrazida,
- 2-amino-4-(3,4-difluorofenil)tiofeno-3-carboxamida
- 2,6-diamino-4-(3-fluorofenil)-4H-tiopirano-3,5-dicarbonitrilo,

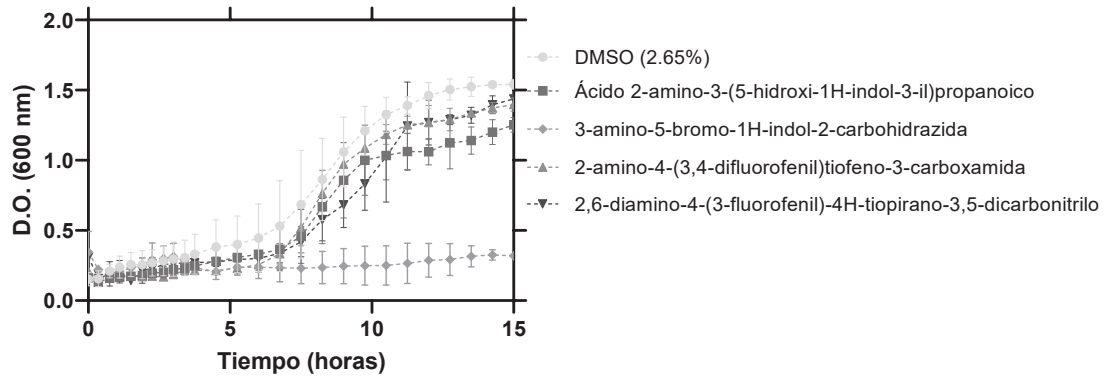
15 y combinaciones de ellos.



C



D



E

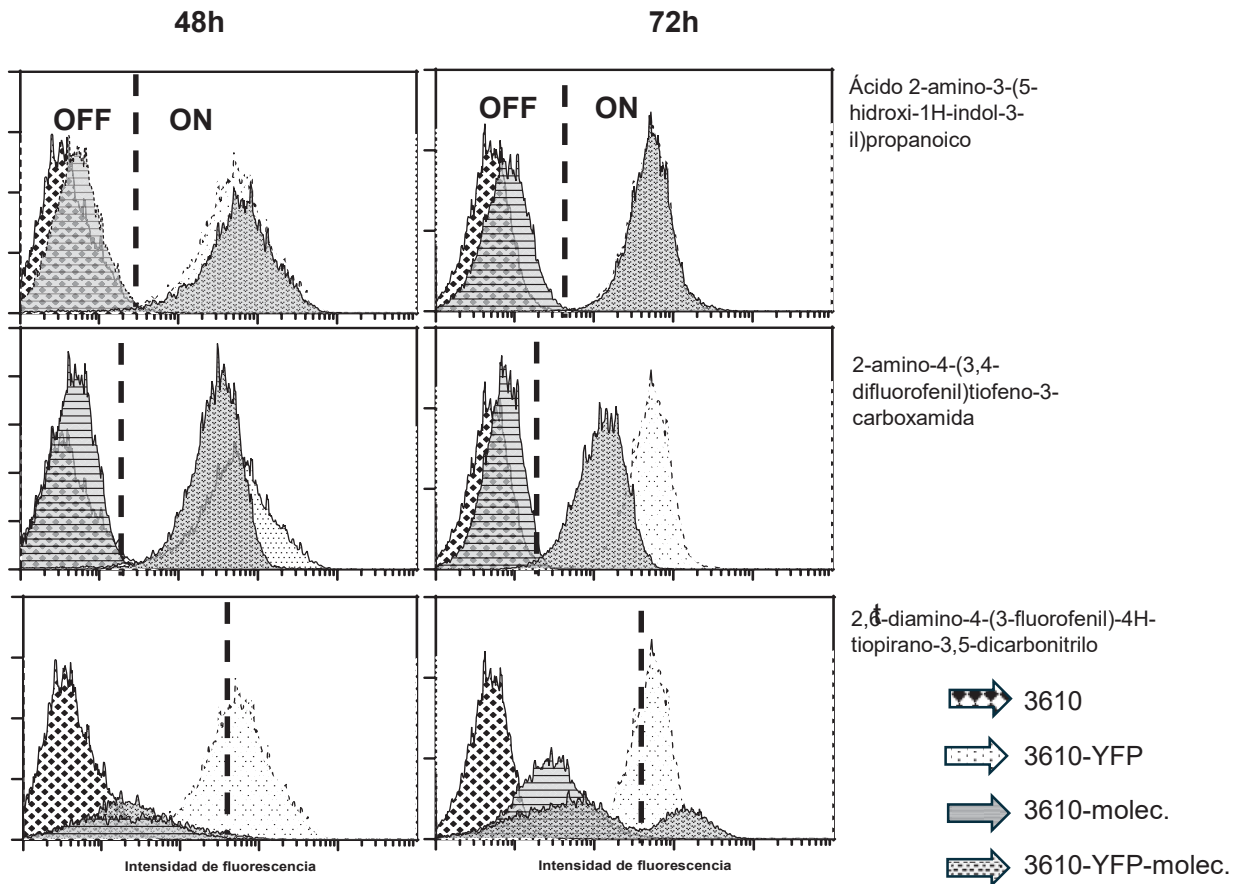


Fig. 1

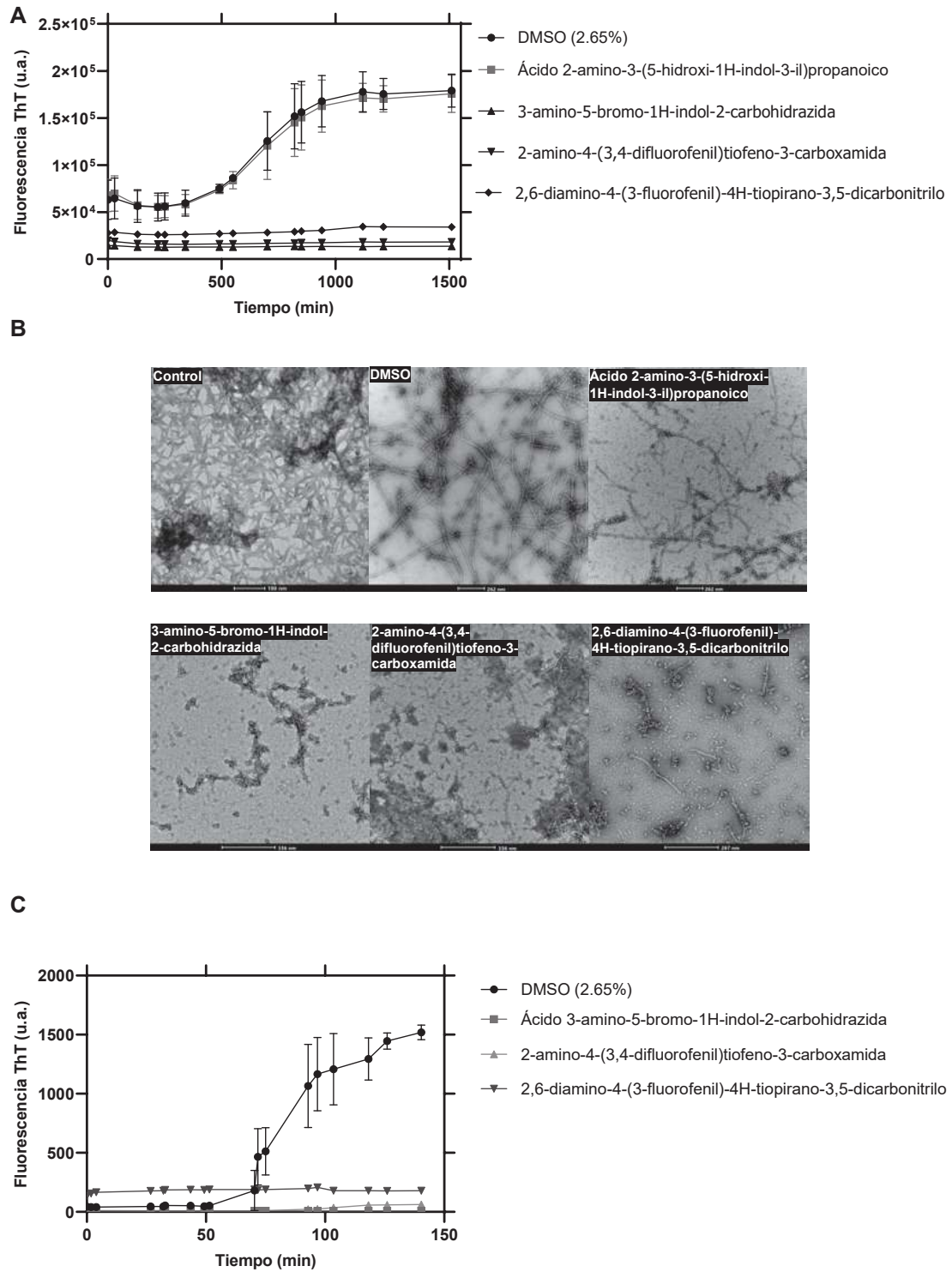
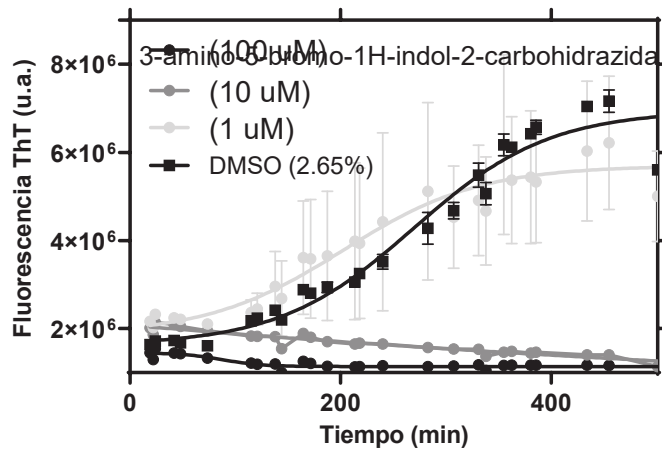
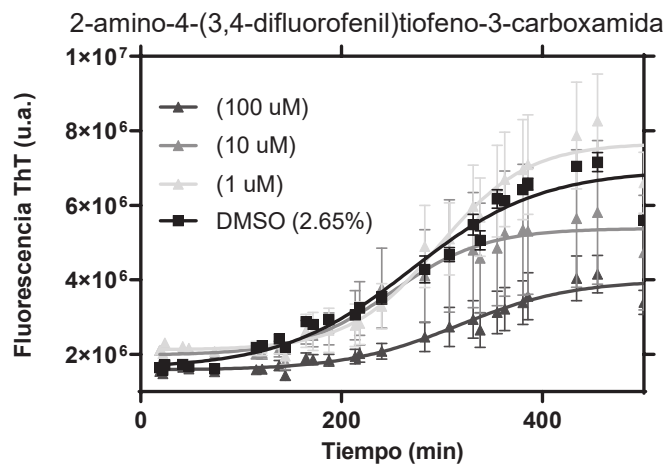


Fig. 2

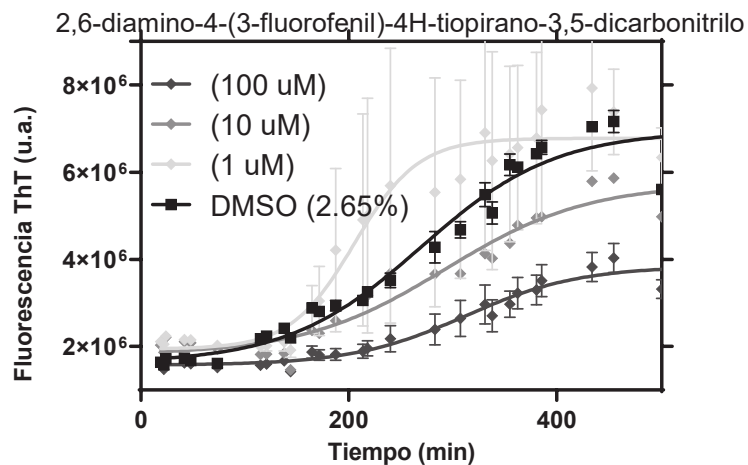
A



B



C



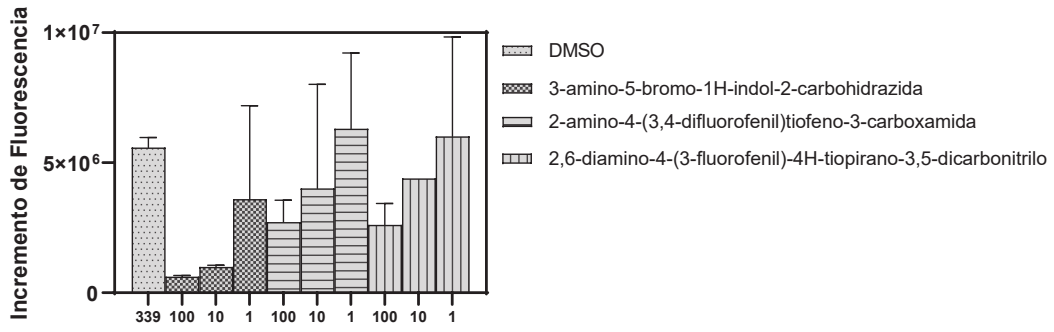


Fig. 3

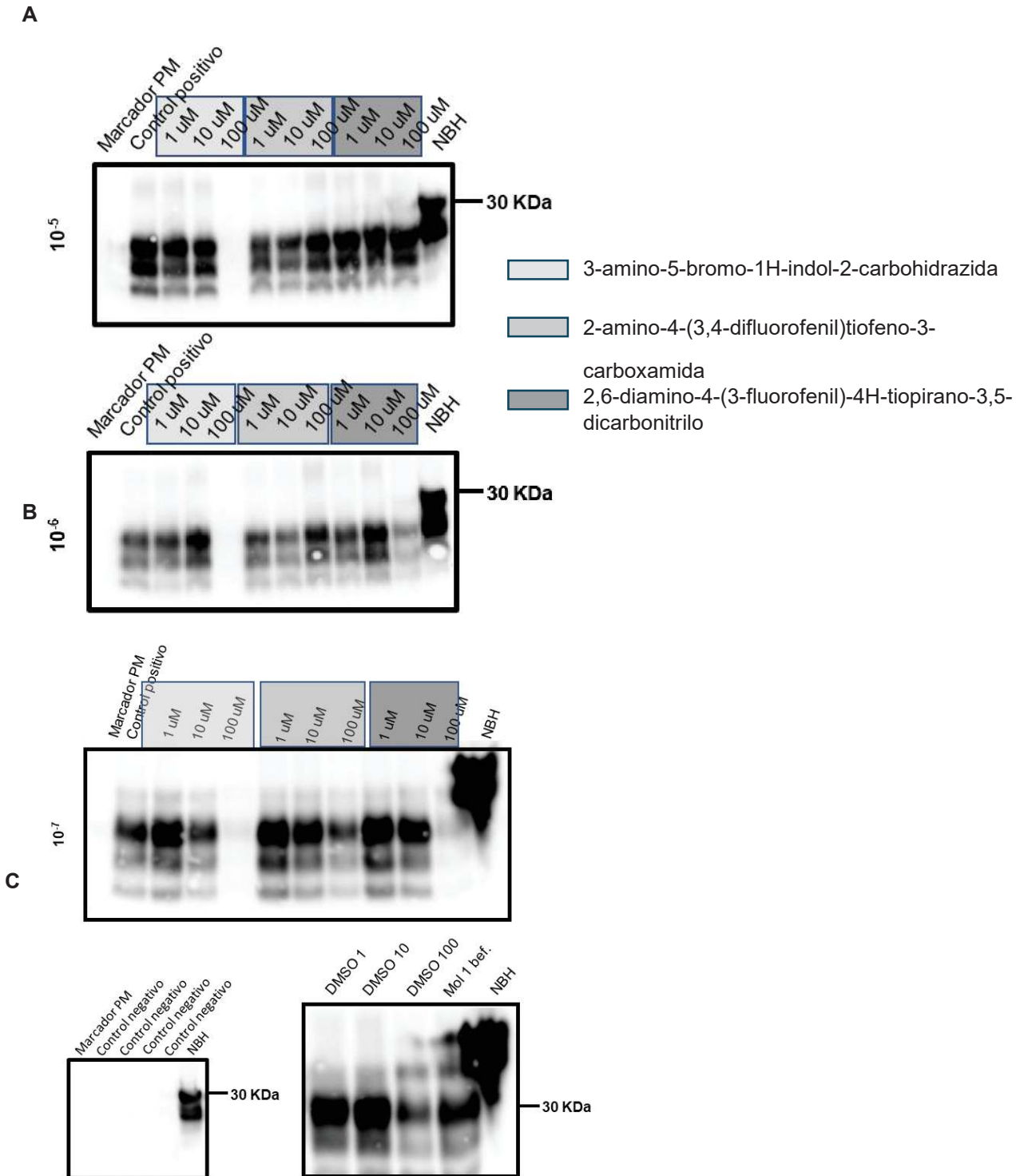


Fig. 4

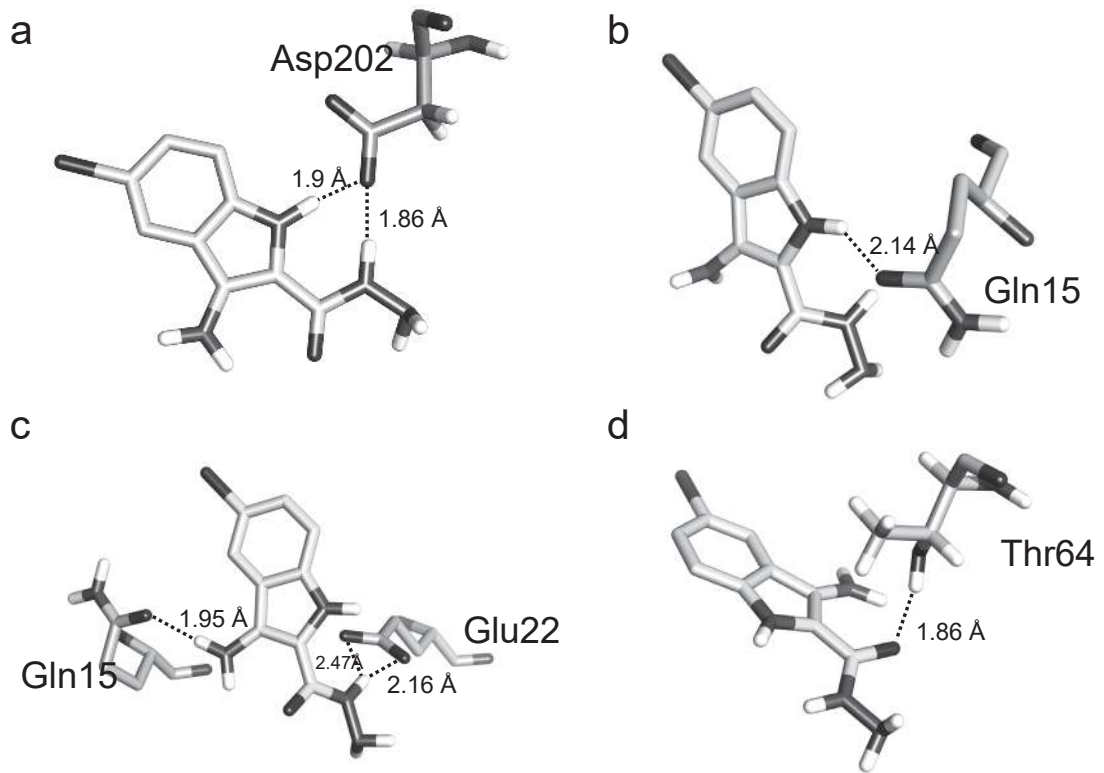


Fig. 5



- ②① N.º solicitud: 202430825
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.10.2024
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. ci.: **G16C20/30** (2019.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GALVEZ-LLOMPART M et al. "Targeting bacterial growth in biofilm conditions: rational design of novel inhibitors to mitigate clinical and food contamination using QSAR". Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. Taylor and Francis Ltd., Vol. 39, ISSN 1475-6366, ISSN 1475-6374 (electronic), <DOI: 10.1080/14756366.2024.2330907>. Ver resumen; resultados; tabla 1.	8-13
A	ZANNI RICCARDO et al. "Alzheimer: A Decade of Drug Design. Why Molecular Topology can be an Extra Edge?". Current neuropharmacology, 2018, Vol. 16, Páginas 849-864, ISSN 1875-6190 (electronic), <DOI: 10.2174/1570159X15666171129102042>. Ver resumen; apartados 1 y 2.	8-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 8-13

Fecha de realización del informe
28.07.2025

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, INVENES/LATIPAT