

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 800**

51 Int. Cl.:

A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2015 PCT/EP2015/065161**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16001389**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2015 E 15734651 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3164123**

54 Título: **Nuevos usos terapéuticos de derivados de la bencilidenguanidina para el tratamiento de proteopatías**

30 Prioridad:

02.07.2014 EP 14306075

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2021

73 Titular/es:

**INFLECTIS BIOSCIENCE (100.0%)
Halle 13 Bio Ouest Ile de Nantes, 21 rue de la
Noué Bras de Fer
44200 Nantes, FR**

72 Inventor/es:

GUEDAT, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 812 800 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

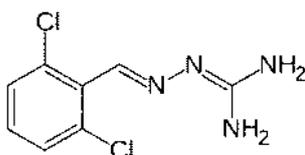
DESCRIPCIÓN

Nuevos usos terapéuticos de derivados de la bencilidenguanidina para el tratamiento de proteopatías

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a compuestos que tienen aplicaciones terapéuticas potenciales en el tratamiento de trastornos asociados al estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas. En particular, la invención proporciona compuestos que son capaces de exhibir un efecto protector contra el estrés citotóxico del retículo endoplásmico (RE).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El compuesto 2-(2,6-diclorobencilideno)hidrazinacarboximida, también denominado guanabenz, es un agonista alfa del tipo alfa 2 que se usa como fármaco antihipertensivo.



Guanabenz

15

- [0003]** También se han notificado varios derivados del guanabenz. Por ejemplo, el documento de los EE.UU. 3,982,020 (Sandoz, Inc.) describe hidrazinas de bencilideno sustituidas y su uso como agentes hipoglucémico-antihiperoglucémicos, agentes anti-obesidad y agentes antiinflamatorios. El documento de los EE.UU. 2004/0068017 (Bausch & Lomb Inc.) describe hidrazinas de bencilideno sustituidas que son capaces de aumentar la actividad de gelatinasa A en células oculares. Las moléculas tienen aplicaciones en el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto. El documento WO 2008/061647 (Acure Pharma AB) describe el uso de N-(2-cloro-3,4-dimetiloxibencilideneamino)guanidina como un inhibidor de VEGFR y sus aplicaciones asociadas en el tratamiento o prevención de la formación de vasos sanguíneos no deseados durante el crecimiento tumoral y/o condiciones inflamatorias. El documento WO 2005/031000 (Acadia Pharmaceuticals, Inc.) describe las hidrazinas de bencilideno sustituidas y su uso en el tratamiento del dolor agudo y el dolor neuropático crónico. Finalmente, el documento EP1908464 (CNRS) describe guanabenz y cloroguanabenz y su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a la expansión de poliglutamina, incluida la enfermedad de Huntington.
- 20
- 30 **[0004]** Más recientemente, se ha informado de que el guanabenz tiene potencial terapéutico en otras áreas. Recientemente, se observó que el guanabenz tiene actividad antiapoptótica (D. Tribouillard-Tanvier y col., 2008 PLoS One 3, e1981). Se ha informado que su actividad en la protección contra el mal plegamiento de proteínas es sorprendentemente mucho más amplia e incluye atenuar la acumulación de Huntingtin mutante en ensayos basados en células (WO 2008/041133) y la protección contra los efectos letales de la expresión del mutante de Insulina Akita
- 35 propenso al mal plegamiento en el retículo endoplasmático (RE) de células beta pancreáticas Min6 e INS-1 (Tsaytler y col., Science 2011, Vol. 332, 1, páginas 91-94). El documento WO2014/138298 y Way y col. (2015 Nature Communications 6:6532 DOI: 10.1038/ncomms7532) describen su uso en el tratamiento del trastorno desmielinizante, como la esclerosis múltiple.
- 40 **[0005]** También se ha demostrado que el guanabenz promueve la supervivencia de las células HeLa expuestas al estrés citotóxico del RE inducido por el inhibidor de la N-glicosilación tunicamicina, de una manera dependiente de la dosis (Tsaytler y col., Science 2011). La evaluación cuantitativa de la viabilidad celular reveló que el guanabenz duplicó la cantidad de células que sobrevivieron al estrés del RE con una concentración efectiva media de ~ 0,4 mM. Ni el agonista del receptor adrenérgico $\alpha 2$ clonidina, ni el antagonista del receptor adrenérgico $\alpha 2$ efaroxan protegieron
- 45 las células del estrés citotóxico del RE y efaroxan no interfirieron con el efecto protector de guanabenz (Tsaytler y col. Science 2011). Estas observaciones demuestran que el guanabenz rescata las células del estrés letal del RE mediante un mecanismo independiente del receptor $\alpha 2$ -adrenérgico. El guanabenz protege las células de la acumulación letal de proteínas mal plegadas mediante la unión a un subconjunto regulador de la proteína fosfatasa 1, PPP1R15A (GADD34), interrumpiendo selectivamente la desfosforilación inducida por estrés del subconjunto α del factor de inicio
- 50 de la traducción 2 (eIF2 α). El guanabenz establece las tasas de traducción en células estresadas a un nivel manejable por los chaperones disponibles, restaurando así la homeostasis proteica. Se informó que el guanabenz no se une al PPP1R15B constitutivo (CReP) y, por lo tanto, no inhibe la traducción en células no estresadas (Tsaytler y col., Science 2011).
- 55 **[0006]** La falta de mantenimiento de la proteostasis en la sala de emergencias mediante el montaje de una respuesta proteica desplegada (RPD) adecuada se reconoce como un factor contribuyente a muchas condiciones patológicas. Por consiguiente, las moléculas descritas en esta invención, que inhiben la fosfatasa α de eIF2 para ajustar la síntesis de proteínas, pueden ser de beneficio terapéutico para una gran cantidad de enfermedades

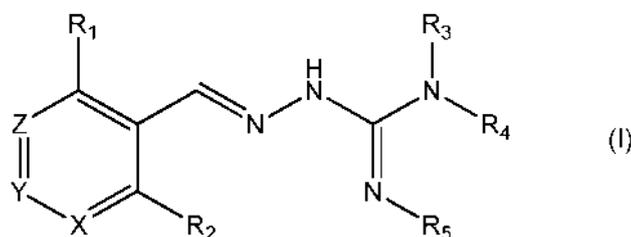
provocadas por el estrés del plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, por una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente.

[0007] El documento WO 01/25192 describe compuestos para inhibir la xantina oxidasa/deshidrogenasa. El documento WO 02/11715 describe compuestos como ligandos de los receptores de melanocortina.

[0008] La presente invención busca proporcionar compuestos alternativos basados en una estructura de núcleo del guanabenz que tienen aplicaciones terapéuticas potenciales en el tratamiento de trastornos asociados al estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas.

10 **DECLARACIÓN DE LA INVENCION**

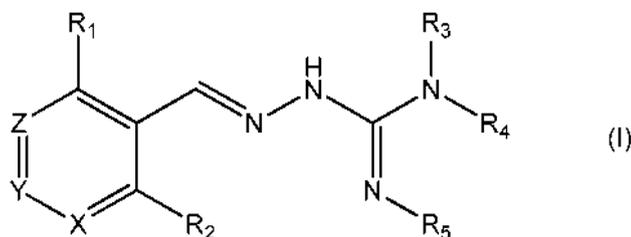
[0009] La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Se describe un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



donde:

- 20 R₁ es alquilo, O-alquilo, Cl, F o Br;
 R₂ es H o F;
 R₃ se selecciona de entre H y alquilo;
 R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;
 R₅ es H;
 25 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
 R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;
 R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R₁₀;
 30 cada R₁₀ se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;
 cada uno de X y Z es independientemente CR₁₁, e Y se selecciona de entre CR₁₁ y N;
 35 R₁₁ es H, alquilo o F;
 para su uso en el tratamiento de una proteopatía y/o un trastorno asociado al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente.

También se describe un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



donde:

- 45 R₁ es alquilo, O-alquilo, Cl, F o Br;
 R₂ es H o F;
 R₃ se selecciona de entre H y alquilo;
 R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;
 R₅ es H;
 50 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende

opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde

dicho grupo heterocíclico se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R₁₀;

R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;

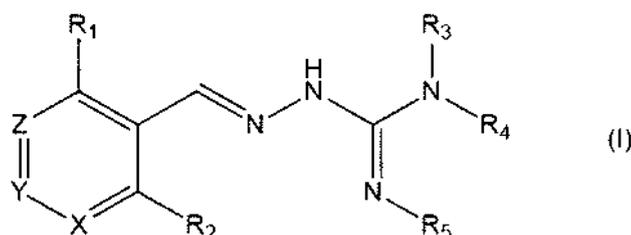
5 R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R₁₀; cada R₁₀ se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;

X, Y y Z son cada uno independientemente CR₁₁.

10 R₁₁ es H, alquilo o F;

para su uso en el tratamiento de una proteopatía y/o un trastorno asociado al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente.

15 **[0010]** También se describe un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



donde:

20 R₁ es Cl;

R₂ es H;

R₃ se selecciona de entre H y alquilo;

R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;

R₅ es H;

25 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;

R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;

30 R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R₁₀;

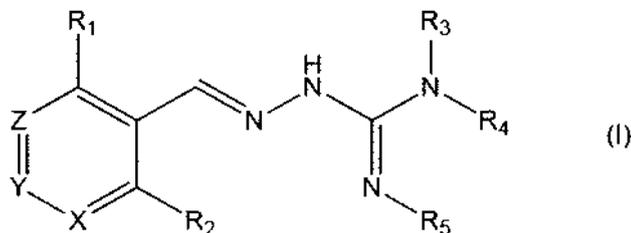
cada R₁₀ se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;

cada uno de X, Y y Z es independientemente CR₁₁;

R₁₁ es H, alquilo o F;

35 para su uso en el tratamiento de una proteopatía y/o un trastorno asociado al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente.

La descripción también se refiere a un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



40

donde:

45 R₁ es alquilo, O-alquilo, Cl, F o Br; R₂ es H o F;

R₃ se selecciona de entre H y alquilo;

R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;

R₅ es H;

50 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;

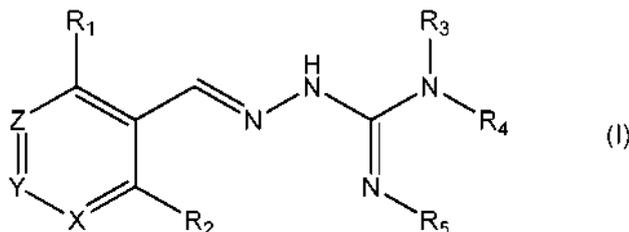
R6 se selecciona de entre R7, OR7 y NR8R9;

R7, R8 y R9 se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R10; cada R10 se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;

5 cada uno de X y Z es independientemente CR₁₁, e Y es N;

R11 es H, alquilo o F.

10 **[0011]** Según un objeto, la presente invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



donde:

15

R₁ es alquilo, O-alquilo, Cl, F o Br;

R₂ es H o F;

R₃ se selecciona de entre H y alquilo;

R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;

20

R₅ es H;

o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;

R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;

25

R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R₁₀;

cada R₁₀ se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;

cada uno de X y Z es independientemente CR₁₁, e Y se selecciona de entre CR₁₁ y N;

30

R₁₁ es H, alquilo o F;

para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado en el grupo de sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), colitis, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, nefropatía diabética, shock hemorrágico, espondiloartropatías, pancreatitis; cáncer inducido por inflamación; fibrosis quística; enfermedades relacionadas con la poliglutamina (como la enfermedad de Machado-Joseph); enfermedades de la polialanina (tales como la distrofia muscular ocularofaríngea); leucodistrofias y esclerosis múltiple.

35

Estudios previos han indicado que el grupo arilo debe ser al menos di-sustituido para que los compuestos exhiban actividad farmacológica útil (véase, por ejemplo, D. Tribouillard-Tanvier y col., PLoS One 3, e1981 (2008) y EP1908464A, CNRS). Sin embargo, contrariamente a los resultados de estudios anteriores, el presente solicitante ha hallado, sorprendentemente, que los derivados de arilo monosustituidos también están activos.

40

[0012] Además, los compuestos de la fórmula (I), como se definió anteriormente, ventajosamente no exhiben actividad o baja actividad hacia el receptor α 2A adrenérgico con respecto a los compuestos de la técnica previa, tales como el guanabenz. Esta pérdida en la actividad adrenérgica alfa 2 hace que los compuestos sean terapéuticamente útiles en el tratamiento de proteopatías y/o trastornos asociados al estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas. La ausencia de actividad adrenérgica alfa 2 significa que los compuestos de la fórmula (I) se pueden administrar en una dosis adecuada para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente, sin ningún efecto significativo sobre la presión arterial.

45

[0013] Un aspecto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la fórmula (I), tal como se describió anteriormente, mezclado con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA

55

[0014] Tal como se usa en esta invención, el término "alquilo" incluye grupos alquilo lineales y ramificados saturados. Preferentemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₂₀, más preferentemente un grupo alquilo C₁₋₁₅,

más preferentemente incluso un grupo alquilo C₁₋₁₂, más preferentemente aún, un grupo alquilo C₁₋₆, más preferentemente un grupo alquilo C₁₋₃. Los grupos alquilo particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo y hexilo

5 **[0015]** Tal como se usa en esta invención, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo cíclico. Preferentemente, el grupo cicloalquilo es un grupo cicloalquilo C₃₋₁₂.

[0016] Tal como se usa en esta invención, el término "alqueno" se refiere a un grupo que contiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono, que pueden estar ramificados o no ramificados. Preferentemente, el grupo alqueno es un grupo alqueno C₂₋₂₀, más preferentemente un grupo alqueno C₂₋₁₅, más preferentemente aún un grupo alqueno C₂₋₁₂, o preferentemente un grupo alqueno C₂₋₆, más preferentemente un grupo alqueno C₂₋₃. El término "alqueno cíclico" debe interpretarse en consecuencia.

15 **[0017]** Tal como se usa en esta invención, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático C₆₋₁₂. Los ejemplos típicos incluyen fenilo y naftilo, etc.

[0018] Tal como se usa en esta invención, el término "heterociclo" (también denominado en esta invención "heterociclilo" y "heterocíclico") se refiere a un grupo cíclico saturado, insaturado o parcialmente insaturado de 4 a 12 miembros, preferentemente de 4 a 12 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de entre N, O y S, y que contiene opcionalmente además uno o más grupos CO. El término "heterociclo" comprende tanto grupos heteroarilo como grupos heterocicloalquilo, como se define a continuación.

25 **[0019]** Tal como se usa en esta invención, el término "heteroarilo" se refiere a un aromático de 4 a 12 miembros, que comprende uno o más heteroátomos. Preferentemente, el grupo heteroarilo es un grupo aromático de 4 a 12 miembros que comprende uno o más heteroátomos seleccionados de entre grupos heteroarilo N, O y S. Los grupos heteroarilo adecuados incluyen pirrol, pirazol, pirimidina, pirazina, piridina, quinolina, tiofeno, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tiazol, oxazol, isotiazol, iso-oxazol, imidazol, furano y similares.

30 **[0020]** Tal como se usa en esta invención, el término "heterocicloalquilo" se refiere a un grupo alifático cíclico de 4 a 12 miembros que contiene uno o más heteroátomos. Los grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen piperidinilo, pirrolidinilo, piperazinilo, tiomorfolinilo y morfolinilo. Más preferentemente, el grupo heterocicloalquilo se selecciona de N-piperidinilo, N-pirrolidinilo, N-piperazinilo, N-tiomorfolinilo y N-morfolinilo.

35 **[0021]** Tal como se usa en esta invención, el término "aralquilo" incluye, de modo no taxativo, un grupo que tiene funcionalidades arilo y alquilo. A modo de ejemplo, el término incluye grupos en los que uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo se reemplaza por un grupo arilo, por ejemplo, un grupo fenilo. Los grupos aralquilo típicos incluyen bencilo, fenetilo y similares.

40 **[0022]** En una realización preferida, R₁ es Cl, Br, Me o F, más preferentemente, Cl.

[0023] En una realización preferida, R₂ es H.

[0024] En una realización, Y es CR₁₁.

45 **[0025]** En otra realización preferida, Y es N.

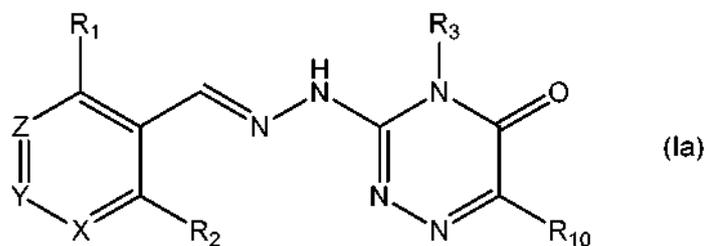
[0026] En una realización preferida, R₃ y R₄ son ambos H.

50 **[0027]** En una realización preferida, R₃ es H y R₄ es C(O)R₆.

[0028] En una realización preferida, R₆ es alquilo o alcoxi, más preferentemente, Me u OMe.

[0029] En una realización preferida, R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;

60 **[0030]** En una realización preferida, dicho compuesto es de la fórmula (Ia), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

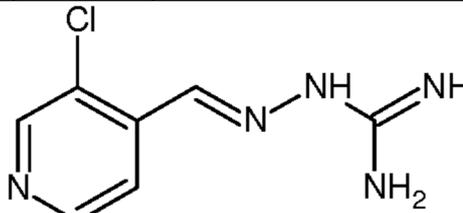
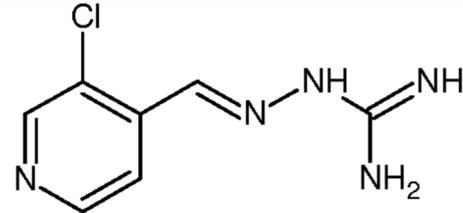
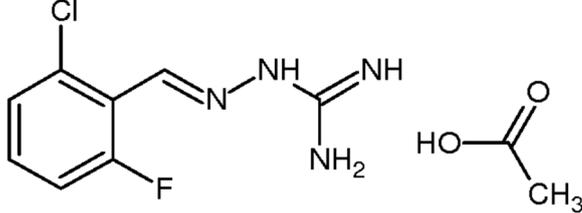
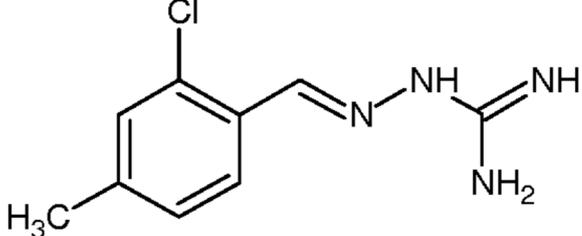
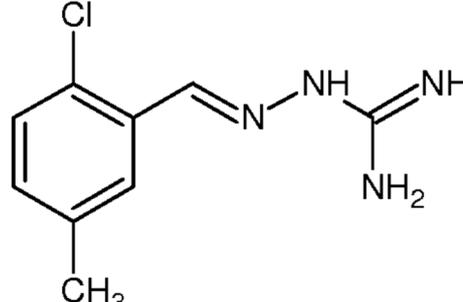
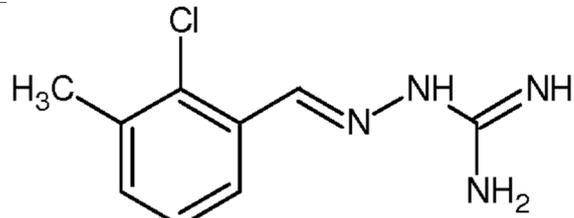


donde R_1 , R_2 , R_3 y R_{10} son tal como se definió anteriormente.

- 5 **[0031]** En una realización especialmente preferida, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona de entre los siguientes:

Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	
Compuesto 4	
Compuesto 5	

(continuación)

<p>Compuesto 6</p>	
<p>Compuesto 7</p>	
<p>Compuesto 8</p>	
<p>Compuesto 9</p>	
<p>Compuesto 10</p>	
<p>Compuesto 11</p>	

o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

5

[0032] En una primera realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona del Compuesto 1, es decir, acetato de 1-[(2-clorofenil) metiliden]amino]-guanidina, y del Compuesto 2, es decir, acetato de 1-[(2-clorofenil) metiliden]amino]-guanidina, tal como se estableció anteriormente.

10 **[0033]** En una segunda realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona del Compuesto 8, tal como se estableció anteriormente.

[0034] En una tercera realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) se selecciona de entre el Compuesto 6 y el Compuesto 7, tal como se estableció anteriormente.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

- 5
- [0035]** Los compuestos de la fórmula (I) tienen aplicaciones terapéuticas potenciales en el tratamiento de proteopatías y/o trastornos asociados a la acumulación de proteínas mal plegadas y/o desplegadas. En particular, los compuestos de la fórmula (I) tienen un efecto protector contra el estrés citotóxico del retículo endoplásmico (RE) y los trastornos relacionados con la edad.
- 10
- [0036]** Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (I), como se definió anteriormente, en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno asociado al estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas.
- 15
- [0037]** Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (I), como se definió anteriormente, en la preparación de un medicamento para tratar enfermedades donde la acumulación de proteínas mal plegadas y/o desplegadas está involucrada en el modo de acción (Brown y col., 2012, *Frontiers in Physiology*, 3, Artículo 263).
- 20
- [0038]** Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la fórmula (I), como se definió anteriormente, en la preparación de un medicamento para tratar una proteopatía. Las proteopatías se refieren a una clase de enfermedades en las que ciertas proteínas se vuelven estructuralmente anormales y, por lo tanto, alteran la función de las células, los tejidos y los órganos del cuerpo. A menudo las proteínas no se pliegan en su conformación normal, y en este estado mal plegado y/o desplegado, las proteínas pueden volverse tóxicas de alguna manera (una ganancia de función tóxica) o pueden perder su función normal o pueden tener una actividad biológica reducida. Las proteopatías, también conocidas como proteinopatías, trastornos conformacionales de proteínas o enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas, incluyen muchas enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad priónica, la diabetes tipo 2, la amiloidosis y una amplia gama de otros trastornos (ver ejemplos no taxativos más adelante).
- 25
- 30
- [0039]** Tal como se usan en esta invención, los términos "proteinopatías, proteopatías, trastornos conformacionales proteicos, enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas, enfermedades asociadas al estrés del plegamiento incorrecto de proteínas, enfermedades asociadas al estrés citotóxico del RE, enfermedades relacionadas con RPD asociadas con" tienen el mismo significado y se refieren a enfermedades donde determinada proteína se vuelve estructuralmente anormal y, por lo tanto, altera la homeostasis celular.
- 35
- [0040]** Tal como se usan en esta invención, los términos "proteína mal plegada" y "proteína desplegada" tienen el mismo significado y se refieren a una proteína que no se pliega en su conformación normal.
- 40
- [0041]** Tal como se usa en esta invención, la frase "preparación de un medicamento" incluye el uso de uno o más de los compuestos descritos anteriormente, de manera directa, como el medicamento, además de su uso en un programa de análisis para agentes activos adicionales o en cualquier etapa de la fabricación de dicho medicamento.
- [0042]** La descripción se refiere a un procedimiento para tratar una proteinopatía y/o un trastorno asociado al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y/o con estrés citotóxico del RE y, en particular, a una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I), tal como se definió anteriormente, a dicho sujeto.
- 45
- 50
- [0043]** El término "procedimiento" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluidas, entre otras, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados a partir de maneras conocidas, técnicas y procedimientos de profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.
- 55
- [0044]** En esta invención, el término "tratar" incluye abrogar, inhibir sustancialmente, enlentecer o revertir la evolución de una enfermedad o trastorno, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno.
- 60
- [0045]** Tal como se usa en esta invención, los términos "enfermedad", "trastorno", "afecciones" tienen el mismo significado. La enfermedad se asocia a una actividad de respuesta al estrés del RE y/o se asocia al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente.
- 65
- [0046]** El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto que se administra para aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se trata.

[0047] En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I) como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de trastornos de la RPD. La respuesta de proteína desplegada (RPD) es un componente del sistema de defensa celular contra proteínas mal plegadas que adapta el plegamiento en el retículo endoplásmico (RE) a las condiciones cambiantes. RPDLa se activa en respuesta a una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico. En este escenario, la RPD tiene dos objetivos principales: (i) restaurar el funcionamiento normal de la célula deteniendo la traducción de proteínas, y (ii) activar las vías de señalización que conducen al aumento de la producción de chaperones moleculares involucrados en el plegamiento de proteínas. Si estos objetivos no se alcanzan en un plazo determinado o si la interrupción se prolonga, la RPD apunta a la apoptosis. Los componentes anteriores de la RPD son las proteínas transmembrana residentes en RE IRE1, ATF6 y PERK, que detectan defectos de plegado para reprogramar la transcripción y la traducción de manera concertada y restaurar la proteostasis. Tanto IRE1 como ATF6, activados, aumentan la transcripción de los genes involucrados en el plegamiento del RE, tales como los que codifican los chaperones BiP y GRP94. El PERK activado atenúa la síntesis global de proteínas mediante la fosforilación del subconjunto del factor de inicio de la traducción 2 (eIF2 α) en Ser51, mientras promueve la traducción del factor de transcripción ATF4. Este último controla la expresión de CHOP, otro factor de transcripción, que, a su vez, promueve la expresión de PPP1R15A/GADD34. El PPP1R15A, un efector de un bucle de retroalimentación negativa que termina la señalización RPD, recluta un subconjunto catalítico de la proteína fosfatasa 1 (PP1c) para desfosforilar eIF2 α , lo que permite reanudar la síntesis de proteínas. El fracaso de la RPD contribuye a muchas afecciones patológicas que podrían corregirse mediante el impulso adecuado de esta respuesta adaptativa. Los inhibidores selectivos de la fosfatasa eIF2 α inducida por estrés PPP1R15A-PP1 retrasan la desfosforilación de eIF2 α y, en consecuencia, la síntesis de proteínas selectivamente en las células estresadas, sin afectar la síntesis de proteínas en las células no estresadas. Esto prolonga los efectos beneficiosos de la RPD. Una reducción transitoria de la síntesis de proteínas es beneficiosa para las células estresadas porque la disminución del flujo de proteínas sintetizadas aumenta la disponibilidad de los chaperones y, por consiguiente, protege del estrés por el plegamiento incorrecto (Tsaytler y col., Science 2011). Los inhibidores no selectivos de las 2 fosfatasas α de eIF2 pueden tener efectos indeseables, ya que la inhibición persistente de la traducción es perjudicial. De hecho, la ablación genética de PPP1R15A y PPP1R15B da como resultado la letalidad embrionaria temprana en ratones, lo que indica que la inhibición de las dos fosfatasas α de eIF2, PPP1R15A-PP1 y PPP1R15B-PP1, es perjudicial en un contexto orgánico. Por el contrario, la ablación genética de PPP1R15A no tiene consecuencias perjudiciales en ratones (Harding y col., 2009, Proc Natl Acad Sci, EE.UU., 106, 1832-1837). Además, se predice que los inhibidores específicos de PPP1R15A son inertes en células no estresadas, ya que el PPP1R15A no se expresa en ausencia de estrés. Por consiguiente, se predice que los inhibidores selectivos de PPP1R15A son seguros. Los inhibidores no selectivos de las dos fosfatasas α de eIF2 también pueden ser útiles para tratar enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas, cuando se usan en dosis que resultan en solo una inhibición parcial de las fosfatasas.

[0048] La citoprotección contra el estrés del RE se puede medir mediante un ensayo adecuado. Por ejemplo, la citoprotección se puede medir en células HeLa en las que el estrés del RE se provoca mediante la adición de medios que contienen tunicamicina, una mezcla de antibióticos nucleósidos homólogos que inhibe la familia de enzimas UDP-HexNAc: poliprenol-P HexNAc-1-P y se usa para inducir la respuesta proteica desplegada. La viabilidad celular se puede detectar en presencia y ausencia de compuestos inhibidores después de un periodo de tiempo establecido, midiendo la reducción de WST-8 en formazan usando un kit de viabilidad celular estándar (tal como el kit de conteo de viabilidad celular 8 de Dojindo). El experto en la materia puede usar otra clase de compuestos de tetrazolio, tales como MTT, MTS, XTT. La citoprotección del estrés del RE se mide en términos del porcentaje de aumento de células viables (en relación con el control) después del estrés del RE. Se pueden usar ensayos de viabilidad celular alternativos, tales como un ensayo de ATP luminogénico. Los detalles adicionales de un ensayo adecuado se exponen en la sección de Ejemplos adjunta.

[0049] En una realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) es capaz de prolongar el efecto protector de la RPD con respecto al control (es decir, en ausencia de compuesto inhibidor) en al menos el 10 %, al menos el 20 %, más preferentemente, al menos el 30 %, incluso más preferentemente, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % y más preferentemente aún, al menos el 90 %.

[0050] Los compuestos de la fórmula (I) son inhibidores de la interacción de PPP1R15A-PP1, que induce un efecto protector. Preferentemente, el compuesto exhibe un efecto protector con EC₅₀ de menos de aproximadamente 10 mM, incluso más preferentemente, menos de aproximadamente 5 mM y, más preferentemente aún, menos de aproximadamente 1 mM. El compuesto debe estar preferentemente desprovisto de actividad adrenérgica alfa 2. Por consiguiente, en una realización preferida, el compuesto no presenta ninguna actividad en un ensayo alfa 2-adrenérgico funcional.

[0051] Determinados compuestos de la fórmula (I) inhiben selectivamente PPP1R15A-PP1 y, por consiguiente, prolongan el efecto protector del RPD, rescatando así a las células del estrés por mal plegamiento de proteínas. Por lo tanto, los inhibidores de PPP1R15A-PP1 descritos en la presente invención tienen aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de una variedad de enfermedades asociadas al estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas y/o proteinopatías.

[0052] En una realización, el compuesto de la fórmula (I) es capaz de inhibir PPP1R15A y PPP1R15B. En una

realización altamente preferida, el compuesto de la fórmula (I) es capaz de inhibir selectivamente PPP1R15A sobre PPP1R15B.

5 **[0053]** En una realización, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I) como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la vía de fosforilación α de eIF2 donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción. Preferentemente, el trastorno es una enfermedad relacionada con PPP1R15A. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas y/o proteinopatías.

10 **[0054]** En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I) como se definió anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno provocado por, asociado a o acompañado por la fosforilación α de eIF2 y/o la actividad de PPP1R15A donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción.

15 **[0055]** Tal como se usa en esta invención, la frase "enfermedad o trastorno relacionado con PPP1R15A" se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por actividad anormal de PPP1R15A, donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción. Actividad anormal se refiere a: (i) expresión de PPP1R15A en células que normalmente no expresan PPP1R15A; (ii) mayor expresión de PPP1R15A; o (iii) aumento de la actividad de PPP1R15A.

20 **[0056]** En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para tratar un mamífero que tiene un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PP1R15A, donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción, donde el procedimiento comprende administrarle a un mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I), como se definió anteriormente.

25 **[0057]** En otra realización, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de trastornos asociados al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de la RPD, donde dicho compuesto no tiene actividad agonista alfa 2 adrenérgica o tiene actividad agonista alfa 2
30 reducida, en comparación con el guanabenz.

[0058] En otra realización, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de trastornos asociados al estrés por el plegamiento incorrecto de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de
35 la RPD, donde dicho compuesto no inhibe la traducción de proteínas en células no estresadas que expresan PPP1R15B.

[0059] En otra realización, la descripción se refiere a un procedimiento para tratar un trastorno caracterizado por la actividad de respuesta al estrés del RE y por una acumulación de proteínas mal plegadas, comprendiendo el
40 procedimiento administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de la fórmula (I), donde dicho compuesto modula la respuesta al estrés del RE.

[0060] En otra realización, la invención se refiere al inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de proteopatías y/o trastornos asociados al
45 estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de RPD, en donde dicho compuesto tiene una selectividad hacia PPP1R15A-PP1 holofosfatasa, que no tiene ninguna actividad o tiene una actividad reducida hacia PPP1R15B-PP1 holofosfatasa, y en donde la relación (actividad hacia PPP1R15A-PP1 holofosfatasa/actividad hacia PPP1R15B-PP1) para dicho compuesto es al menos igual o superior a la relación (actividad hacia PPP1R15A-PP1 holofosfatasa/actividad hacia PPP1R15B-PP1) para el guanabenz.
50

[0061] En otra realización, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de proteopatías y/o trastornos asociados al
55 estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de RPD:

- donde dicho compuesto tiene una actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1, pero ninguna actividad, o una actividad reducida hacia la holofosfatasa PPP1R15B-PP1, y;
- donde la relación (actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1/actividad hacia PPP1R15B-PP1) para dicho
60 compuesto es al menos igual o superior a la relación (actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1/actividad hacia PPP1R15B-PP1) para el guanabenz; y
- donde dicho compuesto tiene actividad agonista alfa 2 adrenérgica nula o reducida en comparación con el guanabenz.

[0062] La enfermedad o los trastornos descritos en esta invención están:

65

- (i) asociados a una actividad de respuesta al estrés del RE; y/o
- (ii) al estrés por mal plegamiento de proteínas y, en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas y/o desplegadas; y/o
- (iii) un trastorno de la RPD; y/o
- 5 (iv) la enfermedad relacionada con PPP1R15A; y/o
- (v) una proteopatía.

[0063] Otros ejemplos de enfermedades incluyen.

- 10 **[0064]** **Enfermedades neurodegenerativas** tales como tauopatías (tales como enfermedad de Alzheimer, entre otras), sinucleinopatías (tales como enfermedad de Parkinson, entre otras), enfermedad de Huntington y enfermedades relacionadas con la poliglutamina, enfermedades de polialanina (tales como distrofia muscular oculofaríngea), enfermedades priónicas (también llamadas encefalopatías espongiiformes transmisibles), trastornos de desmielinización tales como las enfermedades de Charcot-Marie Tooth (también llamadas neuropatía motora y
- 15 sensorial hereditaria), leucodistrofias, esclerosis lateral amiotrófica (también denominada enfermedad de la neurona motora y enfermedad de Lou Gehrig), seipinopatías y esclerosis múltiple.

[0065] Los ejemplos de tauopatías incluyen, de modo no taxativo, enfermedad de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, degeneración lobular frontotemporal o demencia frontotemporal

20 (DFT) (enfermedad de Pick). La DFT es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por pérdida neuronal progresiva que afecta predominantemente a los lóbulos frontal y/o temporal; después de la enfermedad de Alzheimer (EA), que prevalece, la DTF representa el 20 % de los casos de demencia de inicio joven. La participación de la RPD en tauopatías está bien documentada (véase Stoveken 2013, The Journal of Neuroscience 33(36): 14285-14287). Sin limitarse a una teoría, se anticipa que los compuestos de la invención que son inhibidores de PPP1R15A mejorarán

25 las manifestaciones de tauopatías de la enfermedad. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre demencia frontotemporal (FTD), parálisis supranuclear y degeneración corticobasal,

30 preferentemente FTD.

[0066] Los ejemplos de sinucleinopatías incluyen, de modo no taxativo, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, fallo autónomo puro y atrofia del sistema múltiple. Recientemente, Colla y col. (J. of Neuroscience 2012 Vol. 32, No.10, páginas 3306-3320) demostraron que el salubrinil, que es una molécula pequeña

35 que aumenta la fosforilación de eIF2 alfa al inhibir la desfosforilación mediada por PPP1R15A de eIF2 α (Boyce y col. 2005 Science Vol. 307, páginas 935-939), atenúa significativamente las manifestaciones de la enfermedad en dos modelos animales de alfa-sinucleinopatía. Sin limitarse a una teoría, se anticipa que los compuestos de la invención que son inhibidores de PPP1R15A mejorarán las manifestaciones de enfermedad de las sinucleinopatías alfa. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de las sinucleinopatías alfa. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

40 del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

[0067] Los ejemplos de enfermedades de poliglutamina incluyen, de modo no taxativo, atrofia muscular espinobulbar (o enfermedad de Kennedy), enfermedad de Huntington, atrofia dentatorubral-pallidoluisiana, ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3 (o enfermedad de Machado-Joseph), ataxia espinocerebelosa tipo 6, ataxia espinocerebelosa tipo 7 y ataxia espinocerebelosa tipo 17. El guanabenz es capaz de atenuar la acumulación de huntingtina mutante en ensayos basados en células (WO2008/041133). Este hallazgo es inesperado ya que la huntingtina mutante es citosólica o nuclear. Sin embargo,

50 hay evidencia de que el metabolismo de la huntingtina mutante se ha conectado previamente a la respuesta de estrés del RE (Nishitoh y col., 2002, Genes Dev, 16, 1345-55; Rousseau y col., 2004, Proc Natl Acad Sci, EE.UU., 101, 9648-53; Duennwald y Lindquist, 2008, Genes Dev, 22, 3308-19). Los hallazgos de que el guanabenz protege las células del estrés citotóxico del RE y reduce la acumulación de huntingtina mutante apoyan aún más la idea de que puede haber aspectos de la respuesta al estrés del RE que impacten en la acumulación de huntingtina mutante. Sin embargo,

55 el guanabenz no es útil para el tratamiento de enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas humanas debido a su actividad hipotensora. Por el contrario, los inhibidores de PPP1R15A derivados del guanabenz desprovistos de actividad adrenérgica alfa 2 de la invención podrían ser útiles para tratar enfermedades poliglutaminas y más específicamente seleccionados en el grupo de enfermedad de Huntington, atrofia muscular espinobulbar (o enfermedad de Kennedy), atrofia torubral-pallidoluisiana Denta, ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia

60 espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3 (o enfermedad de Machado-Joseph), ataxia espinocerebelosa tipo 6, ataxia espinocerebelosa tipo 7 y ataxia espinocerebelosa tipo 17. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de la poliglutamina. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento

65 de la enfermedad de Huntington. Los ejemplos de enfermedades de la polialanina incluyen la distrofia muscular

oculofaríngea, que es provocada por el tracto polialanina en la proteína nuclear de unión poli (A) 1 (PABPN1). Barbezier y col. (2011, EMBO Vol. 3, página 35-49) demostraron que el guanabenz reduce la agregación en la atrofia muscular oculofaríngea. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de la polialanina. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la atrofia muscular oculofaríngea.

[0068] Los ejemplos de enfermedades priónicas de seres humanos incluyen, de modo no taxativo, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob clásica, la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvECJ, un trastorno humano relacionado con la encefalopatía esponjiforme bovina), el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, insomnio familiar fatal y kuru. El guanabenz reduce los síntomas de ratones infectados con priones (D. Tribouillard-Tanvier y col., 2008 PLoS One 3, e1981). Sin embargo, el guanabenz no es útil para el tratamiento de enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas humanas debido a su actividad hipotensora. Por el contrario, los inhibidores de PPP1R15A derivados del guanabenz desprovistos de actividad adrenérgica alfa 2 de la invención podrían ser útiles para tratar enfermedades priónicas. En esta invención, se describe un inhibidor de PPP1 R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal y el kuru.

[0069] Los trastornos de desmielinización se caracterizan por una pérdida de oligodendrocitos en el sistema nervioso central o células de Schwann en el sistema nervioso periférico. El fenómeno asociado a un trastorno de desmielinización se caracteriza por una disminución de los axones mielinizados en el sistema nervioso central o el sistema nervioso periférico. Los ejemplos no taxativos de proteínas mal plegadas de una célula mielinizante (que incluyen oligodendrocito y célula de Schwann) se seleccionan de entre el grupo que consiste en CC1, proteína básica de mielina (MBP), ceramida galactosiltransferasa (CGT), glicoproteína asociada a mielina (MAG), glicoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG), glicoproteína de oligodendrocito y mielina (OMG), nucleótido fosfodiesterasa cíclico (CNP), proteína de mielina cero (MPZ), proteína de mielina periférica 22 (PMP22), Connexina 32 (Cx32), proteína 2 (P2), galactocerebrósido (GalC), sulfatida y proteína proteolípida (PLP). MPZ, PMP22, Cx32 y P2 son las proteínas mal plegadas preferidas para las células Schwann. PLP, MBP, MAG son las proteínas mal plegadas preferidas para los oligodendrocitos.

[0070] En determinadas realizaciones, el trastorno de desmielinización se selecciona de entre el grupo que consiste en las enfermedades de Charcot-Marie Tooth (CMT). CMT se refiere a un grupo de trastornos de neuropatía hereditaria caracterizados por una polineuropatía motora y sensorial crónica. Se identificaron diferentes tipos de CMT tales como la CMT1, la CMT2, la CMT4, la CMTX y la enfermedad de Dejerine-Sottas. Los subtipos de CMT pueden subdividirse de manera adicional principalmente en hallazgos genéticos moleculares. Por ejemplo, la CMT1 se subdivide en CMT1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F/2E. Más de 100 mutaciones en el gen que codifica la proteína de mielina cero (P0), una proteína transmembrana de paso único, que es la proteína principal producida por las células de Schwann mielinizantes, provocan una neuropatía Charcot-Marie-Tooth (D 'Antonio y col., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). Las mutaciones son predominantemente hereditarias y provocan la enfermedad a través de una ganancia de función tóxica (D 'Antonio y col., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). La eliminación de serina 63 de P0 (POS63del) provoca la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth 1B en humanos y una neuropatía desmielinizante similar en ratones transgénicos. La proteína mutante se acumula en el RE e induce la RPD (D 'Antonio y col., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). La ablación genética de CHOP, un gen proapoptótico en RPD1a restaura la función motora en ratones Charcot-Marie-Tooth (Pennuto y col., 2008, Neuron, 57, 393-405). El hallazgo de que la inhibición de PPP1R15A en células casi elimina la expresión EN TROZOS en células estresadas por RE indica que la inhibición genética o farmacológica de PPP1R15A debería reducir la disfunción motora en ratones Charcot-Marie-Tooth. Recientemente, D'Antonio y col. (2013 J.Exp. Med Vol., páginas 1-18) demostraron que los ratones POS63del tratados con salubrinal, recuperaron una capacidad motora casi normal en el análisis de rotarod y fueron acompañados por un rescate de anomalías morfológicas y electrofisiológicas. La acumulación del mutante relacionado con CMT en las proteínas del RE no es única para POS63del; se han identificado al menos otros cinco mutantes P0 que se retienen en el RE y provocan una RPD (Pennuto y col., 2008 Neuron Vol. 57, páginas 393-405; Saporta y col., 2012 Brain, Vol.135, páginas 2032-2047). Además, el plegamiento incorrecto de proteínas y la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente en el RE se han involucrado en la patogénesis de otras neuropatías de CMT como resultado de mutaciones en PMP22 y Cx32 (Colby y col., 2000 Neurobiol.Disease Vol. 7, páginas 561-573; Kleopa y col., 2002 J Neurosci. Res. Vol. 68, páginas 522-534; Yum y col., 2002 Neurobiol. Dis. Vol. 11, páginas 43-52). Sin embargo, el salubrinal es tóxico y no se puede usar para tratar pacientes humanos D'Antonio y col. (2013 J.Exp. Med Vol., páginas 1-18). Por el contrario, se predice que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) son seguros y podrían ser útiles para el tratamiento de la CMT, preferentemente la CMT-1A y 1B. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la CMT, más preferentemente la CMT-1 y la enfermedad de Dejerine-Sottas. En esta invención, se describe un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la CMT asociada a una acumulación de proteína mal plegada en el RE. Se describe adicionalmente un inhibidor de PPP1 R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la CMT-1A, la CMT-1B o la CMT-1E. Se describe además que el compuesto de la fórmula (I) es para su uso en el tratamiento de

la CMT, más preferentemente para su uso en el tratamiento de la CMT-1, en asociación a al menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de D-sorbitol, baclofeno, pilocarpina, naltrexona, metimazol, mifepristona, ketoprofeno y sales de los mismos. Según otra realización, la invención se refiere al guanabenz o al salubrial (es decir, inhibidores de PPP1R15A) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para su uso en el tratamiento de la CMT, 5 preferentemente la CMT-1, en asociación a al menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de D-sorbitol, baclofeno, pilocarpina, naltrexona, metimazol, mifepristona, ketoprofeno y sales de los mismos. Los compuestos se combinan para una administración agrupada o separada, que se efectúa simultánea o secuencialmente.

[0071] En esta invención, se describe una composición que comprende un inhibidor de PPP1R15A 10 seleccionado de entre el grupo del compuesto de la fórmula (I), guanabenz y salubrial o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos un compuesto comercializado y sales del mismo, para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente las CMT, más preferentemente la CMT-1. La dosificación de los compuestos en la composición deberá situarse dentro del intervalo de dosis no superiores a las dosis habitualmente prescritas para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o demostradas como seguras en el ensayo clínico de 15 fase 3; la dosis más preferida de compuestos en la combinación deberá corresponder a cantidades del 1 hasta el 10 % de las prescritas habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

[0072] Por consiguiente, se describe una composición que comprende un inhibidor de PPP1R15A seleccionado de entre el grupo del compuesto de la fórmula (I), guanabenz y salubrial o una sal farmacéuticamente aceptable de 20 los mismos, y un compuesto que aumenta la expresión de la proteína PMP22, seleccionada de entre el grupo de D-sorbitol, baclofeno, pilocarpina, naltrexona, metimazol, mifepristona, ketoprofeno y sales de los mismos, para su uso en el tratamiento de las CMT, preferentemente la CMT-1, más preferentemente la CMT-1A.

[0073] En otras realizaciones, el trastorno de desmielinización se selecciona de entre el grupo que consiste en 25 leucodistrofias. Los ejemplos de leucodistrofias incluyen, de modo no taxativo, la adrenoleucodistrofia (ALD), la enfermedad de Alexander, la enfermedad de Canavan, enfermedad de Krabbe, la leucodistrofia metacromática (LDM), la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (EPM), la ataxia infantil con hipomielinización del sistema nervioso central (también conocida como enfermedad de materia blanca que desaparece), el síndrome de CAMFAK, la enfermedad de Refsum, el síndrome de Cockayne, el síndrome de Ver der Knapp, el síndrome de Zellweger, el síndrome de Guillain-Barre (SGB), la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), la neuropatía motora multifocal (NMM) y la 30 parálisis supernuclear progresiva, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), la encefalomielitis, la mielínolisis pontina central (MPC) y la enfermedad anti-MAG, entre otros. Gow y col. (Neuron, 2002 Vol. 36, 585-596) demostraron que la respuesta de proteína desplegada se activa en la EPM y muestran que esta vía es la duplicación del gen PLP1.

[0074] Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o 35 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de leucodistrofias, y preferentemente de la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (EPM).

[0075] La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se conoce como enfermedad de las neuronas motoras y como la 40 enfermedad de Lou Gehrig. Ahora se reconoce bien que el plegamiento incorrecto de proteínas juega un papel central tanto en la ELA familiar como en la esporádica (Matus y col. 2013 Int. J. Cell Biol. ID674751 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/674751>). Saxena y col. (Nature Neuroscience 2009 Vol. 12, páginas 627-636) demostraron que el salubrial extiende la vida útil de un modelo de ratón transgénico G93A-SOD1 con la enfermedad de las neuronas motoras. Más recientemente, Jiang y col. (Neurociencia 2014) demostraron que el guanabenz retrasa 45 el inicio de los síntomas de la enfermedad, extiende la vida útil, mejora el rendimiento motor y atenúa la pérdida de neuronas motoras en el modelo de ratón SOD1 G93A de la ELA. Das y col. (2015 Science 388, 239-242) demostraron que un derivado del guanabenz previene los defectos motores, morfológicos y moleculares de la ELA en ratones G93A SOD1 mutantes. En esta invención, se describe un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de formas familiares y esporádicas de ELA. 50

[0076] Los ejemplos de seipinopatías incluyen, de modo no taxativo, enfermedad motora relacionada con lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip tipo 2 (BSCL2), lipodistrofia generalizada congénita (LGC), síndrome de Silver, neuropatía motora hereditaria distal tipo V (NMHD-V). La expresión de formas mutantes de seipina en células 55 cultivadas activa la vía de respuesta de proteína desplegada (RPD) e induce la muerte celular mediada por estrés del RE (Ito & Suzuki, 2009 Brain 132: 87-15). En esta invención, se describe un inhibidor de PPP1 R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la sipinopatía.

[0077] En otra realización, el trastorno de desmielinización al que se hace referencia en la misma es la 60 esclerosis múltiple y enfermedades relacionadas, tales como la enfermedad de Schilder. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Fibrosis quística (FQ)

65 **[0078]** Norez y col. (2008 Eur. J. Pharmacol. 592 pp33-40) demostró que el guanabenz activa corrientes de

cloruro dependientes de Ca^{2+} en células epiteliales de vías respiratorias humanas con fibrosis quística. Sin limitarse a una teoría, se anticipa que los compuestos de la invención que son inhibidores del derivado del guanabenz PPP1R15A mejorarán las manifestaciones de la enfermedad de la fibrosis quística. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la fibrosis quística.

Enfermedades retinianas.

[0079] La literatura publicada recientemente ha proporcionado evidencia de que la RPD está involucrada en el desarrollo de la degeneración retiniana: degeneración retiniana hereditaria como ciliopatías retinianas y retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de premaruridad, degeneración retiniana inducida por la luz, desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma (para revisión Gorbatyuk y Gorbatyuk, 2013, Molecular Vision, Vol. 19, páginas 1985-1998 ; Jing y col., 2012, Exp Diabetes Res, 2012, 589589).

[0080] Las ciliopatías retinianas son un grupo de trastornos genéticos raros que se originan a partir de un defecto en el cilio primario de los fotorreceptores, induciendo, por consiguiente, retinitis pigmentosa. Se ha reportado que este defecto induce un estrés del RE debido a la acumulación de proteínas en el segmento interno del fotorreceptor que, a su vez, induce la RPD (WO2013/124484). La degeneración retiniana es una característica muy común en las ciliopatías que se puede observar ya sea en la retinitis pigmentosa aislada, como la amaurosis congénita de Leber o la retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X, o también en condiciones sindrómicas como el síndrome de Bardet-Biedl (SBB), el síndrome de Alstrom (SA) o el síndrome de Usher. La ciliopatía retiniana se selecciona de entre el grupo que consiste en el síndrome de Bardet-Biedl, el síndrome de Senior-Loken, el síndrome de Joubert, el síndrome de Salidono-Mainzer, el síndrome de Sensen-Biedl, el síndrome de Jeune, el síndrome de Meckel-Gruder, el síndrome de Alstrom y el síndrome de MORM. En una realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) es para su uso en el tratamiento de enfermedades retinianas, más preferentemente, la degeneración retiniana hereditaria, tal como ciliopatías retinianas y retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de premarurida, degeneración retiniana inducida por la luz, desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma.

[0081] Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la retinitis pigmentosa. Según una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber. Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento del síndrome de Bardet-Biedl. Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento del síndrome de Alstrom. Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento del síndrome de Husher.

[0082] En la realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) es para uso en el tratamiento de enfermedades retinianas, más preferentemente para uso en el tratamiento de enfermedades seleccionadas en el grupo de degeneración retiniana hereditaria, tal como ciliopatías retinianas, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de premaruridad, degeneración retiniana inducida por la luz, desprendimiento retiniano, retinopatía diabética y glaucoma en asociación con un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BIP, tal como ácido valproico o un derivado del mismo, trichostatina A, litio, 1-(3,4-dihidroxi-penil)-2-tiocianato-etanona y exendina-4. Por consiguiente, la invención se refiere a una composición que comprende un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BIP, preferentemente ácido valproico, para su uso en el tratamiento de enfermedades seleccionadas de entre el grupo de degeneración retiniana hereditaria, tales como ciliopatías retinianas, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de premarurida, degeneración retiniana inducida por la luz, desprendimiento retiniano, retinopatía diabética y glaucoma.

[0083] En una realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) se usa en el tratamiento de enfermedades retinianas, más preferentemente para su uso en el tratamiento de enfermedades seleccionadas de entre el grupo de degeneración retiniana hereditaria, tal como ciliopatías retinianas, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de premaruridad, degeneración retiniana inducida por la luz, desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma en asociación con un vector de terapia génica, los ejemplos no taxativos de vectores de terapia génica incluyen lentivirus, adenovirus y vectores adenoasociados (VAA); estos vectores son eficaces en la administración de genes de interés para la retina y el epitelio pigmentario retiniano para la terapia génica ocular. Se anticipa que, en una terapia génica ocular de degeneración retiniana hereditaria asociada a una acumulación de proteínas mal plegadas mutadas, la acumulación de proteínas en el retículo endoplásmico permanecerá presente mientras se expresa una proteína normal a partir del vector de terapia génica. Sigue siendo necesario disminuir la acumulación/carga de proteínas en la célula, preferentemente en el RE, con inhibidores de PPP1R15A. La invención también se refiere a una composición que comprende un inhibidor de PPP1R15A seleccionado de entre el grupo del compuesto de la fórmula (I), guanabenz y salubrial o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en

combinación con la terapia génica ocular.

Enfermedades de almacenamiento lisosomal;

5 **[0084]** Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son un grupo de aproximadamente 50 trastornos metabólicos hereditarios raros que resultan de defectos en la función lisosomal. La disfunción lisosomal suele ser consecuencia de la deficiencia de una sola enzima necesaria para el metabolismo de lípidos, glicoproteínas o los llamados mucopolisacáridos. Los ejemplos de enfermedades de almacenamiento lisosomal que se pueden tratar con inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) descritos en esta invención incluyen, de modo no taxativo, deficiencia del
 10 activador/gangliosidosis GM2, alfa-manosidosis, aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, enfermedad de Farber, enfermedad de Niemann-Pick, fucosidosis, galactosialidosis, enfermedad de Gaucher (tipos I, II, II), gangliosidosis GM1 (infantil, infantil tardío/juvenil, adulto/crónico), enfermedad de células I/mucopolipidosis, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre de lactantes/ISSD, deficiencia juvenil de hexosaminidasa A, enfermedad de Krabbe (inicio infantil, inicio tardío),
 15 deficiencia de lipasa ácida lisosomal (inicio temprano/inicio tardío), leucodistrofia metacromática, trastornos de mucopolisacaridosis (tales como polidistrofia/mucopolipidosis IIIA de Pseudo-Hurler, síndrome de Hurler de mucopolisacaridosis I (MPS I), síndrome de Scheie de MPS I, síndrome de Hurler-Scheie de MPS I, síndrome de Hunter de MPS II, síndrome de Sanfilippo tipo A (MPS IIIA), síndrome de Sanfilippo tipo B (MPS IIIB), síndrome de Sanfilippo tipo C (MPS IIIC), síndrome de Sanfilippo tipo D (MPS IIIC) IIID), Morquio Tipo A/MPS IVA, Morquio Tipo
 20 B/MPS IVB, MPS IX deficiencia de hialuronidasa, MPS VI Maroteaux-Lamy, MPS VII Síndrome de Sly, mucopolipidosis I/sialidosis, mucopolipidosis IIIC, mucopolipidosis tipo IV(deficiencia de sulfatasa múltiple, enfermedad de Niemann-Pick (tipos A, B, C), enfermedad CLN6 (infantil tardío atípico, variante de inicio tardío, juvenil temprano), enfermedad de Batten-Spielmeyer-Vogt/juvenil NCL/CLN3, variante finlandesa CLN5 infantil tardío, enfermedad de Jansky Bielschowsky/infantil tardío CLN2/TPP1, enfermedad de Kufs/NCL/CLN4 de inicio tardío en adultos, epilepsia
 25 septentrional/variante infantil tardío CLN8, enfermedad de Santavuori-Haltia/CLN1/PPT infantil, beta-manosis, enfermedad de Pompe/enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, picnodiosis, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2 (inicio en adultos, inicio en lactantes, juvenil), enfermedad de Schindler, enfermedad de Sall/sialic, enfermedad de almacenamiento de ácido taquiátrico/gangliosidosis GM2, y enfermedad de Wolman. En esta invención, se describe un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo
 30 para el uso en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal que son consecuencia de la deficiencia de al menos una enzima única necesaria para el metabolismo de lípidos, glicoproteínas o los llamados mucopolisacáridos y donde dicha enzima está mal plegada en el retículo endoplásmico (RE). Según una realización preferida, la enfermedad de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher.

35 Enfermedades por amiloidosis:

[0085] La amiloidosis es un término no específico que se refiere a una serie de enfermedades diferentes llamadas colectivamente amiloidosis. Los amiloides son proteínas cuya estructura secundaria cambia, provocando que las proteínas se plieguen en una forma característica, la lámina plisada beta. Cuando las proteínas normalmente
 40 solubles se pliegan para convertirse en amiloides, se vuelven insolubles, se depositan y se acumulan en órganos o tejidos, alterando la función normal. Diferentes tipos de amiloidosis tienen diferentes signos y síntomas dependiendo de dónde y en qué órganos se agregan las proteínas amiloides. El ejemplo de enfermedades de amiloidosis incluye, de modo no taxativo, amiloidosis AL, AH, ALH (amiloide derivado de anticuerpos de cadena ligera, cadena pesada, cadena pesada y cadena ligera, respectivamente), amiloidosis AA (amiloide derivado de proteína A sérica), amiloidosis
 45 ATTR (amiloide derivado de transtiretina), amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar 1, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis relacionada con hemodiálisis, polineuropatía amiloide familiar III, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, amiloidosis auricular, amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria, amiloidosis localizada por inyección, amiloidosis renal hereditaria y enfermedad de Alzheimer, entre otros. Según otra realización preferida, el amiloide es amiloide beta (A β o A β) y se describe en esta invención como un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

[0086] Según otra realización preferida, el amiloide es HLA-B27 (Colbert y col. 2009 Prion Vol. 3 (1), páginas 15-16) y la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable
 55 del mismo para su uso en el tratamiento de espondiloartropatías, más preferentemente de la espondilitis anquilosante.

Inflamación

[0087] PPP1R15A representa un objetivo prometedor para controlar la inflamación al bloquear la liberación de
 60 citocinas inflamatorias y otros mediadores moleculares secretados que conducen a condiciones patogénicas. Los ejemplos no taxativos de enfermedades o afecciones que tienen inflamación asociada con estas que se pueden tratar con inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) descritos en esta invención incluyen, de modo no taxativo, afecciones inflamatorias no infecciosas o relacionadas con infecciones en el pulmón (es decir, sepsis, infecciones pulmonares, el síndrome de dificultad respiratoria, la displasia broncopulmonar, etc.); afecciones inflamatorias relacionadas o no
 65 infecciosas en otros órganos como colitis, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, nefropatía diabética,

shock hemorrágico, espondiloartropatías, pancreatitis; cáncer inducido por inflamación (es decir, progresión del cáncer en pacientes con colitis o enfermedad inflamatoria intestinal); y similares.

5 **[0088]** Los ejemplos de dichas afecciones inflamatorias patogénicas incluyen enfermedades autoinmunitarias, enfermedades hereditarias, enfermedades crónicas y enfermedades infecciosas tales como alergia, asma, hipercitoquinemia que incluye la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), la sepsis, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (véase el documento WO2011/061340). Preferentemente, la enfermedad infecciosa se selecciona de entre la infección por el virus de la influenza, la infección por el virus de la viruela, la infección por el virus del herpes, el síndrome respiratorio agudo
10 grave (SRAG), la infección por el virus chikungunya y la infección por el virus del Nilo Occidental, infección por el virus del dengue, infección por el virus de la encefalitis japonesa, infección por el virus de la fiebre amarilla e infección por el virus de la hepatitis C.

15 **[0089]** Preferentemente, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de entre síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, dermatitis herpetiforme, vitiligo, micosis fungoide, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis atópica, liquen plano, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda (PLEVA), artritis, síndrome antifosfolípido catastrófico.

20 **[0090]** Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo de colitis, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis, sepsis. Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la sepsis.

25 **[0091]** Según otra realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de espondiloartropatías, más preferentemente de la espondilitis anquilosante.

30 **[0092]** **Los trastornos metabólicos y/o cardiovasculares**, tales como adiposidad, hiperlipidemia, hipercolesterolemia familiar, obesidad, aterosclerosis, hipertensión, enfermedades cardíacas, isquemia cardíaca, accidente cerebrovascular, infracción miocárdica, constricción transaórtica, accidente cerebrovascular y diabetes y trastornos relacionados incluyen hiperglucemia, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia (prediabetes), diabetes tipo I y II de hipersensibilidad a la insulina, resistencia a la insulina, síndrome de Wolcott-Rallison, entre otros.

35 **[0093]** En esta invención, se describe un compuesto de la fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis. Se describe adicionalmente un compuesto de la fórmula (I) para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada en el grupo de hipertensión, enfermedades cardíacas, isquemia cardíaca, accidente cerebrovascular, infracción miocárdica, constricción transaórtica o accidente cerebrovascular vascular. También se describe un compuesto de la fórmula (I) para su uso en el tratamiento de la isquemia cardíaca. En otra realización
40 preferida, el compuesto de la fórmula (I) se usa en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo de hiperglucemia, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia (prediabetes), hipersensibilidad a la insulina de tipo I y II, resistencia a la insulina y síndrome de Wolcott-Rallison. En otra realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) es para su uso en el tratamiento de la prediabetes o diabetes, más preferentemente diabetes tipo 2.

45 **Osteoporosis:**

[0094] Grossman y col. (BMC Musculoskeletal disorders 2013, 14, 197), He y col. (Cellular Signaling 2013, 25 552-560) demostraron que el salubrinal (Boyce y col. 2005) bloquea eficientemente la osteoporosis en el modelo de ratones y estimula la formación ósea. Sin embargo,
50

[0095] el salubrinal es tóxico y no se puede usar para tratar a pacientes humanos. Por el contrario, se predice que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) son seguros y podrían ser útiles para el tratamiento de la osteoporosis. En una realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) se usa en el tratamiento de la osteoporosis.

55 **Traumatismo del sistema nervioso**

[0096] Ohri y col. (Neurobiology of disease, 2013 Vol. 58, páginas 29-37) demostraron que el salubrinal mejoró significativamente la locomoción de las extremidades traseras, lo que corresponde con una mejor conservación de la materia blanca y una disminución de la apoptosis de oligodendrocitos, mejorando así la recuperación funcional
60 después de la lesión de la médula espinal.

[0097] Se predice que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) de la invención son seguros y podrían ser útiles para reducir la pérdida de oligodendrocitos después de una lesión traumática de la médula espinal y para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la lesión de la médula espinal. En una realización preferida, el compuesto
65 de la fórmula (I) es para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la lesión de la médula espinal.

Isquemia, isquemia cerebral, apnea del sueño

[0098] Se describen procedimientos para usar inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) de la invención para prevenir y/o tratar el daño tisular resultante de daño celular o muerte debido a necrosis o apoptosis. Los ejemplos de daño del tejido neural incluyen isquemia y lesión por reperfusión, tal como un accidente cerebrovascular isquémico cerebral y un traumatismo craneal. En una realización preferida, el compuesto de la fórmula (I) es para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una isquemia cerebral, tal como un accidente cerebrovascular isquémico cerebral y un traumatismo craneal.

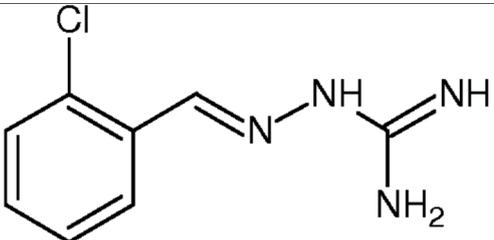
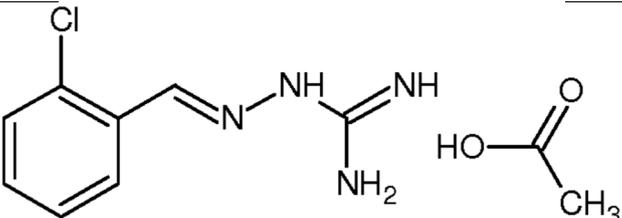
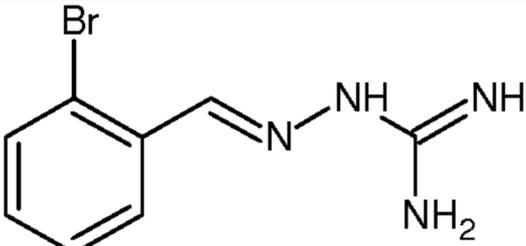
10

Envejecimiento

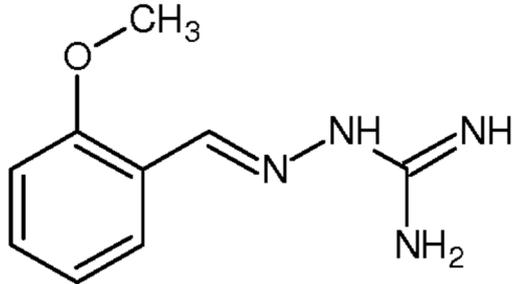
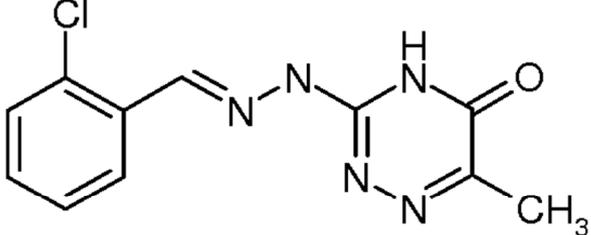
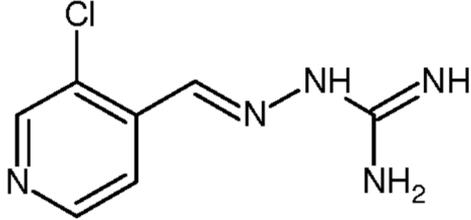
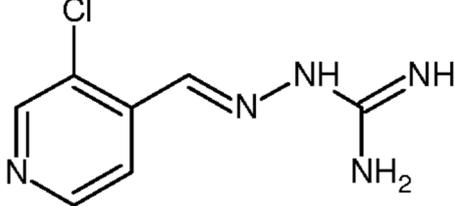
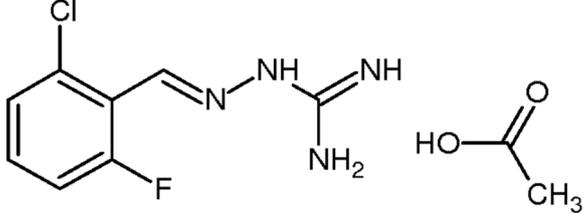
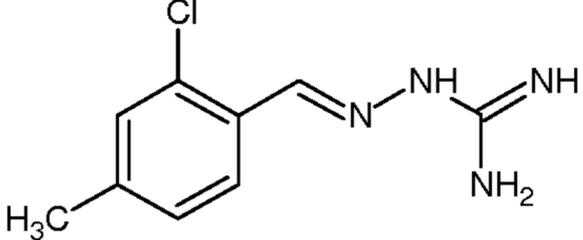
[0099] El envejecimiento se asocia a la degeneración de células, tejidos y órganos, lo que resulta en enfermedades como cáncer, insuficiencia cardiovascular, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hígado graso no alcohólico y enfermedades neurodegenerativas, así como también la disminución de la mayoría de las medidas de rendimiento fisiológico.

[0100] En biología, la senescencia es el estado o proceso del envejecimiento. La senescencia celular es un fenómeno donde las células aisladas demuestran una capacidad limitada para dividirse en cultivo (el Límite Hayflick, descubierto por Leonard Hayflick en 1961), mientras que la senescencia orgánica es el envejecimiento de los organismos. La senescencia orgánica se caracteriza por la disminución de la capacidad de respuesta al estrés, el aumento del desequilibrio homeostático y el aumento del riesgo de enfermedad; en particular, la RPD se deteriora con la edad (Naidoo y col., 2008, J Neurosci, 28, 6539-48). Por consiguiente, prolongar el efecto beneficioso de la RPD mediante la inhibición de la fosfatasa α de eIF2 podría mejorar los trastornos relacionados con la edad. Por lo tanto, se predice que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) de la invención son seguros y podrían ser útiles para prevenir y/o tratar enfermedades o trastornos relacionados con la vida útil o la capacidad proliferativa de las células, y enfermedades o afecciones de la enfermedad inducidas o exacerbadas por la senescencia celular en un animal, más específicamente seres humanos.

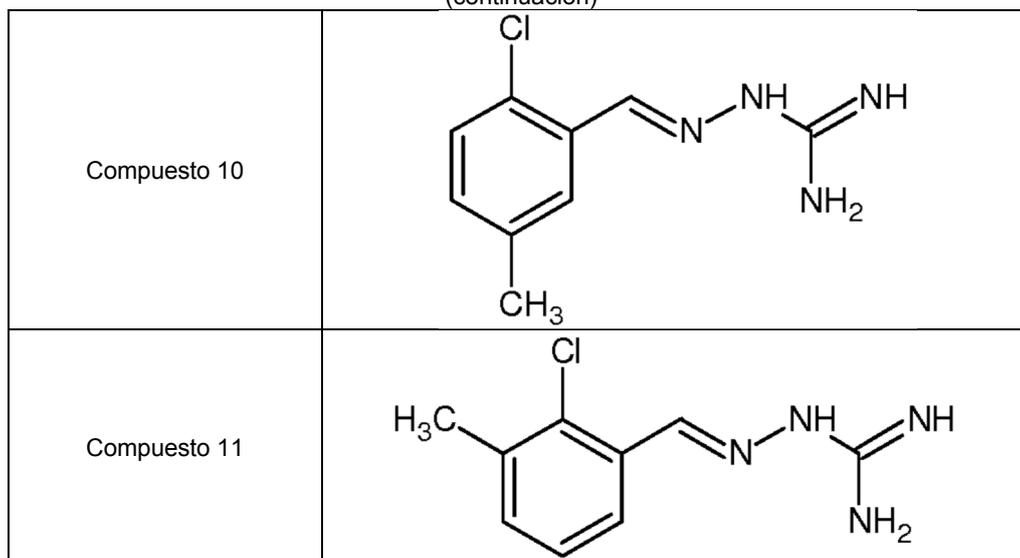
30 **[0101]** Según una realización particular, la presente invención se refiere a un compuesto seleccionado de entre:

Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	

(continuación)

Compuesto 4	
Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7	
Compuesto 8	
Compuesto 9	

(continuación)



[0102] Para su uso en el tratamiento y/o prevención de una o más enfermedades seleccionadas de entre el grupo de fibrosis quística, siendo inflamación sepsis y colitis, enfermedades retinianas, poliglutamina y polialanina, leucodistrofias y esclerosis múltiple.

[0103] Según una realización, la presente invención también se refiere a un compuesto seleccionado de entre los compuestos anteriores 1 a 11, así como también a las composiciones farmacéuticas que lo comprenden.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0104] Para su uso según la presente invención, los compuestos o sales fisiológicamente aceptables, ésteres u otros derivados fisiológicamente funcionales de los mismos, descritos en esta invención, pueden presentarse como una formulación farmacéutica, que comprende los compuestos o sal fisiológicamente aceptable, éster u otro derivado fisiológicamente funcional de los mismos, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables por lo tanto y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. El o los vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria.

[0105] Los ejemplos de dichos excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas en esta invención se pueden encontrar en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller.

[0106] Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

[0107] Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

[0108] La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente se puede seleccionar con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s), amortiguador(es), agente(s) aromatizante(s), agente(s) tensoactivo(s), espesante(s), conservante(s) (incluidos los antioxidantes) adecuados y similares, así como también sustancias incluidas con el fin de hacer isotónica la formulación con la sangre del receptor previsto.

[0109] Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, alginato de tragacanto o sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

[0110] Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

[0111] Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saborizantes en la

composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

[0112] Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración oral, tópica (que incluye dérmica, bucal, ocular y sublingual), rectal o parenteral (que incluye subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), nasal, intraocular y pulmonar, por ejemplo, por inhalación. La formulación, según corresponda, se puede presentar convenientemente en unidades de dosificación discretas y se puede preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar un compuesto activo a vehículos líquidos o sólidos finamente divididos o ambos y, a continuación, si es necesario, dar forma al producto en la formulación deseada.

[0113] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral, donde el vehículo es un sólido, se presentan más preferentemente como formulaciones de dosis unitarias tales como bolos, cápsulas o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada de compuesto activo. Un comprimido se puede fabricar mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar mediante la compresión en una máquina adecuada un compuesto activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente lubricante, agente tensoactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando un compuesto activo con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden estar recubiertos y, si no están recubiertos, opcionalmente pueden ranurarse. Las cápsulas se pueden preparar llenando un compuesto activo, ya sea solo o mezclado con uno o más ingredientes accesorios, en las carcasas de la cápsula y, a continuación, sellándolas de la manera habitual. Los sellos son análogos a las cápsulas donde un compuesto activo junto con cualquier ingrediente o ingredientes accesorios se sella en una envoltura de papel de arroz. Un compuesto activo también se puede formular como gránulos dispersables, que, por ejemplo, se pueden suspender en agua antes de la administración, o espolvorear en los alimentos. Los gránulos pueden envasarse, por ejemplo, en un sobre. Las formulaciones adecuadas para administración oral donde el vehículo es un líquido se pueden presentar como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua.

[0114] Las formulaciones para administración oral incluyen formas de dosificación de liberación controlada, por ejemplo, comprimidos donde un compuesto activo se formula en una matriz de control de liberación adecuada o se recubre con una película de control de liberación adecuada. Dichas formulaciones pueden ser particularmente convenientes para el uso profiláctico. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal donde el vehículo es un sólido se presentan más preferentemente como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales comúnmente usados en la materia. Los supositorios se pueden formar convenientemente mediante la mezcla de un compuesto activo con el o los vehículos ablandados o fundidos, seguido de enfriamiento y conformación en moldes.

[0115] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles o suspensiones de un compuesto activo en vehículos acuosos u oleaginosos.

[0116] Las formulaciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para administración oftálmica, en particular para administración intraocular, intravítrea, ocular tópica o periocular, más preferentemente para administración ocular tópica o intravítrea.

[0117] Las preparaciones inyectables pueden adaptarse para inyección en bolo o infusión continua. Dichas preparaciones se presentan convenientemente en recipientes de dosis unitarias o multidosis que se sellan después de la introducción de la formulación hasta que se requiera su uso. Alternativamente, un compuesto activo puede estar en forma de polvo que se constituye con un vehículo adecuado, tal como agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

[0118] Un compuesto activo también se puede formular como preparaciones de depósito de acción prolongada, que se pueden administrar mediante inyección intramuscular o mediante implantación, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular. Las preparaciones de depósito pueden incluir, por ejemplo, materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados o resinas de intercambio iónico. Dichas formulaciones de acción prolongada son particularmente convenientes para uso profiláctico.

[0119] Las formulaciones adecuadas para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal se presentan de manera que las partículas que contienen un compuesto activo y que tienen de forma deseable un diámetro en el intervalo de 0,5 a 7 micras se administren en el árbol bronquial del receptor. Como una posibilidad, dichas formulaciones están en forma de polvos finamente conminutos que pueden presentarse convenientemente en una cápsula perforable, adecuadamente de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un dispositivo de inhalación, o alternativamente como una formulación autopropulsada que comprende un compuesto activo, un propulsor líquido o gaseoso adecuado y opcionalmente otros ingredientes tales como un tensoactivo y/o un diluyente sólido. Los propulsores líquidos adecuados incluyen propano y los clorofluorocarbonos, y los propulsores gaseosos adecuados incluyen dióxido de carbono. También se pueden emplear formulaciones autopropulsantes donde un compuesto activo

se dispensa en forma de gotitas de solución o suspensión.

[0120] Dichas formulaciones autopropulsadas son análogas a las conocidas en la materia y se pueden preparar mediante procedimientos establecidos. Se presentan adecuadamente en un recipiente provisto de una válvula de funcionamiento manual o automático que tiene las características de pulverización deseadas; ventajosamente, la válvula es de un tipo medido que suministra un volumen fijo, por ejemplo, de 25 a 100 microlitros, después de cada operación del mismo.

[0121] Como una posibilidad adicional, un compuesto activo puede tener la forma de una solución o suspensión para su uso en un atomizador o nebulizador mediante el cual se emplea una corriente de aire acelerada o agitación ultrasónica para producir una niebla de gotas finas para su inhalación.

[0122] Las formulaciones adecuadas para administración nasal incluyen preparaciones generalmente similares a las descritas anteriormente para su administración pulmonar. Cuando se dispensan, dichas formulaciones deben tener de manera deseable un diámetro de partícula en el intervalo de 10 a 200 micras para permitir la retención en la cavidad nasal; esto puede lograrse, según corresponda, mediante el uso de un polvo de un tamaño de partícula adecuado o la elección de una válvula adecuada. Otras formulaciones adecuadas incluyen polvos gruesos que tienen un diámetro de partícula en el intervalo de 20 a 500 micras, para su administración por inhalación rápida a través del pasaje nasal desde un recipiente mantenido cerca de la nariz, y gotas nasales que comprenden del 0,2 al 5 % p/v de un compuesto activo en solución o suspensión acuosa u oleosa.

[0123] Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, de modo no taxativo, 0,1 M y preferentemente 0,05 M de amortiguador de fosfato o el 0,8 % de solución salina. Adicionalmente, dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

[0124] Las formulaciones adecuadas para formulación tópica se pueden proporcionar, por ejemplo, como geles, cremas o ungüentos. Dichas preparaciones se pueden aplicar, por ejemplo, a una herida o úlcera extendida directamente sobre la superficie de la herida o úlcera o llevada sobre un soporte adecuado tal como una venda, gasa, malla o similar que se puede aplicar sobre y sobre el área a tratar.

[0125] También se pueden proporcionar formulaciones líquidas o en polvo que se pueden rociar o rociar directamente sobre el sitio a tratar, por ejemplo, una herida o úlcera. Alternativamente, un vehículo tal como una venda, gasa, malla o similar puede rociarse o espolvorearse con la formulación y, a continuación, aplicarse en el sitio a tratar.

[0126] Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o veterinaria como se describió anteriormente, el proceso comprende asociar el o los compuestos activos al vehículo, por ejemplo, mezclándolos.

[0127] En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, moldeando el producto. La invención se extiende a procedimientos para preparar una composición farmacéutica que comprende juntar o asociar un compuesto de la fórmula general (I) a un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.

50 SALES/ÉSTERES

[0128] Los compuestos de la invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular, sales o ésteres farmacéutica y veterinariamente aceptables.

[0129] Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen la adición de los ácido o sales base adecuados de los mismos. Se puede encontrar una revisión de las sales farmacéuticamente adecuadas en Berge y col., J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácidos hidrofálicos tales como clorhidrato, bromhidrato e hidroyoduro, ácido sulfúrico, sulfato de ácido fosfórico, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato y ácidos sulfónicos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que no están sustituidos o sustituidos (por ejemplo, por halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, oxálicos, malónicos, succínicos, maleicos, fumáricos, ftálicos o tetraftálicos; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos sulfónicos de arilo o alquilo (C₁-C₄) que son no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, por un halógeno), tales como el

ácido sulfónico de p-tolueno o metano. Las sales que no son farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden seguir siendo valiosas como productos intermedios.

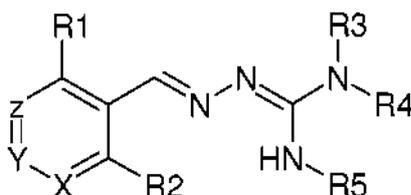
[0130] Las sales preferidas incluyen, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, lactato, gluconato, citrato, tartrato, maleato, malato, pantotenato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, digluconato, ciclopentano, glucoheptanato, glicerofosfato, oxalato, heptanoato, hexanoato, fumarato, nicotinato, palmoato, pectinato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tartrato, lactobionato, pivolato, alcanforato, undecanoato y succinato, ácidos sulfónicos orgánicos tales como metanosulfonato, etanosulfonato, 2-hidroxietano sulfonato, alcanosulfonato, 2-naftaleno-nesulfonato, bencenosulfonato, p-clorobencenosulfonato y p-toluenosulfonato; y ácidos inorgánicos como clorhidrato, bromhidrato, yoduro de hidrógeno, sulfato, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato, ácidos fosfóricos y sulfónicos. Según una realización preferida, la sal es acetato.

[0131] Los ésteres se forman usando ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esterifique. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que no están sustituidos o sustituidos (por ejemplo, por halógeno), tal como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o insaturado, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos sulfónicos de arilo o alquilo (C₁-C₄) que son no sustituidos o sustituidos (por ejemplo, por un halógeno), tales como el ácido sulfónico de p-tolueno o metano. Los hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Los alcoholes incluyen alcoholes-alcanos de 1 a 12 átomos de carbono que pueden ser no sustituidos o sustituidos, por ejemplo, por un halógeno).

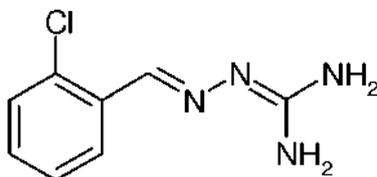
25 ENANTIÓMEROS/AUTÓMEROS

[0132] En todos los aspectos de la presente invención analizados anteriormente, la invención incluye, según corresponda, todos los enantiómeros, diastereoisómeros y tautómeros de los compuestos de la invención. El experto en la materia reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse mediante procedimientos conocidos en la materia. Los enantiómeros se caracterizan por la configuración absoluta de sus centros quirales y se describen por las reglas de secuenciación R y S de Cahn, Ingold y Prelog. Tales convenciones son bien conocidas en la materia (por ejemplo, véase 'Advanced Organic Chemistry', 3ª edición, ed. March, J., John Wiley and Sons, Nueva York, 1985).

[0133] Por consiguiente, los compuestos de la fórmula (I) también incluyen las formas tautómeras de la fórmula:



[0134] Como ejemplo ilustrativo, una forma tautómera del ejemplo 1 es:



[0135] Los compuestos de la invención que contienen un centro quiral pueden usarse como una mezcla racémica, una mezcla enantioméricamente enriquecida o la mezcla racémica puede separarse usando técnicas bien conocidas y un enantiómero individual puede usarse solo.

ISÓMEROS ESTÉREOS Y GEOMÉTRICOS

[0136] Algunos de los compuestos de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y, por lo tanto, pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de esos agentes inhibidores y las mezclas de los mismos. Los

términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas conserven la actividad funcional apropiada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

[0137] La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como aquella en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica que generalmente se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en el agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Determinadas variaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ^3H o ^{14}C , son útiles en estudios de distribución de fármaco y/o sustrato tisular. Los isótopos tritados, es decir, ^3H , y carbono-14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Por ejemplo, la invención incluye compuestos de la fórmula general (I) donde cualquier átomo de hidrógeno ha sido reemplazado por un átomo de deuterio. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden preparar generalmente mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.

PROFÁRMACOS

[0138] La invención incluye además los compuestos de la presente invención en forma de profármaco, es decir, compuestos unidos covalentemente que liberan el fármaco original activo según la fórmula general (I) *in vivo*. Dichos profármacos son generalmente compuestos de la invención en los que se han modificado uno o más grupos adecuados de modo que la modificación se pueda revertir tras la administración a un sujeto humano o mamífero. Por lo general, la reversión se efectúa mediante una enzima presente de forma natural en dicho sujeto, aunque es posible que se administre un segundo agente junto con dicho profármaco para efectuar la reversión *in vivo*. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente), donde la reversión puede llevarse a cabo como una esterasa, etc. Otros sistemas de este tipo serán bien conocidos por los expertos en la materia.

SOLVATOS

[0139] La presente invención también incluye formas de solvato de los compuestos de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

POLIMORFOS

[0140] La invención se refiere además a los compuestos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas (an)hídridas. Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de dichas formas al variar ligeramente el procedimiento de purificación y/o aislamiento de los solventes usados en la preparación sintética de dichos compuestos.

ADMINISTRACIÓN

[0141] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden adaptar para administración rectal, nasal, intrabronquial, tópica (incluyendo administración bucal, sublingual y oftálmica, en particular para administración intraocular, intravítrea, tópica ocular o periocular), vaginal o parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intradérmica), intraperitoneal o intratecal. Preferentemente, la formulación es una formulación administrada por vía oral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, es decir, en forma de porciones separadas que contienen una dosis unitaria, o un múltiplo o subconjunto de una dosis unitaria. A modo de ejemplo, las formulaciones pueden ser en forma de comprimidos y cápsulas de liberación sostenida, y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica farmacéutica.

[0142] Las formulaciones para administración oral en la presente invención se pueden presentar como: unidades discretas tales como cápsulas, gellules, gotas, sellos, píldoras o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del agente activo; como polvo o gránulos; como una solución, emulsión o suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como emulsión líquida de aceite en agua o emulsión líquida de agua en aceite; o como un bolo, etc. Preferentemente, estas composiciones contienen de 1 a 250 mg, más preferentemente de 10 a 100 mg, y más preferentemente de 1 a 100 mg, de ingrediente activo por dosis.

[0143] Para composiciones para administración oral (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), el término

"vehículo aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, por ejemplo, agentes de unión, por ejemplo, jarabe, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; rellenos y vehículos, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, ácido esteárico de estearato de glicerol, fluido de silicona, ceras de talco, aceites y sílice coloidal. También se pueden usar agentes aromatizantes como menta, aceite de invernol, aromatizante de cereza y similares. Puede ser deseable añadir un agente colorante para hacer que la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Los comprimidos también se pueden recubrir mediante procedimientos bien conocidos en la materia.

10

[0144] Un comprimido se puede fabricar mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el agente activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensoactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden estar recubiertos o ranurados y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo.

15

[0145] Otras formulaciones adecuadas para administración oral incluyen pastillas que comprenden el agente activo en una base aromatizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el agente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el agente activo en un vehículo líquido adecuado.

20

[0146] Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que se pueden inyectar por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraocular, tópica, periocular o intramuscular, y que se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables.

25

[0147] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, aerosoles, soluciones o polvos de polvo.

30

[0148] Un medio alternativo de administración transdérmica es el uso de un parche cutáneo. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede incorporar en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El ingrediente activo también se puede incorporar, en una concentración de entre 1 y 10 % en peso, en un ungüento que consiste en una base de cera blanca o parafina blanda blanca junto con los estabilizantes y conservantes que puedan ser necesarios.

35

DOSIFICACIÓN

[0149] Un experto en la materia puede determinar fácilmente una dosis adecuada de una de las composiciones de esta invención para administrarla a un sujeto sin experimentación indebida. Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el individuo sometido a terapia. Las dosificaciones descritas en esta invención son ejemplos del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se ameriten intervalos de dosificación más altos o más bajos, y tales están dentro del alcance de la presente invención.

40

45

[0150] Según la presente invención, se puede administrar una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula general (I) para dirigirse a una afección o enfermedad particular. Por supuesto, esta cantidad de dosificación se modificará adicionalmente según el tipo de administración del compuesto. Por ejemplo, para lograr una "cantidad efectiva" para terapia aguda, se prefiere la administración parenteral de un compuesto de la fórmula general (I). Una infusión intravenosa del compuesto en dextrosa al 5 % en agua o solución salina normal, o una formulación similar con excipientes adecuados, es más efectiva, aunque también es útil una inyección en bolo intramuscular. Típicamente, la dosis parenteral será de alrededor de 0,01 a alrededor de 100 mg/kg; preferentemente entre 0,1 y 20 mg/kg, de manera de mantener la concentración del fármaco en el plasma en una concentración efectiva. Los compuestos se pueden administrar de una a cuatro veces al día a un nivel para lograr una dosis diaria total de alrededor de 0,4 a alrededor de 400 mg/kg/día. El experto en la materia determina fácilmente la cantidad exacta de un compuesto de la invención que es terapéuticamente efectiva, y la vía por la cual se administra mejor dicho compuesto, comparando el nivel sanguíneo del agente con la concentración necesaria para tener un efecto terapéutico.

50

55

60

[0151] Los compuestos de esta invención también se pueden administrar oralmente al paciente, de manera tal que la concentración del fármaco sea suficiente para lograr una o más de las indicaciones terapéuticas descritas en la presente. Típicamente, una composición farmacéutica que contiene el compuesto se administra a una dosis oral de

65

entre alrededor de 0,1 y alrededor de 50 mg/kg de una manera consistente con la afección del paciente. Preferentemente, la dosis oral sería de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg.

5 **[0152]** No se esperan efectos toxicológicos inaceptables cuando los compuestos de la presente invención se administran según la presente invención. Los compuestos de esta invención, que pueden tener buena biodisponibilidad, se pueden analizar en uno de varios ensayos biológicos para determinar la concentración de un compuesto que se requiere para tener un efecto farmacológico dado.

COMBINACIONES

10

[0153] En una realización particularmente preferida, el uno o más compuestos de la invención se administran en combinación con uno o más agentes activos adicionales, por ejemplo, fármacos existentes disponibles en el mercado. En tales casos, los compuestos de la invención se pueden administrar consecutiva, simultánea o secuencialmente con el uno o más agentes activos adicionales.

15

[0154] Los medicamentos en general son más eficaces cuando se usan en combinación. En particular, la terapia de combinación es deseable para evitar una superposición de toxicidades importantes, mecanismo de acción y mecanismo (s) de resistencia. Además, también es deseable administrar la mayoría de los fármacos a sus dosis máximas toleradas con intervalos de tiempo mínimos entre dichas dosis. Las principales ventajas de la combinación de fármacos son que puede promover efectos aditivos o posibles efectos sinérgicos a través de interacciones bioquímicas y también puede disminuir la aparición de resistencia.

20

[0155] Se pueden sugerir combinaciones beneficiosas mediante el estudio de la actividad inhibidora de los compuestos de prueba con agentes conocidos o sospechosos de ser valiosos en el tratamiento de un trastorno particular. Este procedimiento también se puede usar para determinar el orden de administración de los agentes, es decir, antes, simultáneamente o después de la administración. Dicha programación puede ser una característica de todos los agentes activos identificados en esta invención.

25

[0156] Según la realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BiP y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable (véase el documento WO2013/124484). El compuesto que aumenta la expresión y/o actividad de la proteína BiP se selecciona del grupo que consiste en ácido valproico o un derivado del mismo, trichostatina A, litio, 1-(3,4-dihidroxi-fenil)-2-tiocianato-etanona y exendina-4. Según una realización preferida, la proteína BiP es ácido valproico o un derivado del mismo, tal como ácido 2-eno-valproico.

30

[0157] Según una realización preferida, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BiP y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para tratar un trastorno asociado a la vía de PPP1R15A y asociado al estrés por mal plegamiento de proteínas y en particular con acumulación de proteínas mal plegadas, seleccionadas de entre el grupo de enfermedades retinianas.

40

ENSAYO

45 **[0158]** Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un compuesto tal como se describió anteriormente en un ensayo para identificar compuestos candidatos adicionales capaces de inhibir PPP1R15A-PP1.

[0159] Preferentemente, el ensayo es un ensayo de unión competitiva. Más preferentemente, el ensayo de unión competitiva comprende poner en contacto un compuesto de la invención con PPP1R15A-PP1 y un compuesto candidato y detectar cualquier cambio en la interacción entre el compuesto según la invención y PPP1R15A-PP1.

50

[0160] Preferentemente, el compuesto candidato se genera mediante modificación de SAR convencional de un compuesto de la invención. Tal como se usa en esta invención, el término "modificación de SAR convencional" se refiere a procedimientos estándares conocidos en la técnica para variar un compuesto dado mediante derivación química.

55

[0161] Por consiguiente, en un aspecto, el compuesto identificado puede actuar como un modelo (por ejemplo, una plantilla) para el desarrollo de otros compuestos. Los compuestos empleados en dicha prueba pueden estar libres en solución, fijados a un soporte sólido, soportados en una superficie celular o ubicados intracelularmente. Se puede medir la abolición de la actividad o la formación de complejos de unión entre el compuesto y el agente que se analiza.

60

[0162] El ensayo de la presente invención puede ser un tamiz, mediante el cual se evalúan una cantidad de agentes. En un aspecto, el procedimiento de ensayo de la presente invención es una pantalla de alto rendimiento.

[0163] La presente invención también contempla el uso de ensayos de detección de fármacos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a un compuesto compiten específicamente con un compuesto

65

de prueba por la unión a un compuesto.

5 **[0164]** Otra técnica para la detección proporciona la detección de alto rendimiento (HTS) de agentes que tienen afinidad de unión adecuada a las sustancias y se basa en el procedimiento descrito en detalle en el documento WO 84/03564.

[0165] Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para el cribado a pequeña y gran escala de compuestos de prueba, así como también en ensayos cuantitativos.

10 **[0166]** Preferentemente, el ensayo de unión competitiva comprende poner en contacto un compuesto de la invención con PPP1R15A-PP1 en presencia de un sustrato conocido de PPP1R15A-PP1 y detectar cualquier cambio en la interacción entre dicho PPP1R15A-PP1 y dicho sustrato conocido.

[0167] Un aspecto adicional de la invención proporciona un procedimiento para detectar la unión de un ligando a PPP1R15A-PP1, dicho procedimiento comprende las etapas de:

(i) poner en contacto un ligando con PPP1R15A-PP1 en presencia de un sustrato conocido;

20 (ii) detectar cualquier cambio en la interacción entre PPP1R15A-PP1 y dicho sustrato conocido; y donde dicho ligando es un compuesto de la invención.

[0168] Un aspecto de la invención se refiere a un proceso que comprende las etapas de:

25 (a) efectuar un procedimiento de ensayo descrito anteriormente;
(b) identificar uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando; y
(c) preparar una cantidad de dicho uno o más ligandos.

30 **[0169]** Otro aspecto de la invención proporciona un proceso que comprende las etapas de:

(a) efectuar un procedimiento de ensayo descrito anteriormente;
(b) identificar uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando; y
(c) preparar una composición farmacéutica que comprende dicho uno o más ligandos.

35 Otro aspecto de la invención proporciona un proceso que comprende las etapas de:

40 (a) efectuar un procedimiento de ensayo descrito anteriormente;
(b) identificar uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión a ligando;
(c) modificar dicho uno o más ligandos capaces de unirse a un dominio de unión al ligando;
(d) efectuar el procedimiento de ensayo descrito anteriormente;
(e) preparar opcionalmente una composición farmacéutica que comprende dicho uno o más ligandos.

[0170] La invención también se refiere a un ligando identificado por el procedimiento descrito anteriormente. Incluso otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ligando identificado por el procedimiento descrito anteriormente.

50 **[0171]** Otro aspecto descrito se refiere al uso de un ligando identificado por el procedimiento descrito anteriormente en la preparación de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la acumulación de proteínas mal plegadas como se definió anteriormente.

[0172] Los procedimientos anteriores se pueden usar para analizar un ligando útil como un inhibidor de PPP1R15A-PP1.

55 **[0173]** Los compuestos de la fórmula general (I) son útiles tanto como herramientas de laboratorio como como agentes terapéuticos. En el laboratorio, determinados compuestos de la invención son útiles para establecer si una diana conocida o recientemente descubierta contribuye a una función bioquímica crítica o al menos significativa durante el establecimiento o la progresión de un estado de enfermedad, un proceso comúnmente denominado "validación de diana".

60 **[0174]** La presente invención se describe adicionalmente con referencia a las siguientes figuras en las que:

La **Figura 1** muestra la protección dependiente de la dosis de las células Hela por el compuesto 1 de la invención contra el estrés del RE, inducido por la exposición de 6 horas a tunicamicina.

65 La **Figura 2** muestra la protección dependiente de la dosis de oligodendrocitos de rata lesionados por interferón

gamma mediante el compuesto 1 de la invención.

La **Figura 3** muestra la protección dependiente de la dosis de las neuronas de rata mesencefálicas primarias lesionadas con rotenona mediante el compuesto 2 de la invención.

La **Figura 4** muestra la protección dependiente de la dosis de neuronas de rata cortical primaria lesionadas de amiloide beta 1-42 mediante el compuesto 2 de la invención.

La **Figura 5** muestra la capacidad del compuesto 2 a diferentes concentraciones y regímenes para prevenir defectos motores de ALS en ratones SOD1 mutantes.

IFB-B: El Compuesto 2 se administra por vía oral.

BID: administración dos veces al día

QD: administración de una vez al día

La **Figura 6** muestra la capacidad del compuesto 2 en diferentes concentraciones y regímenes para prevenir defectos motores de la CMT-1A en PMP-22 en ratas transgénicas (TG) que sobreexpresan PMP-22. El Compuesto 2 se administra por vía oral una vez al día.

La **Figura 7** muestra la capacidad del compuesto 1 a 5 microM para prevenir la acumulación de la proteína DM20 mutada T181P en linfocitos 293T humanos.

La **Figura 8** muestra la capacidad de los compuestos 6 para prevenir la muerte celular asociada a la acumulación de insulina Akita propensa a la deformación expresada en células Min6.

La **Figura 9** muestra la capacidad del compuesto 1 y el compuesto 6 en diferentes concentraciones para prevenir la muerte celular de insulinoma Min6 asociada a la acumulación de proteína mal plegada inducida por la exposición de 6 horas a tunicamicina.

La **Figura 10** muestra la capacidad del compuesto 1 y el compuesto 6 en diferentes concentraciones para prevenir la muerte celular de insulinoma INS1 asociada a la acumulación de proteína mal plegada inducida por la exposición de 6 horas a tunicamicina.

La **Figura 11** muestra la capacidad del compuesto 2 para proteger los fotorreceptores contra la apoptosis y preserva la detección de luz en ratones BBS12^{-/-}. Electrorretinograma (ERG). Media tabulada del porcentaje diferente entre el ojo BBS12^{-/-} con el compuesto 2 (2,5 microM) en asociación con el ácido valproico (0,2 mM) o el compuesto 2 (2,5 microM) solo frente al ojo tratado con el vehículo (PBS). Positivo traduce un aumento en la respuesta de ERG y negativo traduce una disminución en ERG en comparación con el ojo tratado con PBS. n = 10-14 por grupo.

La **Figura 12** muestra la capacidad del compuesto 2 para disminuir la carga de proteínas en el retículo endoplasmático en ratones BBS12^{-/-}. Retículo endoplasmático (RE) de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) de fotorreceptores BBS12^{-/-} en respuesta a la administración del Compuesto 2 (2,5 microM) en combinación con el ácido valproico (VPA) (0,2 mM) o el PBS. La dilatación de las cisternas del RE se observa cuando solo se inyecta PBS (izquierda), mientras que el Compuesto 2, en combinación con el VPA, es capaz de disminuir esta dilatación (derecha) después de una única inyección intravítrea.

La **Figura 13** muestra la capacidad de los compuestos 1, 6 y 8 (a 25 microM) para prevenir la producción de interferón de tipo I por fibroblastos embrionarios de ratón lipofectados con poli I:C.

La **Figura 14** muestra la capacidad del Compuesto 2 para proteger los cardiomiocitos neonatales de rata contra la apoptosis inducida por hipoxia. El gráfico muestra el porcentaje de células apoptóticas medidas mediante análisis FACS. Los cardiomiocitos se expusieron a hipoxia (0,3 % O₂) durante 36 h en ausencia (0 mM) o en presencia de concentraciones indicadas del Compuesto 2 (n=3).

[0175] La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

60 1- MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

[0176]

El Compuesto 3 se compró a Chembridge, ref: 5173161.

El Compuesto 4 se compró a Chemdiv, ref: 0589-0012.

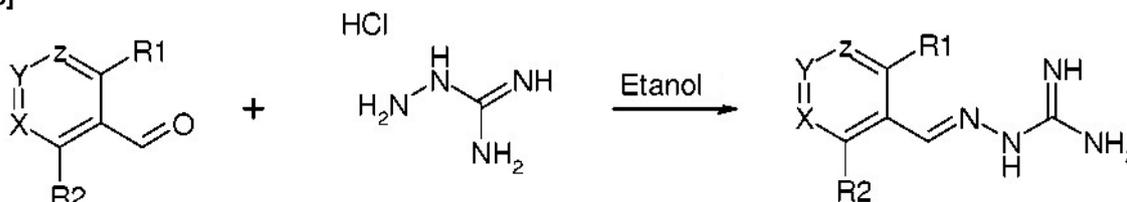
El Compuesto 5 se compró a Chemdiv. ref: 1683-6502.

1.1 - Preparación de los compuestos según la presente invención

5 [0177] Los reactivos y compuestos comerciales se compraron a Acros Organics, Sigma-Aldrich. Los compuestos según la presente invención se pueden preparar según el siguiente procedimiento general:

Procedimiento general A:

10 [0178]



[0179] A una solución de benzaldehído (1eq.) en etanol (300 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (1 eq.) y acetato de sodio (1 eq.) a 25°C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80°C durante las siguientes ~6 horas. Se monitorizó la finalización de la reacción en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Después de completar la reacción, se dejó enfriar la mezcla de reacción a 25°C y se vertió en la solución saturada de NaHCO₃ (700 ml). El precipitado resultante se filtró al vacío y se lavó con agua (100 ml). El material sólido resultante se tituló con dietileter (2 x 25 ml) y se secó al vacío para proporcionar el derivado de aminoguanidina sustituido deseado.

20

[0180] Los siguientes compuestos se prepararon según el procedimiento general A:

Compuesto 1: 2-(2-clorobencilideno)hidrazinacarboximida

25 [0181] Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2-clorobenzaldehído (10 g) para proporcionar 11,1 g del compuesto deseado (rendimiento: 79,6 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 5,66 (s, 2H); 6,05 (s amplio, 2H); 7,27 (m, 2H); 7,40 (m, 1H); 8,14 (dd, 1H); 8,27 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 197,2 [M+H]⁺.

Compuesto 2: acetato de 2-(2-clorobencilideno)hidrazinacarboximida

30

[0182] A una suspensión de 2-clorobenzaldehído (30,0 g) y bicarbonato de aminoguanidina (29,0 g) en metanol (450 ml) se le añadió ácido acético (30 ml) a 25°C. La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 30 minutos. Se monitorizó la finalización de la reacción en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Después de completar la reacción, se dejó enfriar la mezcla de reacción a 25°C y se concentró al vacío. El residuo se suspendió en metanol (250 ml) y el material insoluble se eliminó mediante filtración. El filtrado resultante se concentró al vacío y el proceso mencionado anteriormente (suspensión en metanol + filtración) se repitió durante tres veces más. A continuación, el material sólido se trituró con éter dietílico (3 x 100 ml) y se secó al vacío para proporcionar 46,0 g de sal de acetato de 2-(2-clorobencilideno)hidrazinacarboximida (rendimiento: 84,2 %) LC-MS: *m/z* = 197,2 (M+H). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1,81 (s, 3H), 7,12 (m, 4H); 7,34 (m, 2H); 7,46 (m, 1H); 8,22 (m, 1H); 8,36 (s, 1H); LC-MS: *m/z* = 197,2 [M+H]⁺.

40

Compuesto 6: 2-[(3-cloropiridin-4-il)metiliden]hidrazinacarboximida

[0183] Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2-clorobenzaldehído (0,5 g) para proporcionar 0,16 g del compuesto deseado (rendimiento: 23 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 6,00 (s amplio, 2H); 6,32 (s amplio, 2H); 8,10 (d, 1H); 8,14 (s, 1H); 8,35 (dd, 1H); 8,52 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 198,0 [M+H]⁺.

45

Compuesto 7: acetato de 2-[(3-cloropiridin-4-il)metiliden]hidrazinacarboximida

[0184] A una suspensión de 3-cloroisonicotinaldehído (2,0 g) y bicarbonato de aminoguanidina (2,12 g) en metanol (28 ml) se le añadió ácido acético (2 ml) a 25°C. La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante ~2 horas. Se monitorizó la finalización de la reacción en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Después de completar la reacción, la mezcla bruta se dejó enfriar hasta 25°C y se concentró al vacío. El material sólido se trituró con metanol: éter dietílico (9:1) (4 x 50 ml) y se secó al vacío hasta 2,0 g de sal de acetato de 2-[(3-cloropiridin-4-il)metiliden]hidrazinacarboximidamidamida (rendimiento: 55,1 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 6,01 (brs, 2H); 6,48 (m, 4H); 8,12 (d, 1H); 8,16 (s, 1H); 8,38 (dd, 1H); 8,54 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 198,1 [M+H]⁺.

55

Compuesto 8: acetato de 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)hidrazinacarboximida

[0185] A una suspensión de 2-cloro-6-fluorobenzaldehído (1,5 g) y bicarbonato de aminoguanidina (1,29 g) en metanol (22 ml) se le añadió ácido acético (1,5 ml) a 25°C. La mezcla de reacción se agitó a 70°C durante ~1 hora. Se monitorizó la finalización de la reacción en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Después de completar la reacción, se dejó enfriar la mezcla a 25°C y se concentró al vacío. El material sólido resultante se trituró con metanol: éter dietílico (9:1) (3 x 50 ml) y se secó al vacío para proporcionar 2,2 g de sal de acetato de 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)hidrazina-carboximidamida (rendimiento: 84,8 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1,89 (s, 3H), 6,13 (s amplio, 4H); 7,24 (m, 1H); 7,33 (m, 2H) 8,17 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 215,1 [M+H]⁺.

Compuesto 9: 2-(2-cloro-4-metilbencilideno)hidrazinacarboximida

[0186] Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2-cloro-4-metilbenzaldehído (0,2 g) para proporcionar 255 mg del compuesto deseado (rendimiento: 93,8 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2,29 (s, 3H); 5,60 (s amplio, 2H); 6,00 (s amplio, 2H); 7,10 (d, 2H); 7,27 (s, 1H); 8,02 (d, 1H); 8,24 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 210,9 [M+H]⁺.

15 Compuesto 10: 2-(2-cloro-5-metilbencilideno)hidrazinacarboximida

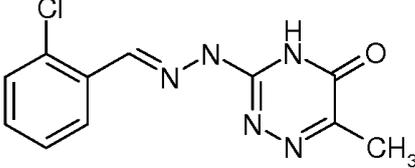
[0187] Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2-cloro-5-metilbenzaldehído (0,2 g) para proporcionar 156 mg del compuesto deseado (rendimiento: 57,4 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2,30 (s, 3H); 5,64 (s amplio, 2H); 6,06 (s amplio, 2H); 7,07 (d, 2H); 7,27 (d, 1H); 7,97 (s, 1H); 8,24 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 210,9 [M+H]⁺.

Compuesto 11: 2-(2-cloro-3-metilbencilideno)hidrazinacarboximida

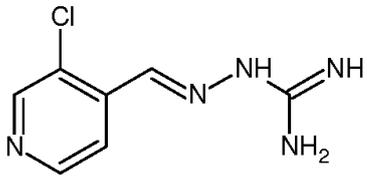
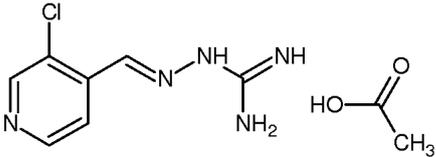
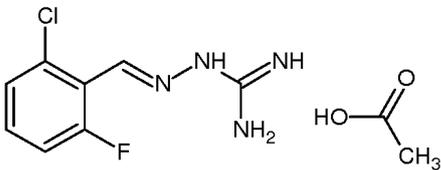
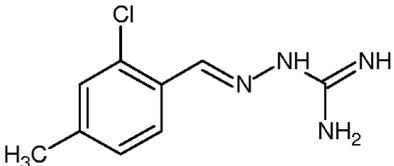
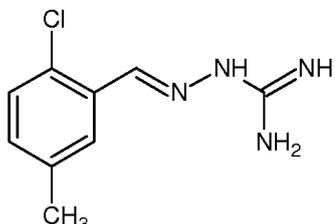
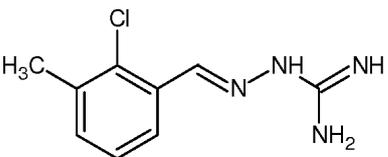
[0188] Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2-cloro-3-metilbenzaldehído (0,2 g) para proporcionar 226 mg del compuesto deseado (rendimiento: 83,1 %). ¹H-RMN (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2,17 (s, 3H); 5,64 (s amplio, 2H); 6,03 (s amplio, 2H); 7,18 (t, 2H); 7,24 (d, 1H); 7,99 (s, 1H); 8,37 (s, 1H); MS (ESI+): *m/z* = 210,9 [M+H]⁺.

[0189] Los compuestos seleccionados según la invención se exponen en la Tabla 1 a continuación:

Compuesto Número	Estructura	Nombre químico
Compuesto 1		2-(2-clorobencilideno)hidrazinacarboximidamida
Compuesto 2		Acetato de 2-(2-clorobencilideno)hidrazinacarboximidamida
Compuesto 3		2-(2-bromobencilideno)hidrazinacarboximidamida
Compuesto 4		2-(2-metoxibencilideno)hidrazinacarboximidamida

Compuesto 5		3-[[2-(2-clorobencilideno)amino]metil]-6-metil-1,2,4-triazin-5(4H)-ona
-------------	---	--

(continuación)

Compuesto Número	Estructura	Nombre químico
Compuesto 6		2-[(3-cloropiridina-4-il)metilideno] hidrazinacarboximidamida
Compuesto 7		Acetato de 2-[(3-cloropiridina-4-il)metilideno] hidrazinacarboximidamida
Compuesto 8		Acetato de 2- (2-cloro-6-fluorobencilideno)hidrazinacarboximidamida
Compuesto 9		2- (2-cloro-4-metilbencilideno)hidrazinacarboximidamidamida
Compuesto 10		2- (2-cloro-5-metilbencilideno)hidrazinacarboximidamidamida
Compuesto 11		2- (2-cloro-3-metilbencilideno)hidrazinacarboximidamidamida

[0190] En algunos de los experimentos a continuación, se puede usar la sal de los mismos compuestos.

5 1.2- Cultivo, construcciones y transfección de células de mamíferos

[0191] Las células HeLa se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) complementado con glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin (Lonza) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Biowest). Se cultivaron células 293T en medio Eagle modificado (DMEM) de Dubelcco 10 complementado con penicilina, estreptomycin, glutamina (Lonza) y un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Biowest).

[0192] Se cultivaron células Min6 en DMEM complementado con penicilina, estreptomycin, glutamina, piruvato de sodio, β -Mercaptoetanol 50 mM y suero bovino fetal al 15 % (FBS) (Biowest).

15 **[0193]** Se cultivaron células INS1 en RPMI complementado con penicilina, estreptomycin, glutamina, piruvato de sodio (Lonza), β -ME 50 mM y un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Biowest).

[0194] Cada línea celular se mantuvo a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5 %.

[0195] Las secuencias de marco de lectura abierto humano (ORF) para PLP1, DM20 e insulina se obtuvieron de Life Technologies (Invitrogen) (IOH41689, IOH5252 e IOH7334 respectivamente). La clonación de construcción en el plásmido de expresión pDEST26 (Invitrogen) se efectuó mediante Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen). Las mutaciones de ORF se llevaron a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio de relámpagos QuikChange (Stratagene) (mutación T181P para ORF de PLP1 y DM20, Akita (C96Y) para ORF de insulina).

[0196] La expresión génica en células de mamíferos se llevó a cabo mediante nucleofección, usando el Sistema Amaxa™ 4D-Nucleofector™ (Lonza) o mediante transfección usando Lipofectamina (Life technologies).

10 1.3- Citoprotección contra el estrés del RE

[0197] Este ensayo se describe en Tsaytler y col. (Science 2011).

[0198] Las células HeLa se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) complementado con glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomina que contiene suero bovino fetal al 10 % (FBS), a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 17.000 células/mL el día antes del tratamiento. Se provocó estrés del RE mediante la adición de 5 mg/mL de tunicamicina (Sigma-Aldrich) junto con los inhibidores de fosfatasa (0,5-10 mM). Los medios se cambiaron 6 h más tarde con medios frescos y la citoprotección se mantuvo mediante la adición de los inhibidores de fosfatasa (0,5-10 mM). La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción de WST-8 en formazan usando el kit de conteo celular -8 (Sigma) según la recomendación del proveedor, 48 h o 72 h después del tratamiento con tunicamicina.

[0199] La citoprotección contra el estrés del RE se mide en términos de efecto de potencia citoprotectora en comparación con el compuesto de referencia de guanabenz (Tsaytler y col. Science 2011) según el hecho de que el estrés del RE:

- '-' no tenga un efecto citoprotector;
- '+' tenga un menor efecto citoprotector en comparación con el guanabenz;
- '++' su efecto citoprotector sea similar en comparación con el guanabenz.

[0200] La Tabla 1 resume los resultados del efecto citoprotector de diferentes compuestos de la invención, en comparación con guanabenz, después del estrés inducido por una exposición de 6 horas de tunicamicina.

1.4- Evaluación de las tasas de traducción en células no estresadas

[0201] Las células HeLa (100.000 células/ml) se colocaron en placas de 6 pocillos 24 h antes de cada experimento y se dejaron sin tratar o se trataron con compuestos (50 mM) durante 2,5, 5 y 9 h. El medio de cultivo se reemplazó por medio DMEM libre de metionina (Invitrogen) 30 min antes de la adición de compuestos. Una hora antes de cada punto de tiempo, se añadieron 50mM de Click-iT® AHA (L-azidohomoalanina) (Invitrogen) al medio de cultivo para etiquetar proteínas recién sintetizadas. Al final de cada punto de tiempo, las células se lavaron con PBS helada y se cosecharon mediante disociación de tripsina (Lonza), a continuación, se lisaron en un amortiguador Tris-HCl 50 mM que contenía un 1 % de SDS (Sigma) e inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma). Las muestras de proteína se acoplaron a alquino biotina (Invitrogen) usando el Kit amortiguador de reacción de proteína Click-iT® (Invitrogen). Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 min, se diluyeron nuevamente en geles prefabricados ECL 4-20 % (GE Healthcare) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Se detectó biotina alquino acoplada a Click-iT® AHA incorporada a proteínas recién sintetizadas usando estreptavidina-HRP (Gentex). La revelación se efectuó mediante incubación de ECL Prime (GE Healthcare) y se leyó mediante quimioluminiscencia usando Fusion Solo 3S (Vilber Lourmat).

50 1.5- Evaluación de las tasas de traducción en células estresadas

[0202] Se efectuaron tratamientos para medir la traducción en células no estresadas, excepto que se añadió tunicamicina (5 mg/ml) junto con los compuestos.

55 1.6- Ensayo GPCR funcional para el receptor $\alpha 2A$ adrenérgico (procedimiento de detección CellKey)

[0203] La actividad agonista de los compuestos se evaluó en células CHO que expresan endógenamente el receptor alfa 2 A humano y se determinó midiendo sus efectos sobre la modulación de impedancia usando el procedimiento de detección CellKey.

[0204] Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 6×10^4 células/pocillo en un amortiguador HBSS (Invitrogen) + HEPES 20 mM (Invitrogen) con BSA al 0,1 % y se dejaron equilibrar durante 60 min a 28°C antes del inicio del experimento. Las placas se colocaron en el sistema y se efectuaron mediciones a una temperatura de 28°C. Las soluciones se agregaron simultáneamente a los 96 pocillos usando un sistema fluido integrado: HBSS (control basal), agonista de referencia a 100 nM (control estimulado), agonista de referencia

(determinación EC₅₀) o los compuestos de prueba. Las mediciones de impedancia se monitorizan durante 10 minutos después de la adición del ligando. El agonista de referencia estándar es la epinefrina, que se prueba en cada experimento a varias concentraciones para generar una curva concentración-respuesta a partir de la cual se calcula su valor EC₅₀.

5

[0205] Los datos de respuesta a la dosis de los compuestos de prueba se analizaron con el software Hill usando el análisis de regresión no lineal de las curvas de respuesta a la concentración generadas con valores de replicación promedio usando el ajuste de curva de la ecuación de Hill. Los resultados se presentan en la tabla 1, se considera que los compuestos con EC₅₀ > 33,3 mM no tienen actividad adrenérgica alfa 2 significativa.

10

1.7- Modelo de la enfermedad de esclerosis múltiple *in vitro*: oligodendrocitos de rata lesionados por interferón gamma cultivados conjuntamente con neuronas

Cultivo de oligodendrocito cultivados conjuntamente con neuronas

15

[0206] Las neuronas / OPC se cultivaron según lo describieron anteriormente Yang y col. (2005 J Neurosci Methods;149(1) páginas 50-6) con modificaciones. Brevemente, se extrajo el cerebro completo (sin cerebelo) obtenido de embriones de rata de 17 días de edad (laboratorios Wistar, Janvier). Los cerebros completos se trataron durante 20 min a 37°C con una solución de tripsina-EDTA (Pan Biotech) en una concentración final de tripsina al 0,05 % y EDTA al 0,02 %. La disociación se detuvo mediante la adición del medio Eagle modificado (DMEM) de Dulbecco con 4,5 g/litro de glucosa (Pan Biotech), que contenía DNASE I grado II (concentración final de 0,5 mg/ml; Pan Biotech, Lote: h140508) y suero fetal bovino al 10 % (FCS; Invitrogen, Lote: 41Q7218K). Las células se disociaron mecánicamente mediante tres pasajes forzados a través de la punta de una pipeta de 10 ml. A continuación, las células se centrifugaron a 515 g durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en un medio de cultivo definido que consiste en medio Neurobasal (Invitrogen, Lote: 1636133) con una solución al 2 % de complemento B27 (Invitrogen, Lote: 1660670), 2 mmol/litro de L-glutamina (Pan Biotech), 2 % de solución PS y, 1 % de FCS y 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AA, Lote: H131205). Las células se sembraron a una densidad de 20 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos precocinadas con PLL (maíz BD, Lote: 6614022) y laminina (Sigma, Lote: 083M4034V). Las placas se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada, en una atmósfera de aire (95 %)-CO₂ (5 %). La mitad del medio se cambió cada 2 días con medio fresco. Los días 18, los compuestos de prueba se incubaron previamente 1 hora antes de la aplicación de interferón gamma (70 U/ml, 48 h, R&D System, Lote: AAL2214081).

Compuestos de prueba y exposición al interferón gamma

35

[0207] El día 18 del cultivo, los compuestos de prueba (4 concentraciones) se resolvieron en medio de cultivo y, a continuación, se incubaron previamente con oligodendrocito cultivado conjuntamente con neuronas durante 1 hora, antes de la aplicación de interferón gamma (70 U/ml, 48 h). Una hora después de la incubación de los compuestos de prueba, se añadió interferón gamma en una concentración de 70 U/ml durante 48 h, incluso en presencia de los compuestos de prueba. A continuación, las células se fijaron mediante una solución fría de etanol (95 %, Sigma, Lote: SZBD3080V) y ácido acético (5 %, Sigma, Lote: SZBD1760V) durante 5 min a -20°C. Después de la permeabilización con 0,1 % de saponina (Sigma, Lote: BCBJ8417V), las células se incubaron durante 2 h con un anticuerpo anti-O4 monoclonal producido en el ratón (Sigma, lote: SLBF5997V) a una dilución de 1/1000 en PBS (SARTÉN, Lote: 8410813) que contenía un 1 % de FCS y un 0,1 % de saponina, durante 2 h a temperatura ambiente. Este anticuerpo se revela con Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón de cabra (Invitrogen, lote: 1664729) a la dilución 1/400 en PBS que contiene un 1 % FCS y un 0,1 % de saponina, durante 1 h a temperatura ambiente.

Análisis del número total de células O4

[0208] Para cada condición, se tomaron 30 imágenes por pocillo usando ImageXpress (dispositivo molecular) con un aumento de 20x. Todas las imágenes se tomaron en las mismas condiciones. El análisis del número total de células O4 se efectuó automáticamente mediante el uso del editor de módulo personalizado (dispositivo molecular). Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin interferón gamma = 100 %) para expresar la lesión por interferón gamma. Todos los valores se expresaron como media +/- SEM (media de desviación estándar) (n = 6 pocillos por condición).

55

1.8- Modelo de la enfermedad de Parkinson *in vitro*: Neuronas de rata mesencefálicas primarias lesionadas con rotenona *Cultivo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas*

[0209] Las neuronas dopaminérgicas de rata se cultivaron como lo describieron Schinelli y col., (1988 J. Neurochem 50, páginas 1900-07) y Visanji y col., (2008 FASEB J. 22(7), páginas 2488-97). Brevemente, el mesencéfalo obtenido de embriones de ratas de 15 días de edad (Janvier Labs, Francia) se disecó bajo un microscopio. Los mesencéfalos embrionarios se eliminaron y se colocaron en un medio helado de Leibovitz (L15, Pan Biotech, Lote: 9310614) que contenía un 2 % de penicilina-estreptomina (PS, Pan Biotech, Lote: 1451013) y un 1 % de albúmina de suero bovino (BSA, Pan Biotech, Lote: h140603). La porción ventral del ángulo mesencefálico, una

65

región del cerebro en desarrollo rica en neuronas dopaminérgicas, se usó para las preparaciones celulares.

[0210] El mesencéfalo se disoció mediante tripsinización durante 20 min a 37°C (tripsina 0,05 %, EDTA 0,02 %, PanBiotech,

5

Lote: 5890314). La reacción se detuvo mediante la adición del medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, PanBiotech, Lote: 1300714) que contenía DNAase I grado II (0,1 mg/ml, PanBiotech, Lote: H140508) y el 10 % de suero fetal bovino (FCS, Gibco, Lote: 41Q7218K). Las células se disociaron mecánicamente mediante 3 pasajes a través de una pipeta de 10 ml. A continuación, las células se centrifugaron a 180 x g durante 10 min a +4°C en una
10 capa de BSA (3,5 %) en el medio L15. Se desechó el sobrenadante y se volvieron a suspender las pastillas celulares en un medio de cultivo definido que consiste en Neurobasal (Invitrogen, Lote: 1636133) complementado con B27 (2 %, Invitrogen, Lote: 1660670), L-glutamina (2 mM, PanBiotech, Lote: 8150713) y 2 % de solución PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, PanBiotech, Lote: H140108) y 1 ng/ml de factor neurotrófico derivado de glial (GDNF, Pan Biotech, Lote: H130917). Las células viables se contaron en un citómetro Neubauer usando la prueba
15 de exclusión de azul tripano. Las células se sembraron a una densidad de 40 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con poli-L-lisina (Corning Biocoat, Lote: 6614022) y se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C en una atmósfera de aire al 5 % de CO₂/95 %. La mitad del medio se cambió cada 2 días con medio fresco.

20 **[0211]** El día 6 del cultivo, se eliminó el medio y se agregó medio fresco, sin o con rotenona (Sigma, Lote: 021M2227V) a 10 nM diluido en medio de control, se evaluaron 3 pocillos por condición. Los compuestos de prueba se volvieron a diluir en un medio de cultivo y, a continuación, se preincubaron con neuronas mesencefálicas durante 1 hora, antes de la aplicación de rotenona.

25 **[0212]** Después de 24 horas de intoxicación, las células se fijaron mediante una solución de paraformaldehído al 4 % (Sigma, lote SLBF7274V) en PBS (Pan Biotech, Lote: 4831114), pH = 7,3 durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron nuevamente dos veces en PBS, y, a continuación, se permeabilizaron y se bloquearon sitios no específicos con una solución de PBS que contenía un 0,1 % de saponina (Sigma, lote: BCBJ8417V) y un 1 % de FCS durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con
30 anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa producido en ratón (TH, Sigma, lote: 101M4796) a una dilución de 1/10 000 en PBS que contenía un 1 % de FCS, 0,1 % de saponina, durante 2 h a temperatura ambiente. Este anticuerpo se reveló con Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón de cabra (sondas moleculares, lote: 1531668) en la dilución 1/800 en PBS que contenía un 1 % FCS y un 0,1 % saponina, durante 1 h a temperatura ambiente.

35 **Análisis del número total de neuronas TH positivas**

[0213] Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (dispositivo molecular, EE.UU.). Para cada condición, se analizaron 20 campos automáticamente por pocillo (que representan ~80 % de la superficie total del pocillo) de 3 pocillos. El número total de neuronas TH se analizó automáticamente mediante el
40 editor de módulos personalizados (Molecular Devices, EE.UU.). Los datos se expresaron en un porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin rotenona = 100 %) para expresar la lesión por rotenona. Todos los valores se expresaron como media +/- SEM (media de desviación estándar) del 1 cultivo (n = 3 pocillos por condición por cultivo).

45 **1.9- Modelo de enfermedad de Alzheimer *in vitro*: neuronas de rata corticales primarias lesionadas con amiloide-beta 1-42.**

Cultivo de neuronas corticales de rata

50 **[0214]** Las neuronas corticales de rata se cultivaron como lo describieron Singer y col., (1999 J. Neuroscience 19, páginas 2455-63) y Callizot y col., (2013 J. Neurosci. Res. 91, páginas 706-16).

[0215] Las hembras preñadas (Wistar; Janvier Labs) a los 15 días de gestación fueron sacrificadas mediante luxación cervical. Se recogieron los fetos y se colocaron inmediatamente en un medio Leibovitz L15 helado (Pan
55 Biotech, Lote: 9310614) con una solución de penicilina al 2 % (10.000 U/ml) y estreptomycin (10 mg/ml) (PS; Pan Biotech, Lote: 1451013) y albúmina de suero bovino al 1 % (BSA; Pan Biotech, Lote: h140603). La corteza se trató durante 20 min a 37°C con una solución de tripsina-EDTA (Pan Biotech, Lote: 5890314) en una concentración final de tripsina al 0,05 % y EDTA al 0,02 %. La disociación se detuvo mediante la adición del medio Eagle modificado (DMEM) de Dulbecco con 4,5 g/litro de glucosa (Pan Biotech, lote: 1300714), que contenía DNASE I grado II (concentración
60 final 0,5 mg/ml; Pan Biotech, Lote: h140508) y suero fetal bovino al 10 % (FCS; Invitrogen, Lote: 41Q7218K). Las células se disociaron mecánicamente mediante tres pasajes forzados a través de la punta de una pipeta de 10 ml. A continuación, las células se centrifugaron a 515 g durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en un medio de cultivo definido que consiste en medio neurobasal (Invitrogen, Lote: 1636133) con una solución al 2 % de suplemento B27 (Invitrogen, Lote: 1660670), 2 mmol/litro de L-glutamina (Pan Biotech, Lote:
65 8150713), 2 % de solución PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Pan Biotech, Lote:

H140108). Las células viables se contaron en un citómetro Neubauer, usando la prueba de exclusión de azul tripano. Las células se sembraron a una densidad de 30.000 por pocillo en placas de 96 pocillos precocinadas con poli-L-lisina (Corning Biocoat, Lote: 6614022) y se cultivaron a 37°C en una incubadora de aire (95 %)-CO₂ (5 %). El medio se cambió cada 2 días. Las neuronas corticales se intoxicaron con soluciones de A-beta (ver más adelante) después de 5 11 días de cultivo.

Compuestos de prueba y exposición a amiloide-beta 1-42

[0216] La preparación de amiloide-beta 1-42 se efectuó siguiendo el procedimiento descrito por Callizot y col., 2013. Brevemente, se disolvió el péptido amilpide-beta 1-42 (Bachem, Lote: 1014012) en el medio de cultivo definido que se mencionó antes, desprovisto de suero, en una concentración inicial de 40 mmol/litro. Esta solución se agitó durante 3 días a 37°C en la oscuridad y se usó inmediatamente después de diluirse adecuadamente en el medio de cultivo en las concentraciones usadas.

[0217] Los compuestos de prueba se diluyeron en un medio de cultivo y, a continuación, se preincubaron con neuronas corticales primarias durante 1 hora, antes de la aplicación de amiloide beta 1-42. Se agregó la preparación de amiloide beta 1-42 en una concentración final de 20 mM (que incluye ~2 mM de oligómeros tóxicos medidos por WB) diluidos en medio de control en presencia de fármacos. Después de 24 horas de intoxicación, las células se fijaron mediante una solución fría de etanol (95 %, Sigma, Lote: SZBD3080V) y ácido acético (5 %, Sigma, Lote: SZBD1760V) durante 5 min a -20°C. Después de la permeabilización con 0,1 % de saponina (Sigma, Lote: BCBJ8417V), las células se incubaron durante 2 h con anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP- 2; Sigma, Lote: 063M4802) a una dilución de 1/400 en PBS (Pan biotech, Lote: 4831114) que contiene un 1 % de suero fetal bovino (Invitrogen, Lote: 41Q7218K) y un 0,1 % de saponina. Este anticuerpo se reveló con Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón de cabra (sonda molecular, Lote: 1572559) a la dilución de 1/400 en PBS que contenía un 1 % de suero fetal bovino y un 0,1 % de saponina, durante 1 h a temperatura ambiente.

Análisis del número total de neuronas

[0218] Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (dispositivo molecular de los EE.UU.) a una magnificación x20. Para cada condición, se analizaron 30 campos automáticamente por pocillo (que representan ~80 % de la superficie total del pocillo) de 3 pocillos. El número total de neuronas se analizó automáticamente mediante el editor de módulos personalizados (Molecular Devices, EE.UU.). Los datos se expresaron en porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin amiloide beta 1-42 = 100 %) para expresar la lesión A-beta 1-42. Todos los valores se expresaron como media +/- SEM (media de desviación estándar) (n = 3 pocillos por 35 condición por cultivo).

1.10- Modelo de ratón *in vivo* de esclerosis lateral amiotrófica (ELA): ratones transgénicos SOD1-G93A

[0219] Para los experimentos, se usaron ratones transgénicos que expresaban ratones transgénicos (TG) SOD1-G93A humanos mutados (TgN-SOD1-G93A-1Gur heterocigotos; Gurney y col. (1994) Science 264, 1772-1775) y 5 camadas salvajes se usaron para los experimentos. Los ratones SOD1 G93A fueron criados por Charles River, Alemania, mediante el apareamiento de machos TG hemicigotos (cepa 002726M; B6SJL TG SOD1 x G93A 1GUR/J, JAX) con hembras de tipo salvaje (cepa 10012, JAX) obtenidas de JAX Laboratories, EE.UU. Los animales se agruparon de la siguiente manera (las hembras y los machos se distribuyeron por igual a los grupos de tratamiento, 45 es decir, cada grupo de tratamiento se esforzó por tener el mismo número de machos y hembras):
Los ratones transgénicos G93A SOD1

- 12 ratones transgénicos G93A SOD1 tratados con vehículo QD (es decir, una vez al día) a través de una sonda oral que comienza a los 60 días de edad y continúa hasta el punto final
- 50 ○ 12 ratones transgénicos G93A SOD1 tratados con el Compuesto 2 (1,5 mg/kg) BID (es decir, dos veces al día) mediante una sonda oral que comienza a los 60 días de edad y continúa hasta el punto final.
- 12 ratones transgénicos G93A SOD1 tratados con el Compuesto 2 (3 mg/kg) QD mediante una sonda oral que comienza a los 60 días de edad y continúa hasta el punto final.
- 12 ratones transgénicos G93A SOD1 tratados con el Compuesto 2 (3 mg/kg) QD en combinación con riluzol (20 55 mg/kg) mediante una sonda oral que comienza a los 60 días de edad y continúa hasta el punto final.
- 12 ratones transgénicos G93A SOD1 tratados con el Compuesto 2 (10 mg/kg) QD mediante una sonda oral que comienza a los 60 días de edad y continúa hasta el punto final.

Pruebas de comportamiento

[0220] La prueba de Rotarod se efectuó antes de iniciar la dosificación (valor basal, día 60) y alrededor del día 75, 90, 105 y 120. Los ratones nacidos dentro de 2-4 días se agrupan para pruebas de rotación de varillas. Una sesión de un día incluye un ensayo de entrenamiento de 5 min a 4 RPM en el aparato giratorio (AccuScan Instruments, Columbus, EE.UU.). 30 min más tarde, los animales se prueban durante 3 ensayos de aceleración consecutivos de 6

min con la velocidad cambiando de 0 a 40 RPM durante 360 segundos y un intervalo entre ensayos de al menos 30 min. Se registra la latencia en caer de la varilla. Los ratones que permanecen en la varilla durante más de 360 segundos se eliminan y su tiempo se califica como 360 segundos.

5 **1.11- Modelo *in vivo* de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth 1A: rata transgénica con sobreexpresión de PMP-22**

10 **[0221]** Las ratas transgénicas con CMT1A se obtuvieron del apareamiento de ratas macho PMP-22 (Laboratorio de Pr Nave, Max-Planck Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, Alemania) y ratas hembra Sprague-Dawley (Elevage Janvier, Francia). Los animales fueron alojados y mantenidos en Key-Obs (Orleans, Francia). Los procedimientos con animales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de la Directiva de la UE del 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE).

15 **[0222]** Los animales se agruparon de la siguiente manera (solo se incluyeron animales machos en los experimentos):

- 8 ratas transgénicas tratadas con vehículo QD a través de sonda oral a partir de la semana 5 de edad y continuando hasta el punto final.
- 8 ratas transgénicas tratadas con el Compuesto 2 (1 mg/kg) QD a través de sonda oral a partir de la semana 5 de edad y continuando hasta el punto final.
- 8 ratas transgénicas tratadas con el Compuesto 2 (3 mg/kg) QD a través de sonda oral a partir de la semana 5 de edad y continuando hasta el punto final.

Pruebas de comportamiento

25 **[0223]** Los animales se probaron de una manera aleatoria y ciega para el tratamiento y las mediciones de resultados. Los examinadores ciegos para el tratamiento efectuaron y validaron experimentos conductuales y lecturas de barras en las instalaciones de Key-Obs. Se efectuó una prueba de barras en ratas con CMT1A después de 3 semanas y 5 semanas de tratamiento. La prueba de barras evaluó la fuerza muscular de las cuatro patas y las prestaciones de equilibrio en una varilla fija. La rata se colocó sobre sus cuatro patas en el medio de la varilla de madera (diámetro: 2,5 cm; longitud: 50 cm). Se registró el tiempo pasado en la barra (latencia de caída) en cada ensayo y el número de caídas. Se efectuaron cinco ensayos sucesivos (60 s máx).

35 **1.12- Modelo *in vitro* de leucodistrofia (EPM): Sobreexpresión de PLP1 y DM20 mutados en la línea celular humana**

40 **[0224]** Un día antes de la transfección, las células 293T se colocaron en placas a 300.000 células/mL. Los linfocitos 293T se transfectaron con construcciones mutantes PLP1 y DM20 usando Lipofectamina 2000 según el procedimiento del fabricante. Después de la transfección, las células se trataron con moléculas o se dejaron sin tratar. Como control, las células se transfectaron con formas nativas de las proteínas. 48 horas más tarde, se cosecharon lisados celulares. La acumulación de proteínas se evaluó mediante transferencia occidental.

1.13 - Modelo *in vitro* de diabetes tipo 2: líneas celulares Min6 e INS1

45 ***Citoprotección contra el estrés del RE***

[0225] Las células se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 0,5, 10⁶ células/mL para la línea celular Min6, 0,4, 10⁶ células/mL para la línea celular INS1 el día antes del tratamiento.

50 **[0226]** Se provocó estrés del RE mediante la adición de 2,5 mg/mL de tunicamicina (Sigma Aldrich) junto con inhibidores de fosfatasa.

[0227] Los medios se cambiaron 6 h más tarde con medios frescos y la citoprotección se mantuvo mediante la adición de inhibidores de fosfatasa.

55 **[0228]** La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción de WST-8 en formazan usando el kit de conteo celular 8 (Sigma) según la recomendación del proveedor, 72 h después del tratamiento con tunicamicina.

Protección contra la acumulación de insulina^{Akita} propensa a pliegues erróneos

60 **[0229]** Las células Min6 se nucleofectaron con construcciones mutantes de Insulina^{Akita} y se sembraron en placas de 96 pocillos a 300.000 células/mL y, 24 horas más tarde, las células se trataron con moléculas o se dejaron sin tratar. Como control, las células se nucleofectaron con plásmido no relevante. 6 días después, se añadió un agente selectivo (G418).

65

[0230] La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción de WST-8 en formazan usando el kit de conteo celular -8 (Sigma) según la recomendación del proveedor, 9 días después del tratamiento.

1.14- Modelo de enfermedad inflamatoria/infecciosa *in vitro*: fibroblastos embrionarios de ratón inducidos por Poli I:C **Protocolos experimentales**

[0231] Los fibroblastos embrionarios de ratón (FER) se lipofectaron con poli I:C y se trataron con dos concentraciones de compuestos de la invención (25 mM) durante 6 h. Después de 6 h de cultivo, la expresión de fosforilación de eIF2alfa (eIF2a-P) y PPP1R15A (GADD34) se monitorizó mediante transferencia Western, mientras que la producción de interferón tipo I (IFN)-beta se cuantificó en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Control (nt) y poli I:C/DMSO son respectivamente controles negativos y positivos.

[0232] El poli I:C (ácido poliinosínico:policidilo o sal sódica de ácido poliinosínico-policidilo) es un inmunoestimulante que se usa para simular infecciones virales. Se sabe que el poli I:C, que es estructuralmente similar al ARN de cadena doble, interactúa con el receptor de tipo peaje 3 que se expresa en los compartimientos intracelulares de células B y células dendríticas.

[0233] Se utilizó guanabenz (25 mM) como compuesto inhibidor de referencia.

20 **Cultivo celular**

[0234] Se cultivaron FER en DMEM, FCS al 10 % (HyClone, Perbio), 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 2 mM de glutamina, 1 x MEM de aminoácidos no esenciales y 50 mM de 2-mercaptoetanol. Los FER se trataron durante el tiempo indicado con 10 mg/ml de poli I:C (InvivoGen) en combinación con lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Inmunotransferencia

[0235] Las células se lisaron en Triton X-100 al 1 %, Hepes 50 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10 %, complementado con minicomprimidos de cóctel inhibidor de proteasa completa (Roche). La cuantificación de proteínas se efectuó usando el ensayo de proteína BCA (Pierce). De 25 a 50 mg de material soluble en Triton X-100 se cargó en gradiente del 2 al 12 u 8 % de SDS-PAGE antes de la inmunotransferencia y la detección de quimioluminiscencia (Sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico, Pierce). Los anticuerpos policlonales de conejo que reconocen GADD34 (C-19) eran de Santa Cruz Biotechnology y anti-eIF2alfa[pS⁵²] eran de Invitrogen.

Elisa

[0236] La cuantificación de IFN-beta en sobrenadante de cultivo se efectuó usando el kit ELISA de interferón beta de ratón (fuente de interferón PBL) según las instrucciones del fabricante.

1.15- Síntomas de ciliopatías retinianas/retinitis pigmentosa *in vivo*: ratones inactivados BBS12

Generación de ratones inactivados y cría de animales

[0237] Los ratones *Bbs12*^{-/-}/J se mantuvieron en un fondo genético C57BL/6 (Mockel y col., 2012 J. Biol. Chem. 287, páginas 37483-494). Los ratones se mantuvieron y se criaron en habitaciones con control de humedad y temperatura en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con libre acceso a comida y agua normales. Los ratones inactivados totales *Bbs12*^{-/-} se identificaron mediante genotipificación a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el kit de genotipificación de ratón KAPA (No. de catálogo KK7302, Kapa Biosystems, Woburn, Massachusetts, EE.UU.).

Reactivos para la inyección intravítrea

[0238] La solución usada para la inyección intravítrea se preparó en condiciones estériles. 1,25 mM de las soluciones madre del compuesto 2 y 100 mM de ácido valproico (VPA) se diluyeron en PBS, pH 6 para obtener las soluciones de compuesto 2 (2,5 mM) + VPA (0,2 mM) y el compuesto 2 (2,5 mM). Se obtuvo ácido valproico (Catálogo # 4543, Sigma-Aldrich).

Inyección intravítrea

[0239] Se publicaron fenotipos y mecanismos retinianos de ratones *Bbs12*^{-/-} (Mockel y col., 2012). En el día postnatal se inyectaron 14-16 ratones por vía intravítrea. La operación se efectuó bajo microscopio quirúrgico. Los ratones se anestesiaron con isoflurano. Las pupilas de ratones se dilataron con gotas oftálmicas de atropina al 0,3 % (Alcon). Se insertó una aguja de calibre 33 conectada a un dispensador repetidor (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza) en la cavidad vítrea desde el limbo. La ubicación de la aguja se controló a través del microscopio. Se inyectó

1ml de solución de tratamiento en el ojo izquierdo de ratones y se administró 1 ml de PBS, pH 6, en el ojo derecho como control. Los ratones con hemorragia vítrea o daño retiniano fueron excluidos del análisis.

Electrorretinogramas

5

[0240] Los electroretinogramas (ERG) se efectuaron dos semanas después de la inyección intravítrea usando el sistema HMsERG (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, EE.UU.). Los ratones se adaptaron a la oscuridad durante la noche y, a continuación, se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de domitor (7,6mg/g peso corporal) y ketamina (760 mg/g peso corporal). Las pupilas se dilataron como se describió anteriormente. Los experimentos se llevaron a cabo en luz roja tenue (catálogo # R1251RR, Philips, Suresnes, Francia). El procedimiento estándar de ERG se usó según el protocolo del fabricante (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, EE.UU.). Brevemente, el protocolo consistió en registrar un ERG adaptado a la oscuridad (ERG escotópico) después de estímulos fotónicos con intensidades que varían de 0,1 a 25 cd.s/m². Los resultados de ERG fueron amplificados y capturados digitalmente por el sistema ERG View 4.3 (Xenotec, Ocuscience®, Kansas City, Missouri, EE.UU.). A continuación, se midieron la onda A y la onda B de las respuestas escotópicas.

Microscopía electrónica de transmisión

[0241] Las muestras se fijaron por inmersión en 2,5 % de glutaraldehído y 2,5 % de paraformaldehído en amortiguador de cacodilato (0,1 M, pH 7,4), y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1 % en amortiguador de cacodilato 0,1 M durante 1 hora a 4°C y se deshidrataron a través de alcohol graduado (50, 70, 90, 100 %) y óxido de propileno durante 30 minutos cada uno. Las muestras se incrustaron en Epon™ 812 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, EE.UU.). Se cortaron secciones semifinas a 2 μm con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron histológicamente mediante microscopía ligera. Se cortaron secciones ultrafinas a 70 nm, las cuales se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron a 70 kv con un microscopio electrónico Morgagni 268D. Las imágenes fueron capturadas digitalmente por la cámara Mega View III (Soft Imaging System).

1.16- Apoptosis inducida por hipoxia en cardiomiocitos de rata neonatal cultivados

30

Cultivo celular

[0242] Los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales de rata se obtuvieron de los ventrículos de ratas Sprague Dawley de 1 día de edad (Janvier, Francia). Las ratas fueron sacrificadas y sus corazones extirpados. Corazones cortados en trozos pequeños (1-2 mm³) y digeridos enzimáticamente usando la rata Neonatal Heart Dissociation Kit y el gentleMACS™ Dissociator (MiltenyiBiotec, Alemania). Después de la disociación, los homogeneizados se filtraron (70 μm) para obtener una suspensión monocelular. Las células aisladas se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio de águila modificada de Dulbecco (DMEM) que contenía un 10 % de suero equino (HS), un 5 % de suero fetal bovino (FBS) y un 1 % de penicilina/estreptomina. Los cultivos se enriquecieron con miocitos mediante precolocación durante 90 min para agotar la población de no miocitos. Las células no unidas se colocaron en placas de 6 o 96 pocillos a una densidad celular adecuada. Las células se cultivaron a 37°C en aire al 95 %/CO₂ al 5 % durante 24 h. A continuación, el medio de cultivo se intercambió con DMEM fresco que contenía FBS al 1 % y diferentes concentraciones del compuesto de prueba treinta minutos antes de la incubación en una cámara de cultivo normal o hipóxica (N₂/CO₂, 95 %/5 %; 0,3 % O₂).

45

Tratamiento con el compuesto de prueba

[0243] Se sembraron cardiomiocitos de rata neonatal purificados en una placa de 96 pocillos a 10⁶ células / 2 mL para experimentos de citometría de flujo.

50

[0244] Después de 24 horas, los cardiomiocitos se trataron con diferentes concentraciones de compuesto de prueba en medio de cultivo con DMSO al 0,1 %. Las células de control positivo se trataron con medio de cultivo (DMSO al 0,1 %). Treinta minutos después de comenzar los tratamientos, las células se incubaron en la cámara de cultivo hipóxico (N₂/CO₂, 95 %/5 %; final medido O₂: 0,3 %) durante 36 horas.

55

[0245] Las células de control negativo se dejaron en condiciones normóxicas a 37°C con medio de cultivo (FBS al 1 %, DMSO al 0,1 %) durante los mismos períodos de tiempo.

Medición de células apoptóticas (procedimiento)

60

[0246] Al final del periodo de tratamiento, se efectuó una citometría de flujo para medir la cantidad de células apoptóticas. Se utilizó el kit de detección de apoptosis de isotiocianato de anexina V-fluoresceína (FITC) de Miltenyi. Las células se lavaron dos veces con PBS y se volvieron a suspender en amortiguador de unión. La FITC-anexina V y el yoduro de propidio se añadieron según el protocolo del fabricante. La mezcla se incubó durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente, y, a continuación, se midió la fluorescencia celular mediante citometría de flujo de

65

barrido FACS.

2- RESULTADOS

5 **2.1 - Citoprotección y selectividad de compuestos**

[0247] Los resultados de los diferentes ensayos efectuados con compuestos seleccionados de la invención se muestran a continuación, en la Tabla 1.

10 [0248] Como ejemplo, la Figura 1 representa el efecto citoprotector del compuesto 1 después del estrés inducido por una exposición de tunicamicina.

Tabla 1:

Compuesto No.	Citoprotección contra el estrés del RE en comparación con el guanabenz	Inhibición de la traducción en células no estresadas	Recuperación de la traducción después del tratamiento con Tunicamicina	Prueba del receptor alfa 2 adrenérgico funcional (procedimiento)
1	++	sin efecto	se prolonga	EC50 > 33,3 µM
2	++	sin efecto	se prolonga	EC50 > 33,3 µM
3	++	sin efecto		
4	+			
5	+			
6	+	sin efecto		
7	++	sin efecto		EC50 > 33,3 µM
8	++	sin efecto		
9	-			
10	+			
11	+			

15

2.2 - Esclerosis múltiple

[0249] La Figura 2 muestra la protección dependiente de la dosis de oligodendrocitos de rata lesionados por interferón gamma mediante el compuesto 1 de la invención.

20

[0250] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención prometen un tratamiento efectivo de la esclerosis múltiple.

2.3 - Enfermedad de Parkinson (EP)

25

[0251] La Figura 3 muestra la protección dependiente de la dosis de las neuronas de rata mesencefálicas primarias lesionadas con rotenona mediante el compuesto 2 de la invención.

30

[0252] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención prometen un tratamiento efectivo de las sinucleopatías, y más específicamente de la enfermedad de Parkinson.

2.4 - Enfermedad de Alzheimer (EA) y amiloidosis

35

[0253] La Figura 4 muestra la protección dependiente de la dosis de neuronas de rata cortical primaria lesionadas de amiloide beta 1-42 mediante el compuesto 2 de la invención.

[0254] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención prometen un tratamiento efectivo de la amiloidosis y más específicamente de la enfermedad de Alzheimer.

40 **2.5 - Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)**

[0255] La Figura 5 representa los resultados de la prueba de rotación en el día 90 de ratones transgénicos

SOD1 G93A con el compuesto 2 de la invención.

[0256] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención, específicamente los compuestos 1 y 2, rescatan el déficit motor de ratones transgénicos y prometen un tratamiento efectivo de la ELA.

5

2.6- Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT-1A)

[0257] La Figura 6 representa los resultados de la prueba de barras en las semanas 3 y 5 de la sobreexpresión transgénica de la rata PMP22 tratada con el compuesto 2 de la invención.

10

[0258] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención, específicamente los compuestos 1 y 2, rescatan el déficit motor de ratas transgénicas que sobreexpresan PMP22 y prometen un tratamiento efectivo de trastornos desmielinizantes como CMT, más específicamente la CMT1A y la CMT1B.

15 2.7- Leucodistrofia: la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (EPM),

[0259] Se ha descrito que las mutaciones T181P y L223P en las proteínas PLP1 y DM20 provocan un fenotipo grave de la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (Strautnieks y col. 1992, Am. J. Hum. Genet. 51 (4) 871-878; Gow y Lazzarini, 1996 Nat Genet. 13(4):422-8).

20

[0260] El Compuesto 1 de la invención (5 microM) es capaz de evitar la acumulación de la proteína DM20 mutada T181P expresada en linfocitos 293T humanos (Figura 7).

[0261] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención, específicamente los compuestos 1 y 2, son un tratamiento efectivo prometedor de trastornos desmielinizantes como leucodistrofias, más específicamente la EPM.

25

2.8- Diabetes tipo 2

30 [0262] La Figura 8 representa los resultados de sobreexpresión de la mutación Akita que porta pre-pro-insulina en células Min6 con el compuesto 6 de la invención.

[0263] El Compuesto 1 y el Compuesto 6, en diferentes concentraciones, previenen la muerte celular de insulinoma Min6, la cual se asocia a la acumulación de proteína mal plegada inducida por la exposición de 6 horas a tunicamicina (Figura 9).

35

[0264] El Compuesto 1 y el Compuesto 6, en diferentes concentraciones, previenen la muerte celular de insulinoma INS1, la cual se asocia a la acumulación de proteína mal plegada inducida por la exposición de 6 horas a tunicamicina. (Figura 10).

40

[0265] Estos datos muestran que los compuestos de la invención prometen un tratamiento efectivo de la prediabetes y la diabetes, preferentemente la prediabetes tipo 2 y la diabetes tipo 2.

2.9- Ciliopatías retinianas/síndrome de Bardet Biedl

45

[0266] El compuesto 2 es capaz de proteger los fotorreceptores contra la apoptosis y conserva la detección de luz (Figura 11) y disminuir la carga proteica en el retículo endoplasmático (Figura 12) en ratones BBS12^{-/-}. Estos resultados muestran una mayor respuesta de ERG cuando se trata con la combinación del Compuesto 2 y ácido valproico (VPA) o con el compuesto 2 solo en los ratones Bbs12^{-/-} (Figura 11). La Figura 12 muestra una imagen de microscopía electrónica transmitida representativa del RE de los fotorreceptores de ratón BBS12^{-/-} en respuesta al tratamiento o genotipo administrado e indicado. La dilatación se observa cuando solo se inyecta PBS (izquierda), mientras que el Compuesto 2 (2,5 microM), en combinación con VPA (ácido valproico) (0,2 mM), es capaz de disminuir esta dilatación después de una única inyección intravítrea.

50

55 [0267] Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención en asociación a un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BIP, tal como ácido valproico, prometen un tratamiento efectivo de las ciliopatías retinianas, tales como el síndrome de Bardet-Biedl y la retinitis pigmentosa.

[0268] Aunque no se analizó, se planteó la hipótesis de que este tratamiento también podría ayudar a reducir otras formas de estrés celular, como el estrés fotónico.

60

2.10- Enfermedades inflamatorias relacionadas con infecciones o no infecciosas

[0269] La respuesta normal de los FER al poli I:C se caracteriza por la expresión de PPP1R15A, el aumento en eIF2 α -P (variable en el tiempo y relacionado con los niveles de expresión de PPP1R15A) mediado por la

65

activación de PKR y la producción de IFN de tipo I (intervalo de 500 a 700 pg/ml). Los FER PPP1R15A -/- son incapaces de producir esta citocina en respuesta a poli I:C.

5 **[0270]** La potencia de los compuestos de la invención para inhibir PPP1R15A se evaluó midiendo el aumento de la fosforilación de eIF2alfa, la disminución de la expresión de PPP1R15A debido a su propia inhibición farmacológica que resulta en la inhibición general de la síntesis de proteínas y la producción de IFN de tipo I.

10 **[0271]** Los compuestos evaluados de la invención se encontraron eficientes a 25 mM para aumentar la fosforilación de eIF2alfa, disminuir la expresión de PPP1R15A y prevenir la producción de IFN de tipo I. Como ejemplo, la Figura 13 muestra la capacidad de los compuestos 1, 6 y 8 (a 25 microM) para prevenir la producción de IFN de tipo I por fibroblastos embrionarios de ratón lipofectados con poli I:C.

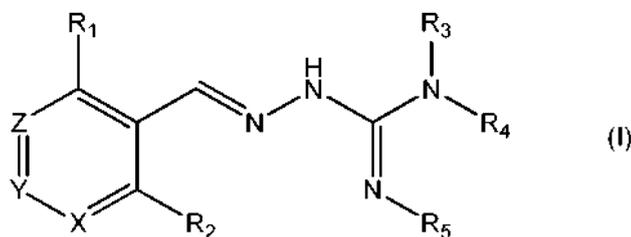
15 **[0272]** Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención prometen un tratamiento efectivo de afecciones inflamatorias no infecciosas o relacionadas con infecciones.

2.11- Isquemia cardíaca

20 **[0273]** El compuesto 2 de la invención protege los cardiomiocitos de rata neonatal cultivados de la apoptosis inducida por hipoxia (Figura 14). Estos datos muestran que los compuestos de la presente invención prometen un tratamiento efectivo de la isquemia, específicamente de la isquemia cardíaca.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

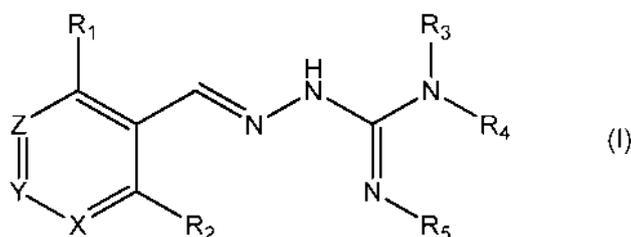


5

o un tautómero de los mismos
donde:

- 10 R₁ es alquilo, O-alquilo, Cl, F o Br;
R₂ es H o F;
R₃ se selecciona de entre H y alquilo;
R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;
R₅ es H;
15 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;
R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
20 cada R₁₀ se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;
cada uno de X y Z es independientemente CR₁₁, e Y se selecciona de entre CR₁₁ y N;
R₁₁ es H, alquilo o F;
25 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado en el grupo de sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), colitis, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, nefropatía diabética, shock hemorrágico, espondiloartropatías, pancreatitis;
cáncer inducido por inflamación; fibrosis quística; enfermedades relacionadas con la poliglutamina (tales como la enfermedad de Machado-Joseph); enfermedades de la polialanina (tales como la distrofia muscular
30 oculofaríngea);
leucodistrofias y esclerosis múltiple.

2. Un compuesto de la fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



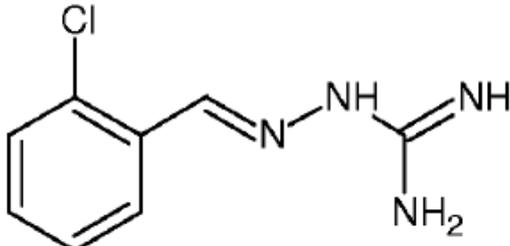
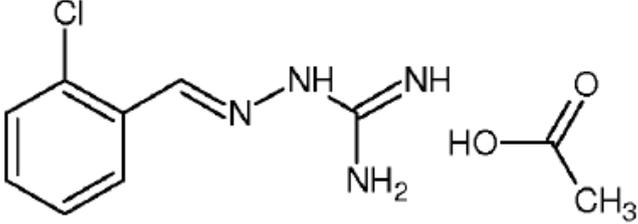
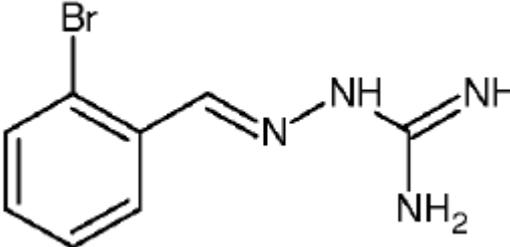
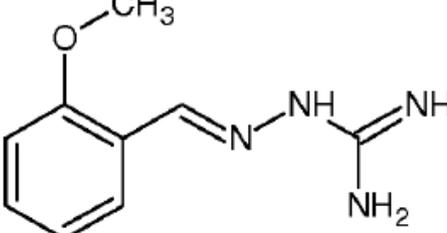
35

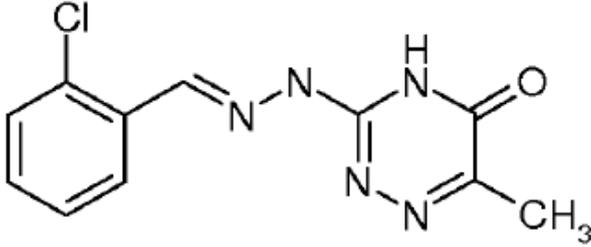
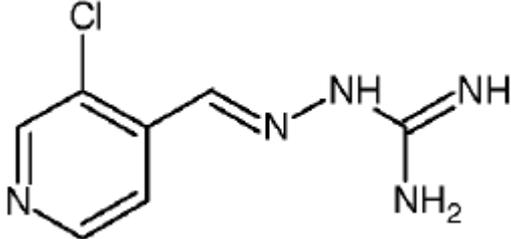
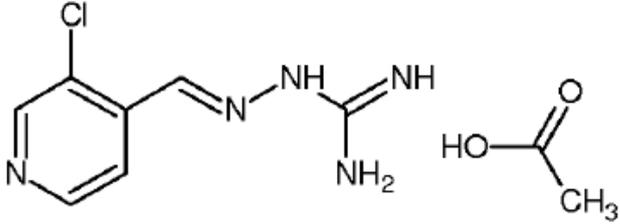
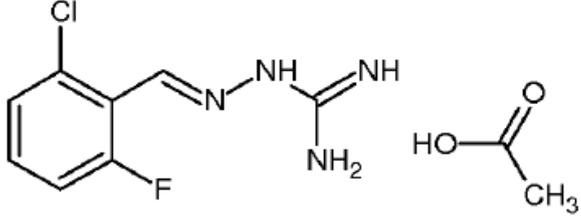
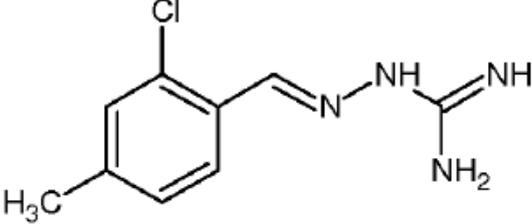
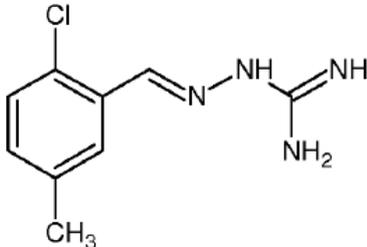
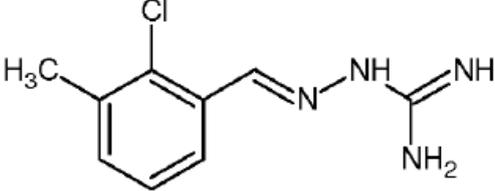
o un tautómero de los mismos
donde:

- 40 R₁ es alquilo, Cl, F o Br;
R₂ es H o F;
R₃ se selecciona de entre H y alquilo;
R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;
R₅ es H;
45 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;
R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterociclilo y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
50

cada R_{10} se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO_2 -alquilo, SO_2 -arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH_2 , NH-alquilo, $N(\text{alquilo})_2$, CF_3 , alquilo y alcoxi; cada uno de X y Z es independientemente CR_{11} , e Y se selecciona de entre CR_{11} y N; R_{11} es H o F;

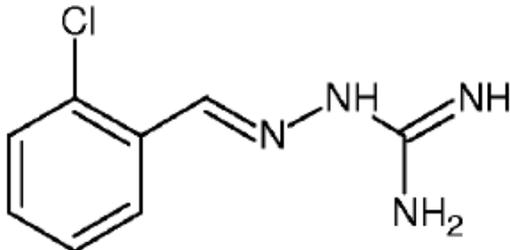
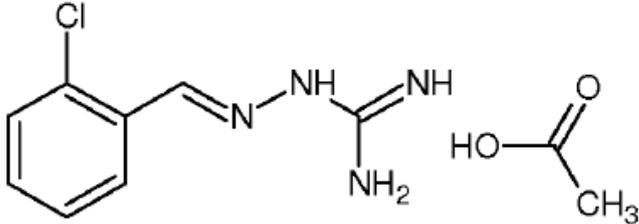
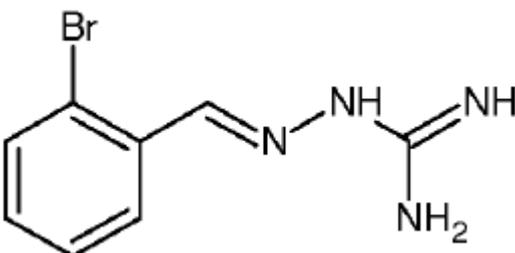
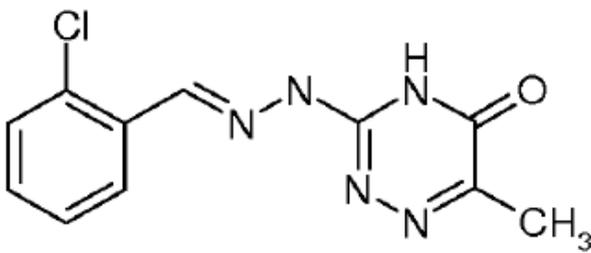
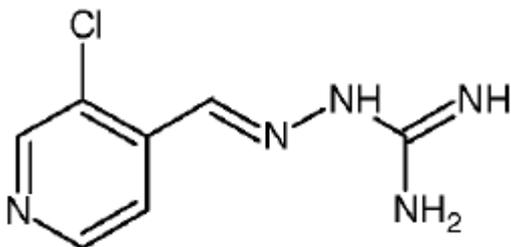
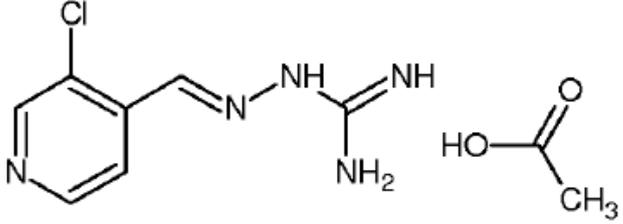
- 5 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado en el grupo de afecciones inflamatorias seleccionadas de entre leucodistrofias y esclerosis múltiple.
3. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, donde R_1 es Cl, Br, Me o F, más preferentemente, Cl.
- 10 4. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1, 2 o 3, donde R_2 es H.
5. Un compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde Y es CR_{11} .
6. Un compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R_3 y R_4 son ambos H.
- 15 7. Un compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde R_3 es H y R_4 es $C(O)R_6$, siendo R_6 Me u OMe.
8. Un compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, que se selecciona de entre los
- 20 siguientes:

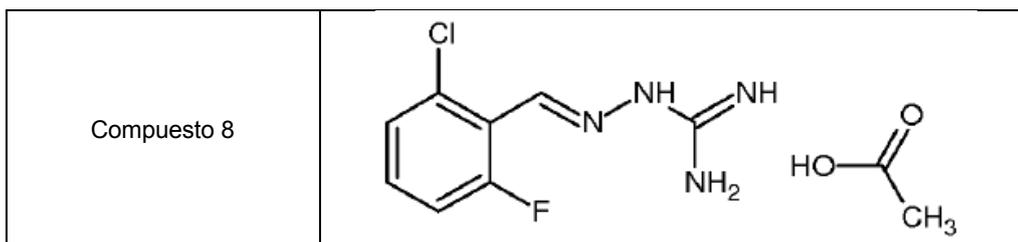
Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	
Compuesto 4	

Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7	
Compuesto 8	
Compuesto 9	
Compuesto 10	
Compuesto 11	

y tautómeros o una sal aceptable de los mismos.

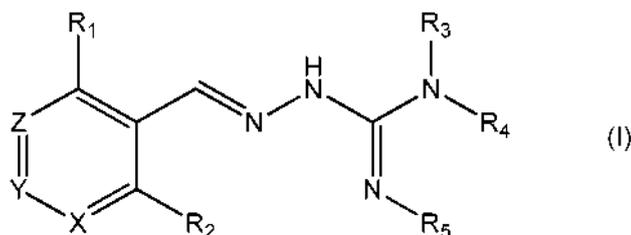
9. Un compuesto para uso según las reivindicaciones 1, 2 o 3, que se selecciona de entre los siguientes:

Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	
Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7	



y tautómeros o una sal aceptable de los mismos.

- 5 10. Un compuesto para su uso según la reivindicación 8, que es el compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
11. Un compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 a 9, donde el trastorno es esclerosis múltiple.
- 10 12. Un compuesto para su uso según la reivindicación 1 a 9, donde el trastorno es una leucodistrofia, preferentemente la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher.
13. Un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



15

y tautómeros de los mismos, donde:

- 16 R₁ es alquilo, O-alquilo, Cl, F o Br;
- 17 R₂ es H o F;
- 18 R₃ se selecciona de entre H y alquilo;
- 19 R₄ se selecciona de entre H y C(O)R₆;
- 20 R₅ es H;
- 21 o R₄ y R₅ están unidos para formar un grupo heterocíclico saturado o insaturado de 5 a 6 miembros que comprende opcionalmente 1 o 2 heteroátomos, tales como N, además de los átomos N, a los que R₄ y R₅ están unidos, y donde dicho grupo heterocíclico está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
- 22 R₆ se selecciona de entre R₇, OR₇ y NR₈R₉;
- 23 R₇, R₈ y R₉ se seleccionan cada uno independientemente de entre alquilo, cicloalquilo, aralquilo, cicloalqueno, heterocíclico y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos R₁₀;
- 24 cada R₁₀ se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, =O, CN, COO-alquilo, aralquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;
- 25 cada uno de X y Z es independientemente CR₁₁, e Y se selecciona de entre CR₁₁ y N;
- 26 R₁₁ es H, alquilo o F;
- 27 con un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BIP, seleccionado de entre ácido valporico o un derivado del mismo, tal como ácido 2-eno-valpórico, tricostatina A, litio, 1-(3,4-dihidroxi-fenil)-2-tiocianato-etanona, exendina-4, para su uso en asociación en el tratamiento de enfermedades retinianas seleccionadas en el grupo de degeneración retiniana hereditaria, tal como ciliopatías retinianas, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de prematuros, degeneración retiniana inducida por la luz, desprendimiento retiniano, retinopatía diabética y glaucoma.

40

14. Un compuesto para su uso según la reivindicación 13, donde el compuesto de la fórmula (I) se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

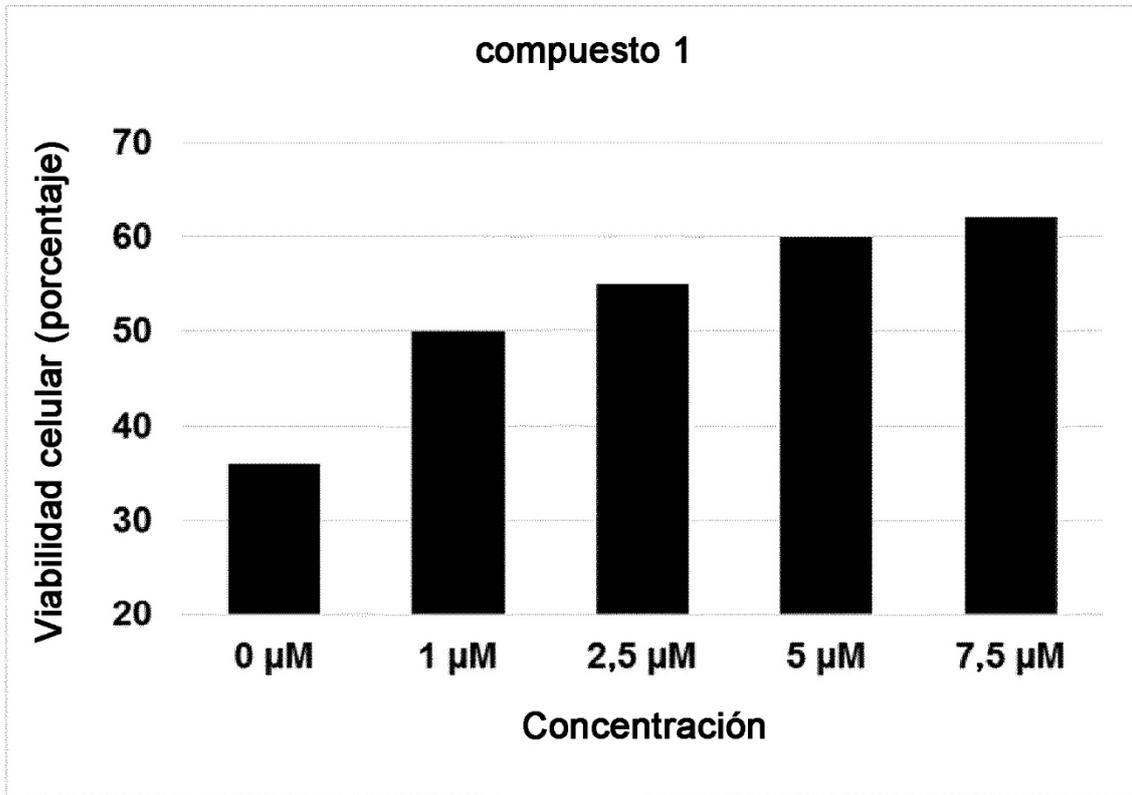


Fig. 1

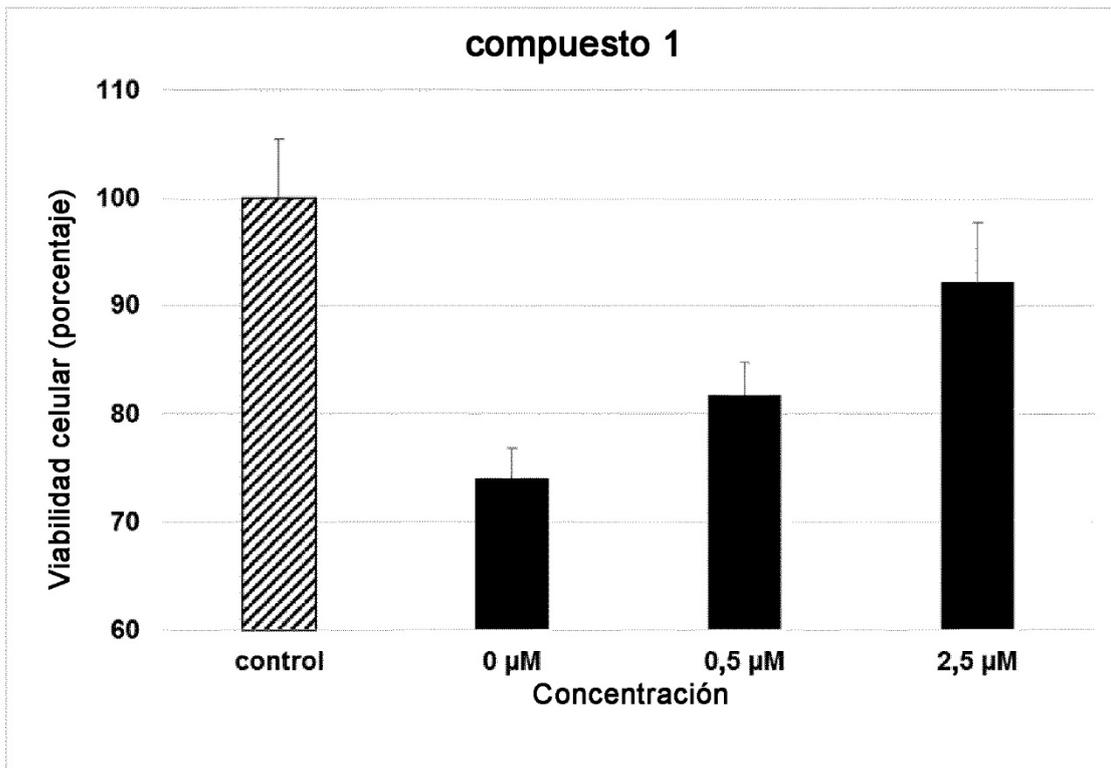


Fig. 2

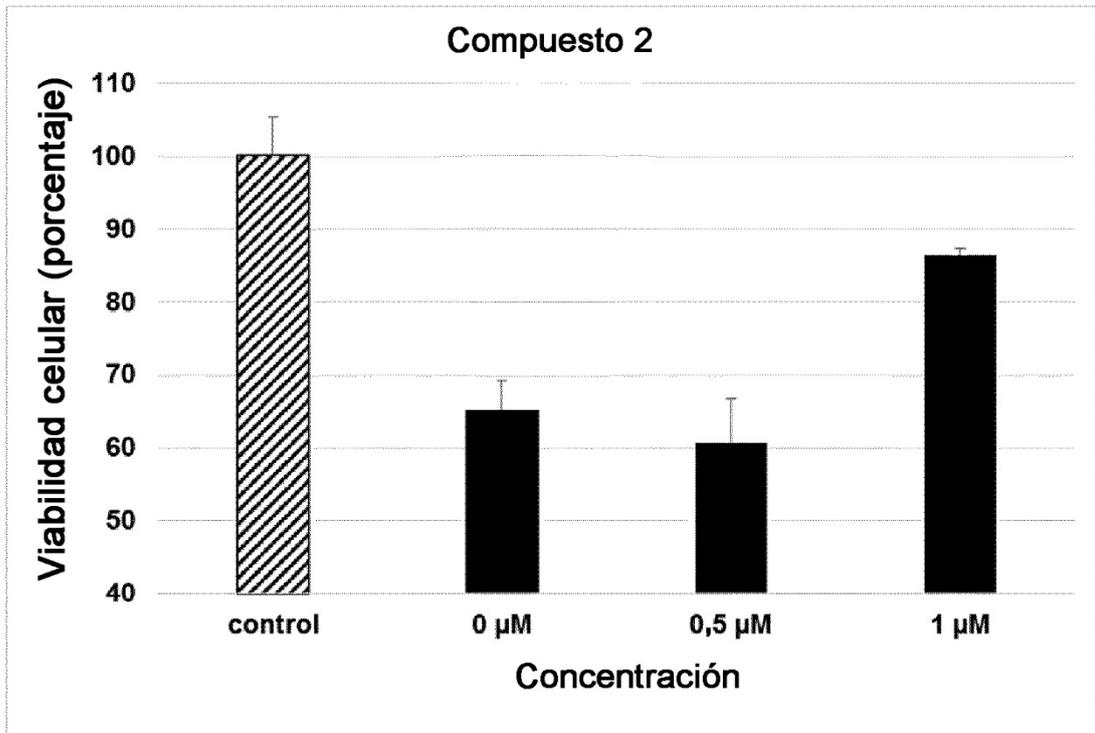


Fig. 3

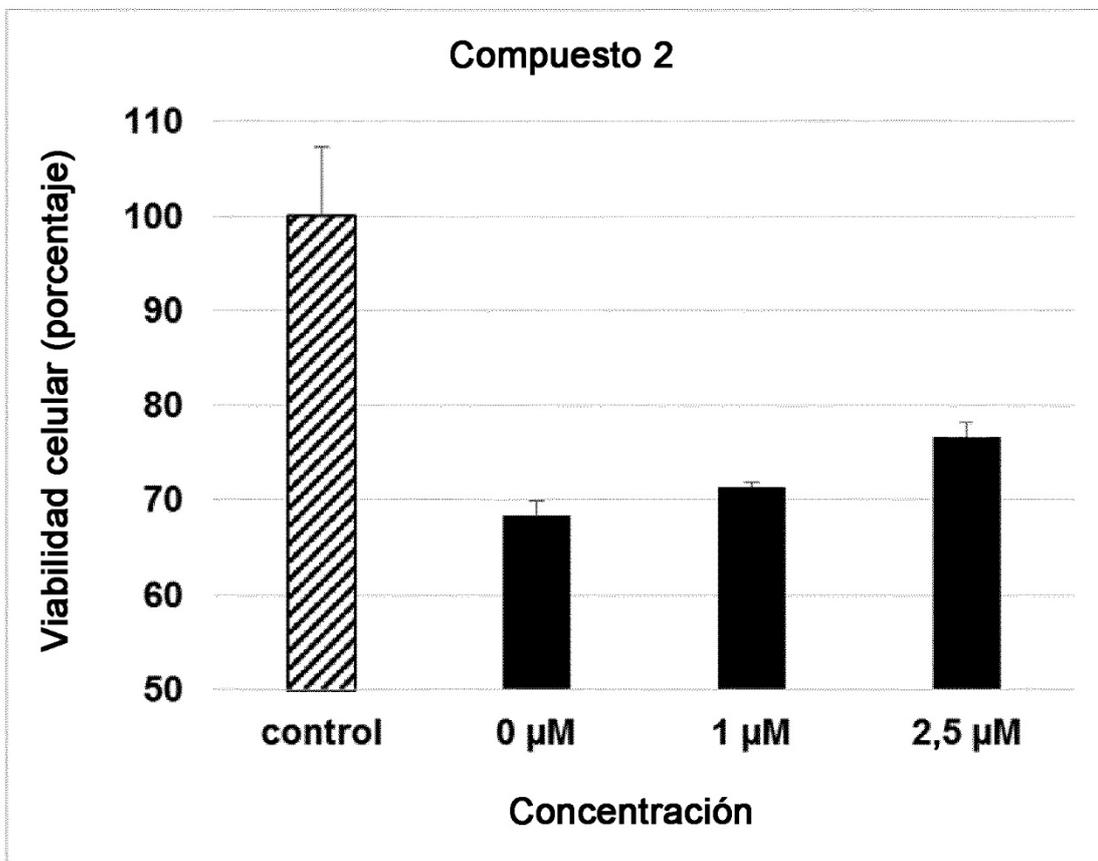


Fig. 4

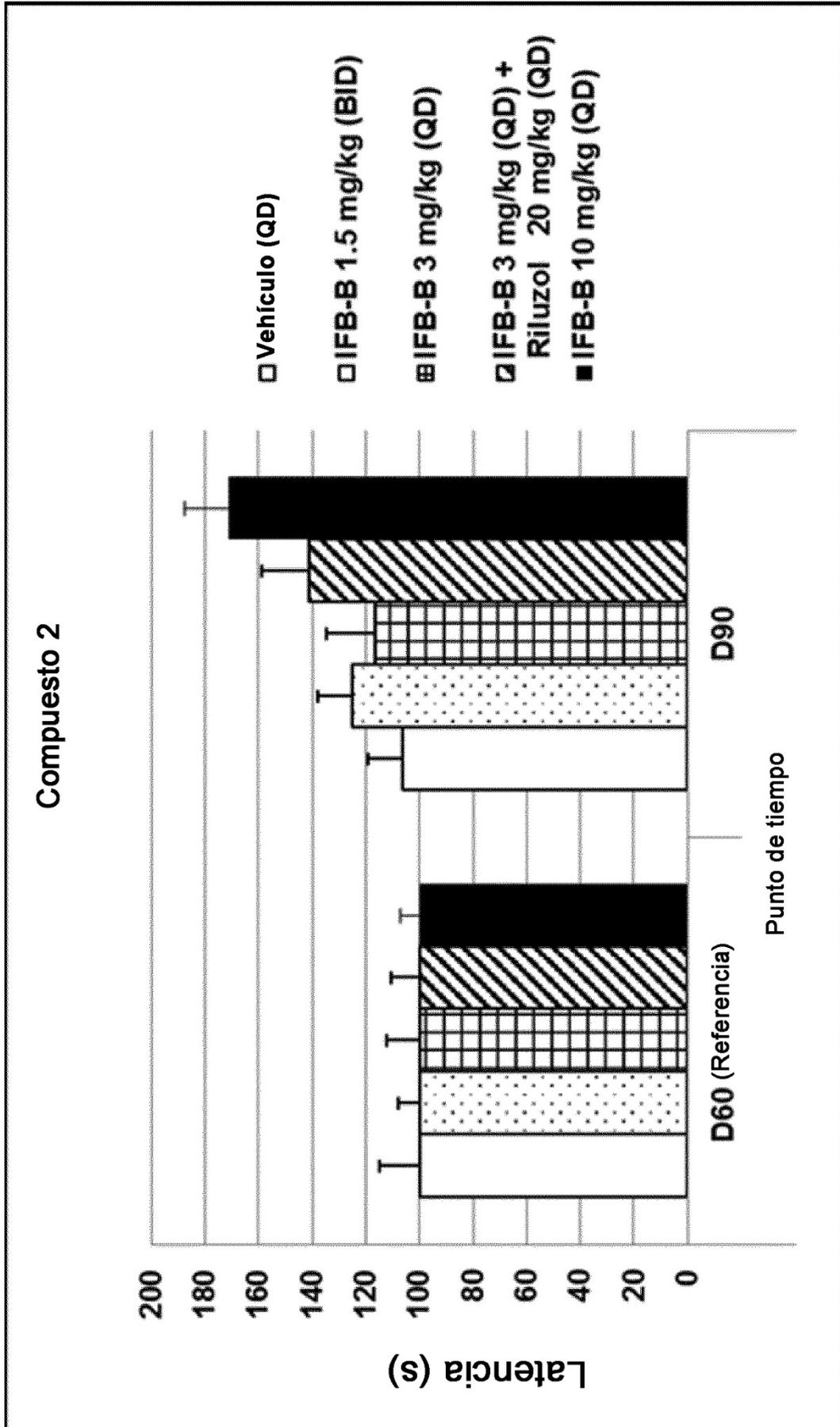


Fig. 5

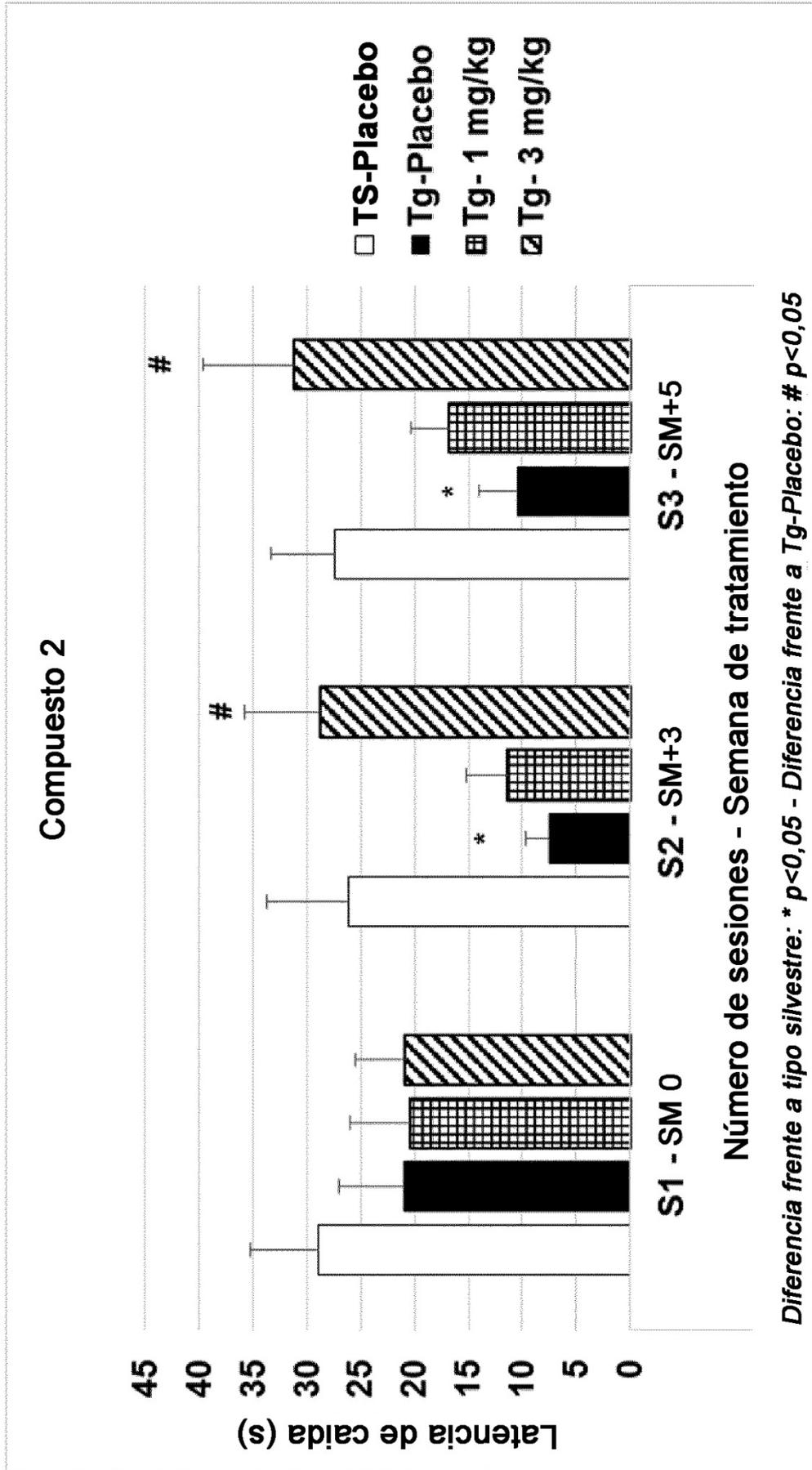


Fig. 6

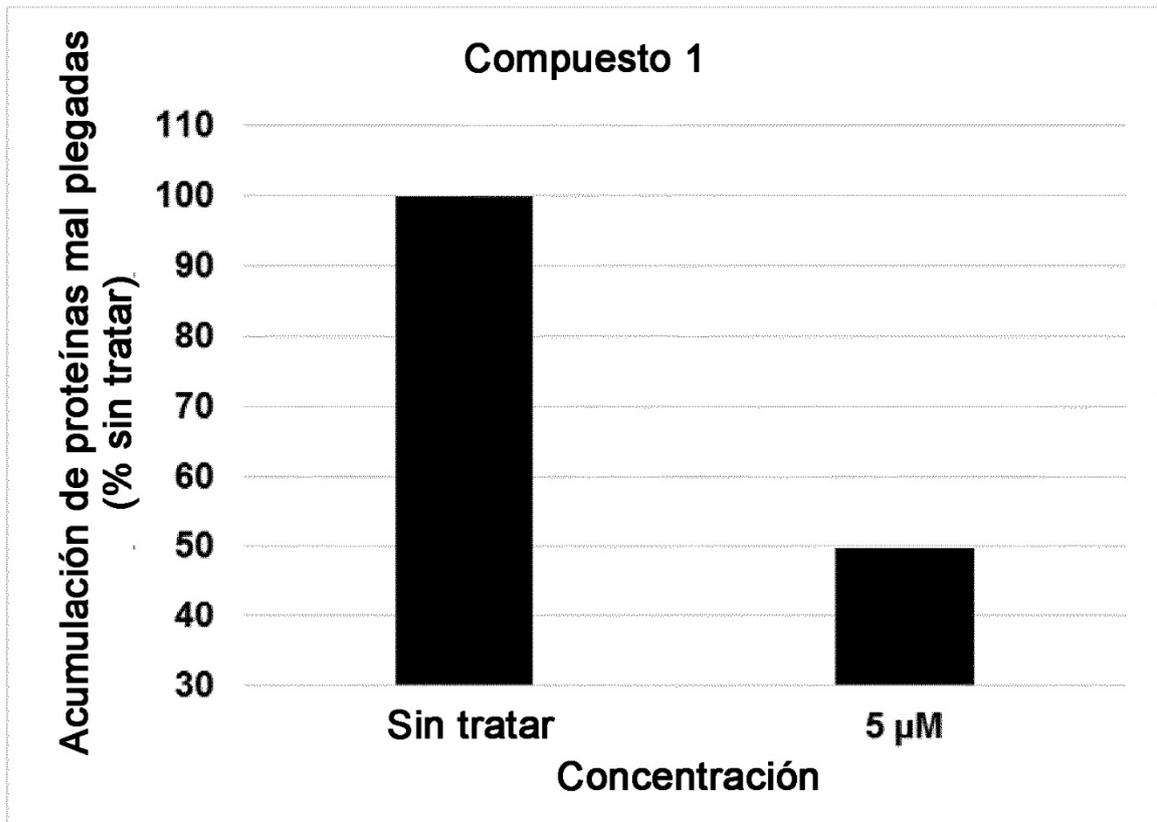


Fig. 7

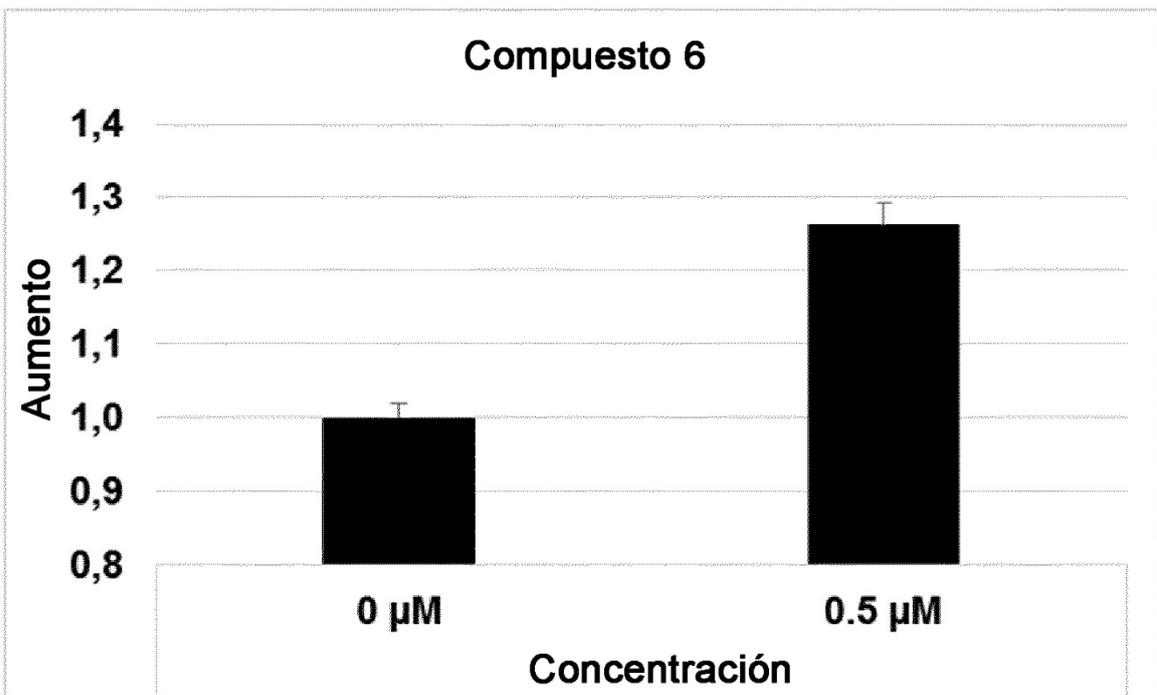


Fig. 8

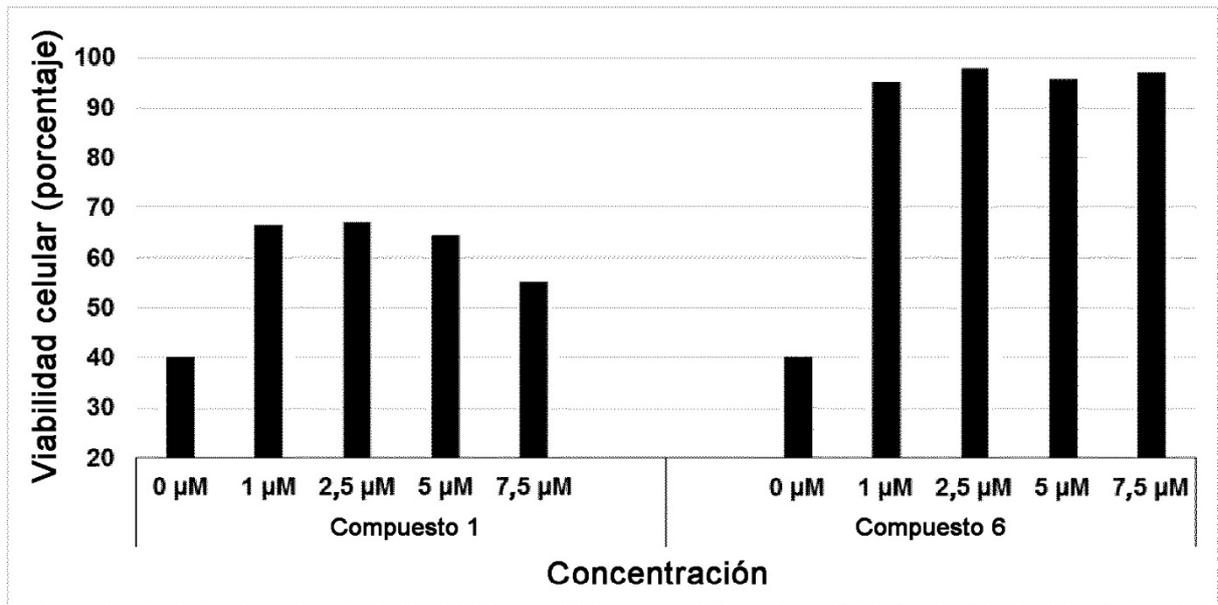


Fig. 9

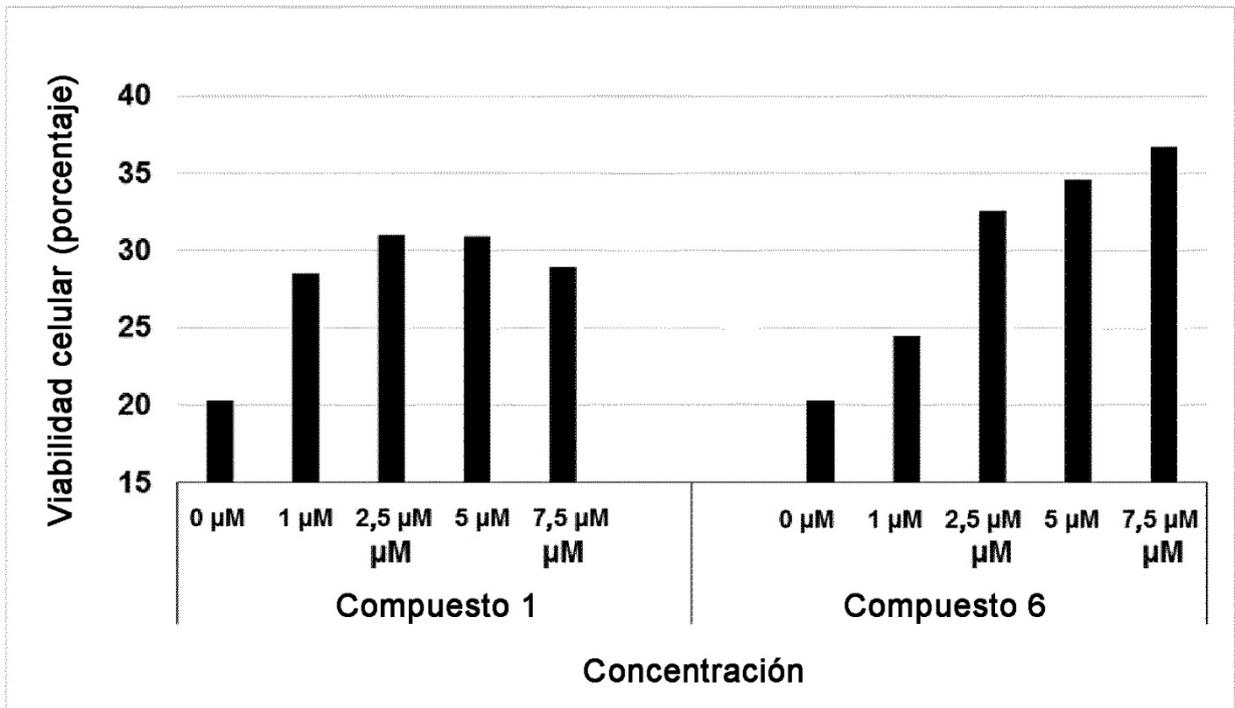


Fig. 10

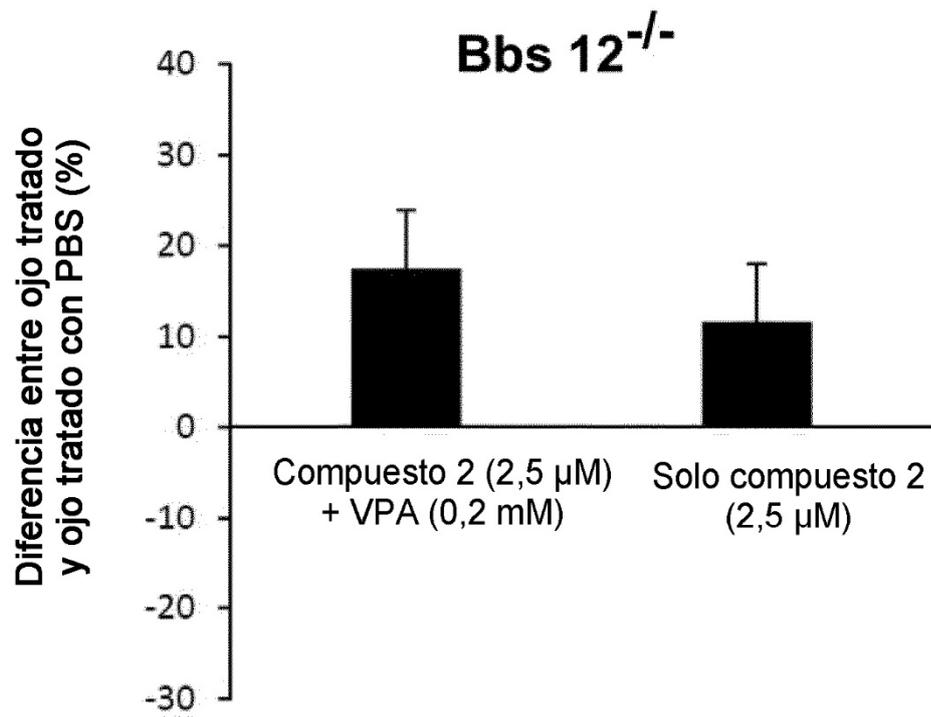


Fig. 11

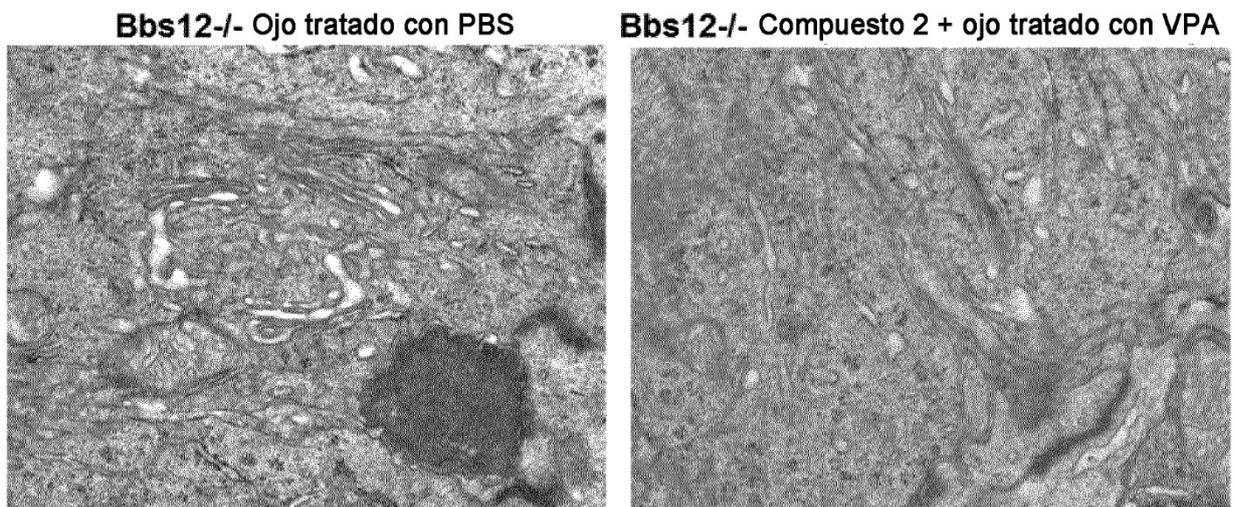


Fig. 12

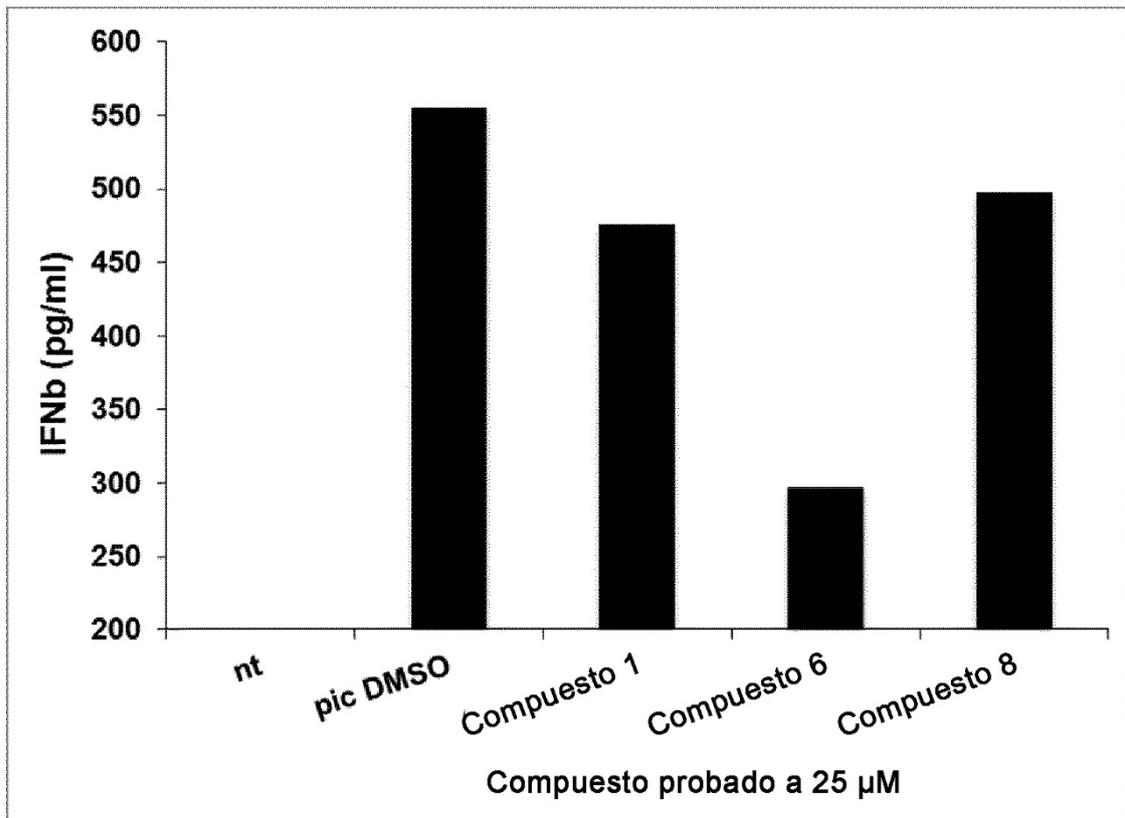


Fig. 13

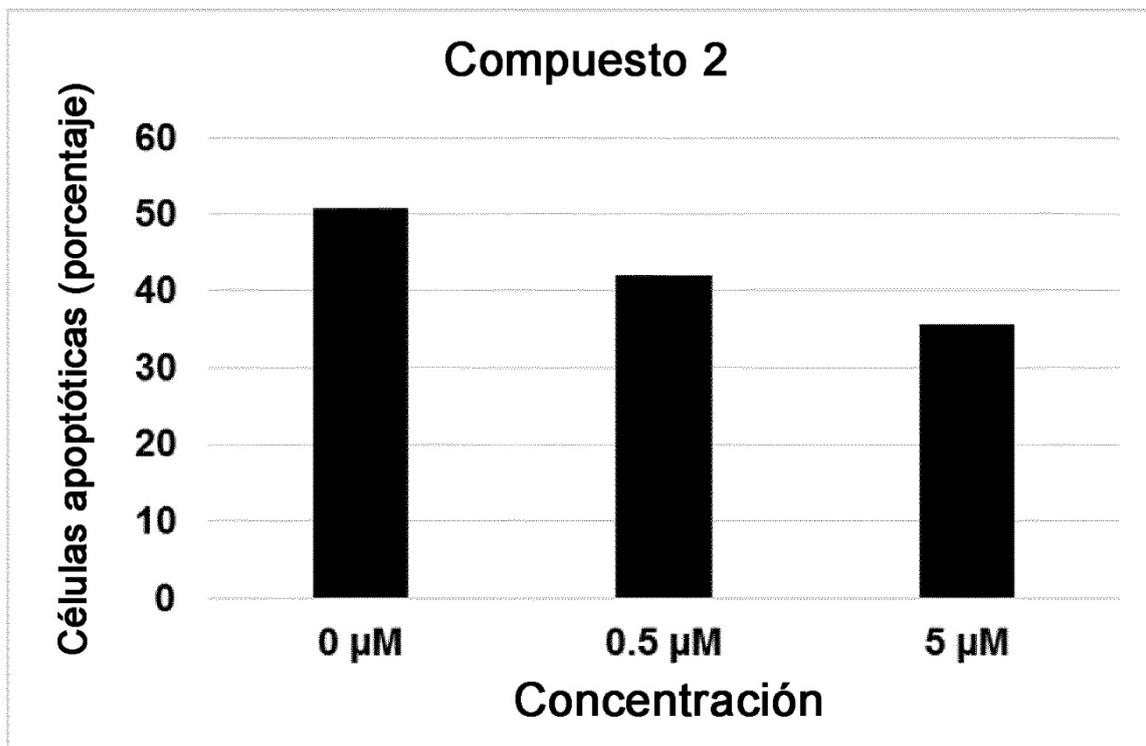


Fig. 14