

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 588**

51 Int. Cl.:

C07D 219/12 (2006.01)

A61K 31/473 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 417/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2006 E 06708555 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1943223**

54 Título: **Derivados de 9-amino-acridina y su uso para la eliminación de proteínas de plegamiento erróneo**

30 Prioridad:

01.03.2005 DE 102005009909

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

04.03.2014

73 Titular/es:

KORTH, CARSTEN (25.0%)

Fürstenwall 57

40219 Düsseldorf, DE;

KLINGENSTEIN, RALF (25.0%);

GMEINER, DR. PETER (25.0%) y

LÖBER, STEFAN (25.0%)

72 Inventor/es:

KORTH, CARSTEN;

KLINGENSTEIN, RALF;

GMEINER, DR. PETER y

LÖBER, STEFAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

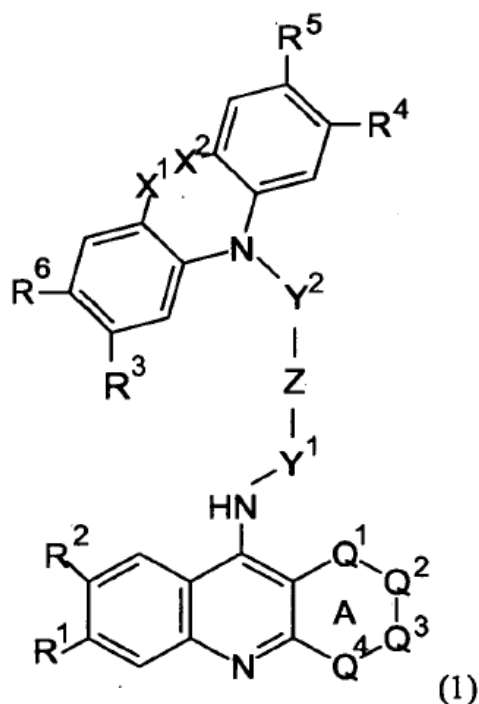
ES 2 445 588 T3

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

DESCRIPCIÓN

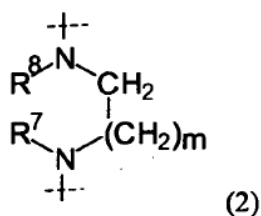
Derivados de 9-amino-acridina y su uso para la eliminación de proteínas de plegamiento erróneo

- 5 La invención se refiere a compuestos, sus enantiómeros y diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables, a su uso para la producción de un fármaco así como a un fármaco. Los compuestos son adecuados para el tratamiento de enfermedades en relación con proteínas de plegamiento erróneo.
- 10 Las enfermedades por priones son enfermedades neurodegenerativas mortales, que pueden aparecer tanto en seres humanos, por ejemplo enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ), como en el reino animal, por ejemplo encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en ganado vacuno o escrapia en ovejas. Las enfermedades pueden aparecer tanto de manera espontánea como por transmisión hereditaria y por infecciones. El agente infeccioso es el denominado prión, que se produce por una forma plegada de manera errónea de una proteína que existe en el organismo, de la proteína priónica. En el caso de una enfermedad, este prión se acumula en el sistema nervioso
- 15 central y, allí, lleva a la muerte celular. Aunque estas enfermedades aparecen sólo muy raras veces en seres humanos, en los últimos años, la atención pública se ha dirigido a las mismas, dado que se ha comprobado que en el caso de la EEB que aparece en ganado vacuno puede transmitirse a los seres humanos por la cadena alimenticia y puede desencadenar en los mismos la ECJ.
- 20 Las agregaciones de proteínas extracelulares o intracelulares son también un rasgo fenotípico de las enfermedades degenerativas crónicas, en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas por ejemplo de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o tauopatías.
- 25 En el estado de la técnica se conocen distintas sustancias que muestran una eficacia contra priones. Sin embargo, en el caso de las sustancias conocidas es desventajoso que éstas, debido a su polaridad, no puedan superar la barrera hematoencefálica y por lo tanto no pueden llegar al cerebro. Además, muchas de las sustancias no son eficaces en dosis bajas, pero sin embargo muestran un efecto tóxico a mayores dosificaciones.
- 30 Los derivados de acridina y de fenotiazina que se dan a conocer en el documento WO 02/096431 presentan por ejemplo la desventaja de que no son eficaces so sólo son muy poco eficaces en dosis bajas. Además, las acridinas, en particular bis-acridina, pueden actuar de manera tóxica. Así mismo, estas sustancias muestran únicamente unas mejoras transitorias de los síntomas de enfermedad, pero ningún efecto terapéutico a largo plazo. Esto muestra una desventaja adicional de las sustancias conocidas, que no muestran ningún efecto en estadios de la enfermedad avanzada o clínica.
- 35 El documento US-A1 20041229898 da a conocer bis-compuestos cíclicos para la eliminación de proteínas de plegamiento erróneo.
- 40 El documento "Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines" de Barnaby C. H. May y col. Proc Natl Acad Sci USA 2003 100(6) S. 3416-3421 da a conocer una inhibición eficaz de la replicación del prión de escrapia por bis-acridina en cultivo celular.
- 45 El objetivo de la presente invención consistía en proporcionar compuestos que superen al menos una de las desventajas del estado de la técnica. En particular, el objetivo de la presente invención consistía en proporcionar compuestos que presenten una eficacia mejorada frente a enfermedades degenerativas crónicas.
- Este objetivo se consigue mediante compuestos de acuerdo con la fórmula general (1) tal como se indica a continuación y/o sus enantiómeros y diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables:

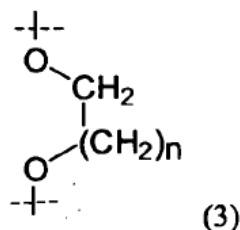


en la que:

- 5 A es un anillo de seis miembros, insaturado o parcialmente saturado;
- Q¹, Q², Q³, Q⁴ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende CH, C-halógeno, C-O-alquilo (C₁-C₁₀), C-CF₃, C-CN y/o CH₂;
- 10 R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₁-C₁₀, alquino C₁-C₁₀; alquilo C₁-C₁₀, CF₃, NH₂, NHR⁹, seleccionándose el resto R⁹ del grupo que comprende alquilo C₁-C₁₀ y/o acilo C₁-C₁₀, NO₂ y/o CN;
- 15 X¹, X² son en cada caso H, o X¹ y X² forman juntos X, donde:
- X se selecciona del grupo que comprende CH₂, CH₂-CH₂, CH=CH y/u O;
- Y¹, Y² son en cada caso independientemente entre sí alquilo C₁-C₁₀ no ramificado o ramificado;
- 20 Z es un elemento estructural Z¹ o Z² tal como se indica a continuación, donde:
- Z¹ presenta la siguiente fórmula general (2):



- 25 en la que:
m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6,
R⁷, R⁸ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende H, alquilo C₁-C₁₀, formando R⁷ y R⁸ dado el caso a través de un grupo CH₂-CH₂ un anillo, y/o acilo C₁-C₁₀;
- 30 Z² presenta la siguiente fórmula general (3):



en la que:

5 n es 2, 3, 4, 5 o 6.

Sorprendentemente se encontró que los compuestos de acuerdo con la invención pueden atravesar membranas celulares.

10 Una ventaja especial de los compuestos resulta, en este sentido, por que estos compuestos pueden utilizarse en dosificaciones bajas, por lo que se permite el uso de los compuestos en particular en seres humanos.

Es especialmente ventajoso que los compuestos de acuerdo con la invención presentan una toxicidad reducida.

15 Además se encontró sorprendentemente que los compuestos de acuerdo con la invención pueden influir positivamente en un plegamiento erróneo de proteínas.

20 En particular se encontró sorprendentemente que el grupo amino secundario en la cadena lateral de los compuestos de acuerdo con la invención de acuerdo con la fórmula (1) pueden aumentar claramente la eficacia frente a un grupo amino terciario.

25 El elemento estructural A es un anillo de seis miembros, insaturado o parcialmente saturado, siendo A un anillo de carbono. Q¹, Q², Q³ y Q⁴ comprenden de manera correspondiente átomos de carbono, que forman un anillo de carbono. Los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ pueden formar de manera correspondiente a la saturación del elemento A, grupos CH o CH₂.

30 Los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende CH, C-halógeno, C-O-alquilo (C₁-C₁₀), C-CF₃, C-CN y/o CH₂. Sustituyentes preferidos se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno seleccionado del grupo que comprende F, Cl y/o Br, y/o alquilo C₁-C₅, preferentemente seleccionado del grupo que comprende -O-metilo, -O-etilo, -O-isopropilo y/o -O-terc-butilo.

35 Los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ pueden seleccionarse de manera correspondiente en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende CH, CH₂, C-halógeno, C-O-alquilo (C₁-C₁₀), C-CF₃ y/o C-CN. Preferentemente, los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende CH, C-halógeno y/o C-O-alquilo (C₁-C₅), preferentemente seleccionado del grupo que comprende C-O-metilo, C-O-etilo, C-O-isopropilo y/o C-O-terc-butilo. De manera especialmente preferente los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende CH, C-Cl y/o C-O-metilo.

40 En formas de realización preferidas, el elemento estructural A es un anillo de carbono de seis miembros, insaturado. Además, preferentemente el elemento estructural Q² presenta sustituyentes. Preferentemente, los elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴ forman en cada caso un grupo CH y el elemento estructural Q² se selecciona del grupo que comprende CH y/o C-O-CH₃. En formas de realización especialmente preferidas, los elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴ forman en cada caso un grupo CH y el elemento estructural Q² es C-O-CH₃.

45 En formas de realización adicionalmente preferidas el elemento estructural A es un anillo de carbono de seis miembros, parcialmente saturado, de manera especialmente preferente un anillo de seis miembros, parcialmente saturado, no sustituido. En estas formas de realización, preferentemente todos los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ forman en cada caso un grupo CH₂.

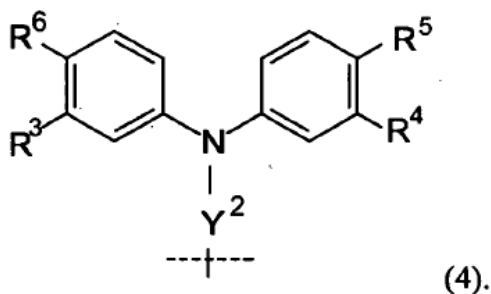
50 Los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ de los compuestos de acuerdo con la invención se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₁-C₁₀, alquino C₁-C₁₀, alquilo C₁-C₁₀, CF₃, NH₂, NHR⁹, seleccionándose el resto R⁹ del grupo que comprende alquilo C₁-C₁₀ y/o acilo C₁-C₁₀, NO₂ y/o CN.

55 Preferentemente, los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno seleccionado del grupo que comprende F, Cl y/o Br, NH₂, NHR⁹,

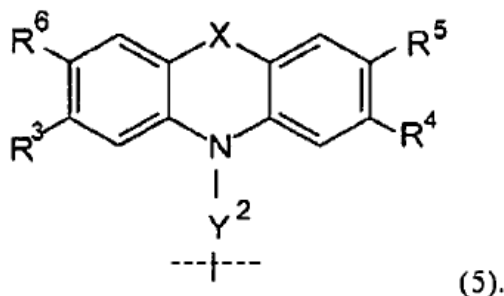
seleccionándose el resto R^9 del grupo que comprende alquilo C_1-C_{10} , preferentemente alquilo C_1-C_5 , preferentemente seleccionado del grupo que comprende metilo, etilo, isopropilo y/o terc-butilo, y/o acilo C_1-C_{10} , preferentemente acilo C_1-C_5 , NO_2 , alquilo C_1-C_{10} , preferentemente seleccionado del grupo que comprende metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y/o n-octilo, preferentemente alquilo C_1-C_5 , preferentemente seleccionado del grupo que comprende metilo, etilo, isopropilo y/o terc-butilo, y/o alquilo C_1-C_5 , preferentemente seleccionado del grupo que comprende -O-metilo, -O-etilo, -O-isopropilo y/o -O-terc-butilo. En formas de realización preferidas de los compuestos de acuerdo con la invención, los restos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, Cl y/o -O-metilo, de manera especialmente preferente independientemente entre sí seleccionado del grupo que comprende H y/o Cl.

Una sustitución con grupos R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 , que se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H y/o Cl puede tener como consecuencia un aumento considerable de la eficacia del compuesto.

Los elementos estructurales X^1 y X^2 pueden ser en cada caso H o formar juntos un elemento estructural X. Formas de realización que comprenden elementos estructurales X^1 y X^2 , que son en cada caso H, pueden presentar por ejemplo una estructura parcial de acuerdo con la siguiente fórmula (4):



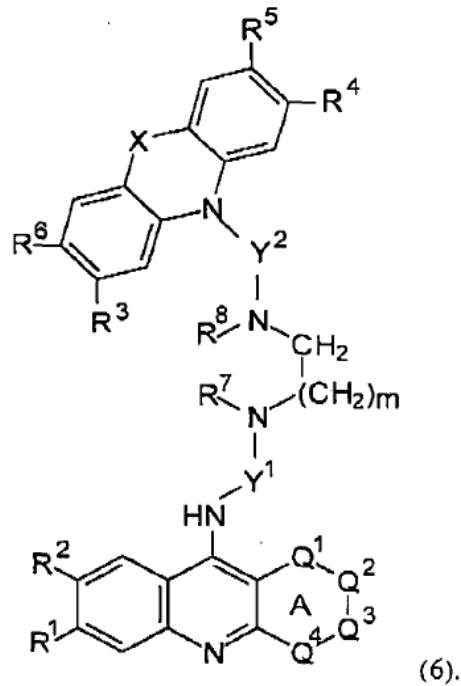
Si los elementos estructurales X^1 y X^2 forman juntos un elemento estructural X, resulta una estructura parcial de acuerdo con la siguiente fórmula (5):



El elemento estructural X puede ser un heteroátomo O, o puede seleccionarse del grupo que comprende CH_2 , CH_2-CH- , y/o $CH=CH$. Por lo tanto resultan sistemas de anillo, que presentan un anillo central de 6 o 7 miembros.

Compuestos de acuerdo con la invención especialmente preferidos presentan un elemento estructural X seleccionado del grupo que comprende $-CH_2-CH_2-$.

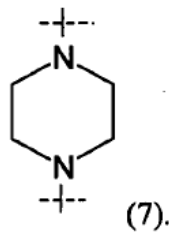
Preferentemente los compuestos de acuerdo con la invención comprenden un elemento estructural Z^1 . Formas de realización preferidas que comprenden un elemento estructural Z^1 presentan la siguiente fórmula (6):



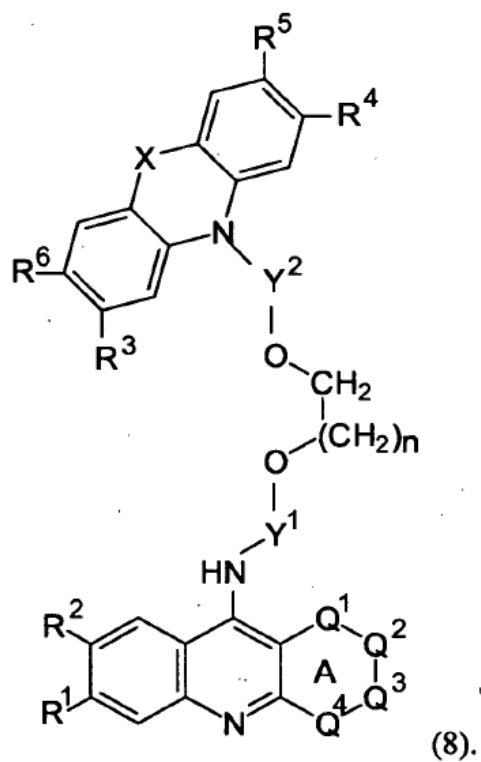
5 Los restos R^7 y R^8 son preferentemente H o grupos alquilo con C_1 a C_{10} tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y/o n-octilo, preferentemente alquilo C_1 - C_5 , en particular seleccionado del grupo que comprende metilo, etilo, isopropilo y/o terc-butilo. En estas formas de realización m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

10 Preferentemente el elemento estructural Z^1 presenta una estructura en forma de anillo, teniendo lugar el cierre de anillo a través de los restos R^7 y R^8 . Preferentemente la formación del anillo tiene lugar por que los restos R^7 y R^8 forman en cada caso un grupo CH_2 y forman juntos un grupo CH_1-CH_1 . En estas formas de realización m es preferentemente 1 o 2, de modo que se forma un anillo de 6 o 7 miembros heterocíclico.

15 En formas de realización preferidas m es igual a 1 y el elemento estructural Z^1 comprende un heterociclo de piperazina. El elemento estructural Z^1 presenta de manera correspondiente en formas de realización preferidas la siguiente fórmula (7):

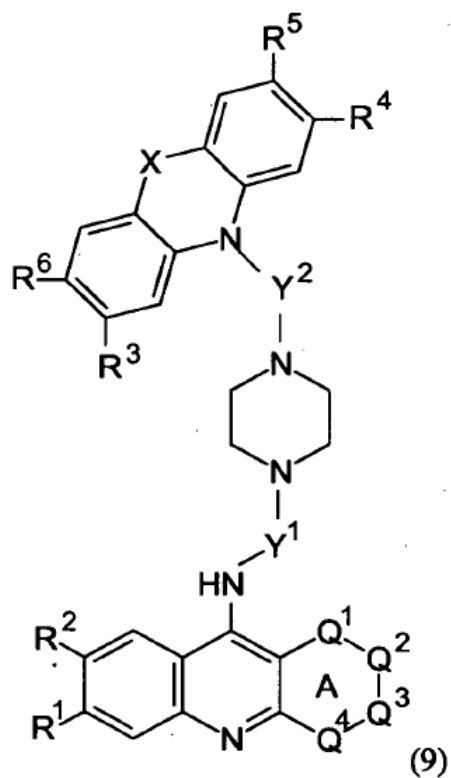


20 Además formas de realización preferidas que comprenden un elemento estructural Z^2 presentan la siguiente fórmula (8), en la que n es preferentemente 2, 3, 4 o 5:



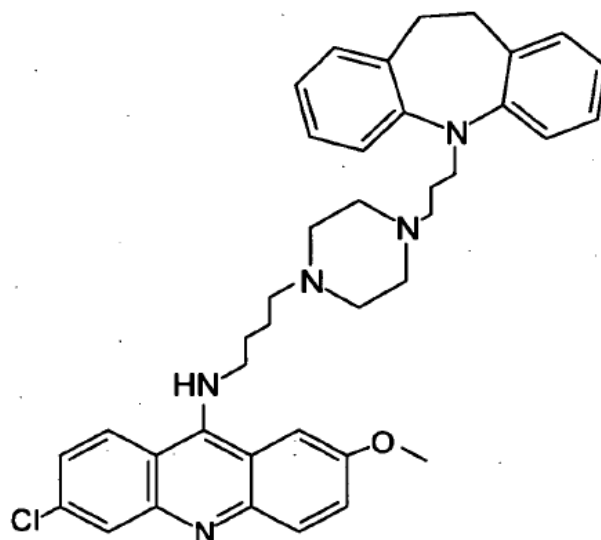
Los elementos estructurales Y^1 , Y^2 son en cada caso independientemente entre sí alquilo C_1 - C_{10} no ramificado o ramificado.

- 5 Compuestos especialmente preferidos y/o sus enantiómeros y diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables presentan la fórmula general (9), tal como se indica a continuación:



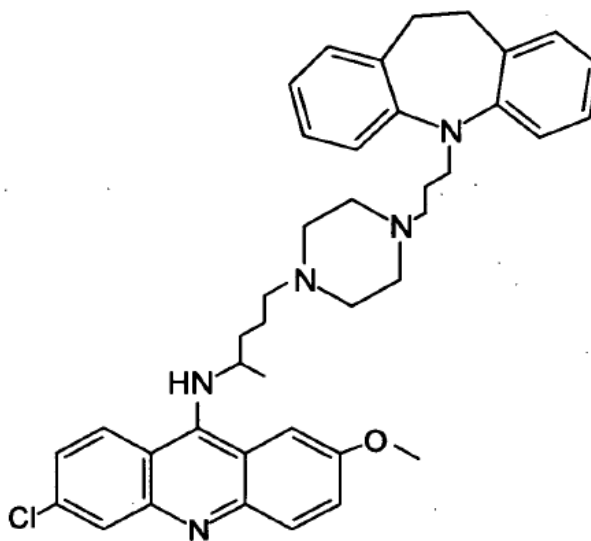
10 en la que:

- A
Q¹, Q², Q³, Q⁴
R², R³, R⁴, R⁵, R⁶
- 5 es un anillo de seis miembros, insaturado o parcialmente saturado;
se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende CH, C-halógeno, C-O-alquilo (C₁-C₁₀), C-CF₃, C-CN y/o CH₂;
se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₁-C₁₀, alquino C₁-C₁₀, alquinoxilo C₁-C₁₀, CF₃, NH₂, NHR⁹, seleccionándose el resto R⁹ del grupo que comprende alquilo C₁-C₁₀ y/o acilo C₁-C₁₀, NO₂ y/o CN;
- X
Y¹, Y²
- 10 se selecciona del grupo que comprende CH₂, CH₂-CH₂, CH=CH, O y/o S;
son en cada caso independientemente entre sí alquilo C₁-C₁₀ no ramificado o ramificado.
- 15 Preferentemente, los elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴ de los compuestos de acuerdo con la invención forman en cada caso un grupo CH y el elemento estructural, Q² se selecciona del grupo que comprende CH y/o C-O-CH₃. En formas de realización especialmente preferidas, los elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴ forman en cada caso un grupo CH y el elemento estructural Q² es C-O-CH₃. Además en formas de realización preferidas, preferentemente todos los elementos estructurales Q¹, Q², Q³ y Q⁴ forman en cada caso un grupo CH₂.
- 20 Preferentemente, los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno seleccionado del grupo que comprende F, Cl y/o Br, NH₂, NHR⁹, seleccionándose el resto R⁹ preferentemente del grupo que comprende alquilo C₁-C₅, preferentemente seleccionado del grupo que comprende metilo, etilo, isopropilo y/o terc-butilo, y/o acilo C₁-C₅, NO₂, alquilo C₁-C₅, preferentemente seleccionado del grupo que comprende metilo, metilo, isopropilo y/o terc-butilo, y/o alquinoxilo C₁-C₅, preferentemente seleccionado del grupo que comprende -O-metilo, -O-etilo, -O-isopropilo y/o -O-terc-butilo. En formas de realización especialmente preferidas de los compuestos de acuerdo con la invención, los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, Cl y/o -O-metilo, de manera especialmente preferente se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende H y/o Cl.
- 25 Compuestos especialmente preferidos presentan un elemento estructural X seleccionado del grupo que comprende -CH₂-CH₂-.
- 30 Los elementos estructurales Y¹ y Y² de los compuestos de acuerdo con la invención pueden presentar en cada caso independientemente entre sí al menos una ramificación, prefiriéndose cadenas laterales de metilo y/o de etilo. Preferentemente, los elementos estructurales Y¹ y Y² se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende -(CH₂)_o-, donde o es 2, 3, 4, 5 o 6, preferentemente 3 o 4, y/o -CH(CH₃)-(CH₂)_p-, donde p es 2, 3, 4 o 5, preferentemente 3 o 4, de manera especialmente preferente 3. En formas de realización muy especialmente preferidas, los elementos estructurales Y¹ y Y² son en cada caso independientemente entre sí -(CH₂)_o-, donde o es 3, 4 o 5.
- 35 En compuestos especialmente preferidos, la distancia formada por el grupo de los elementos estructurales Y¹-Z-Y² entre los átomos de nitrógeno adyacentes en cada caso a los elementos estructurales Y¹ y Y² presenta una longitud de 10 Å a 15 Å.
- 40 Compuestos especialmente adecuados presentan elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴, que forman en cada caso un grupo CH, y un elemento estructural Q² seleccionado del grupo que comprende CH y/o C-O-CH₃, siendo el elemento estructural Q² preferentemente C-O-CH₃, y elementos estructurales Y¹, Y², que se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende -(CH₂)_o- y/o -CH(CH₃)-(CH₂)_p-, donde o es 2, 3, 4, 5 o 6 y p es 2, 3, 4 o 5.
- 45 Así mismo, compuestos especialmente adecuados presentan elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴, que forman en cada caso un grupo CH, y un elemento estructural Q² seleccionado del grupo que comprende CH y/o C-O-CH₃, siendo el elemento estructural Q² preferentemente C-O-CH₃, y elementos estructurales Y¹, Y², que son en cada caso independientemente entre -(CH₂)_o-, donde o es 3, 4 o 5.
- 50 Compuestos muy especialmente adecuados comprenden elementos estructurales Q¹, Q³ y Q⁴, que forman en cada caso un grupo CH, y un elemento estructural Q² seleccionado del grupo que comprende CH y/o C-O-CH₃, siendo el elemento estructural Q² preferentemente C-O-CH₃, y elementos estructurales Y¹, Y² que son en cada caso independientemente entre sí -(CH₂)_o-, donde o es 3, 4 o 5 y los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H y/o Cl.
- 55 Formas de realización especialmente preferidas de los compuestos de acuerdo con la invención presentan la fórmula indicada a continuación (10) y/o son enantiómeros, diastereómeros de los mismos así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:
- 60



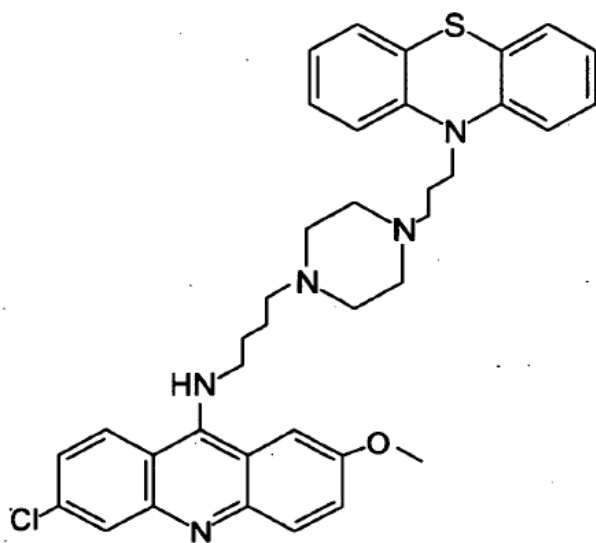
(10).

Además formas de realización preferidas de los compuestos de acuerdo con la invención presentan la fórmula indicada a continuación (11) y/o son enantiómeros, diastereómeros de los mismos así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



(11).

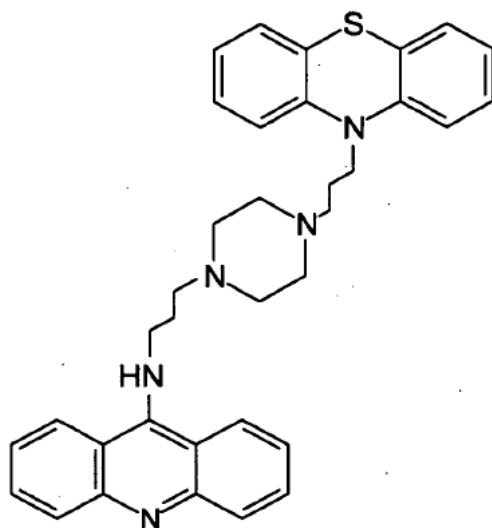
Se describen compuestos de fórmula indicada a continuación (12) y/o sus enantiómeros y diastereómeros. Así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



(12).

Así mismo se describen compuestos de fórmula indicada a continuación (13) y/o enantiómeros, diastereómeros de los mismos así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

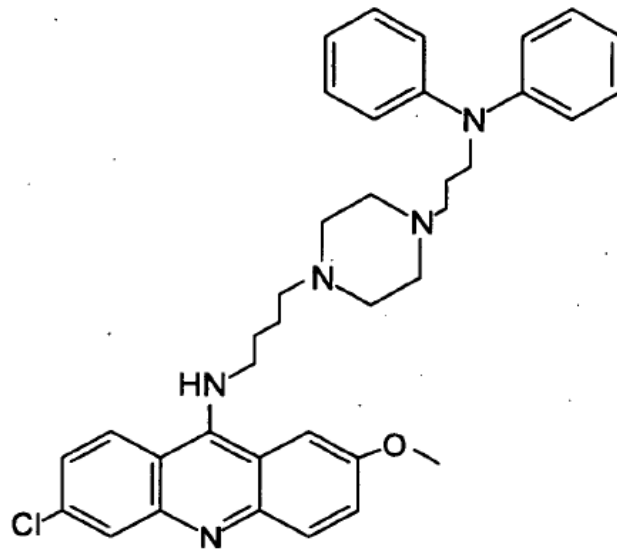
5



(13).

Aún formas de realización preferidas adicionales de los compuestos de acuerdo con la invención presentan la fórmula indicada a continuación (14) y/o son enantiómeros, diastereómeros de los mismos así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

10

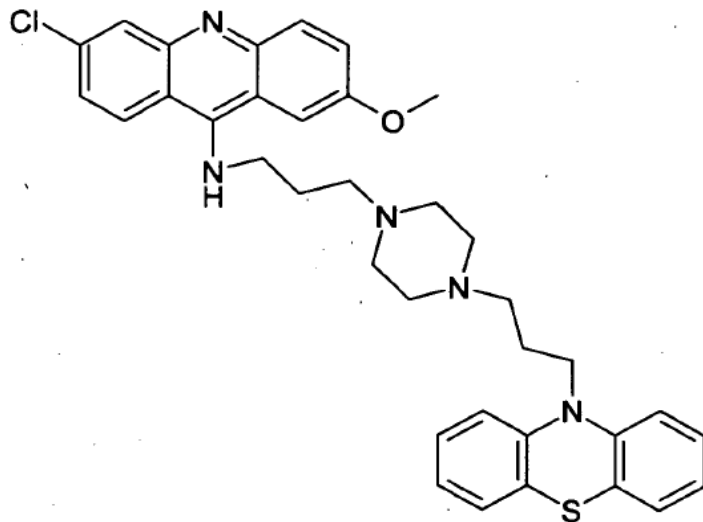


(14).

5 Compuestos preferidos se seleccionan del grupo que comprende (6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-(4-{4-[3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-piperazin-1-il}-butil)-amina y/o (6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-(3-{4-[3-(dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-piperazin-1-il}-propil)-amina, correspondiendo el compuesto mencionado en primer lugar la compuesto (10).

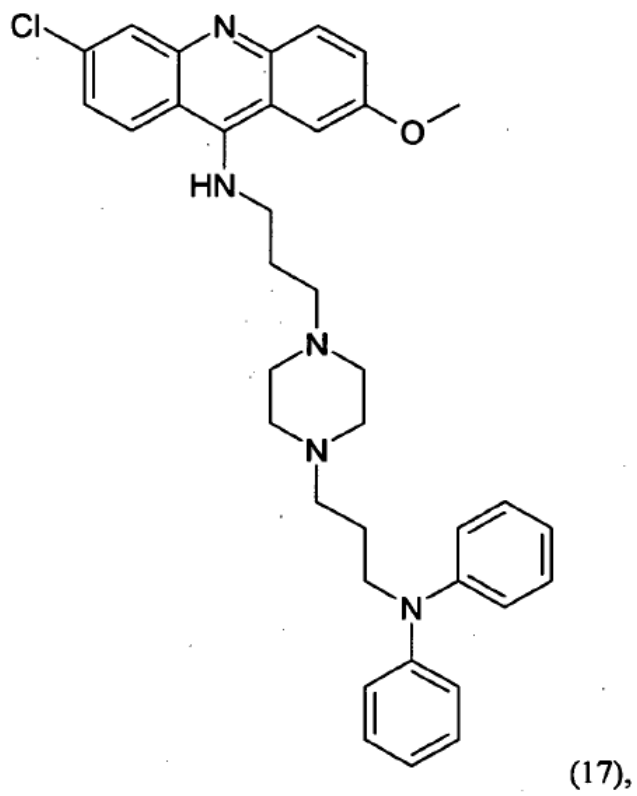
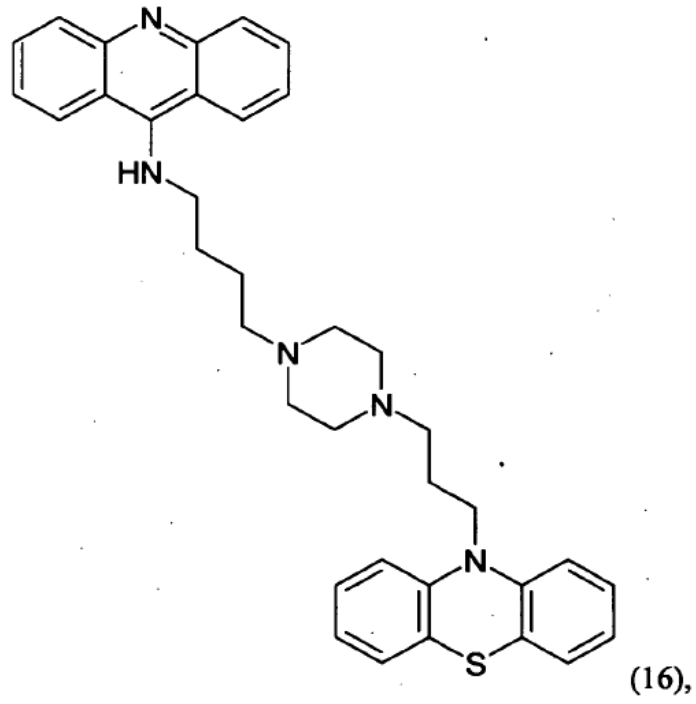
10 Formas de realización adicionales de los compuestos de acuerdo con la invención presentan las fórmulas indicadas a continuación (17) a (21), (23) y (24) y/o son enantiómeros, diastereómeros de los mismos así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

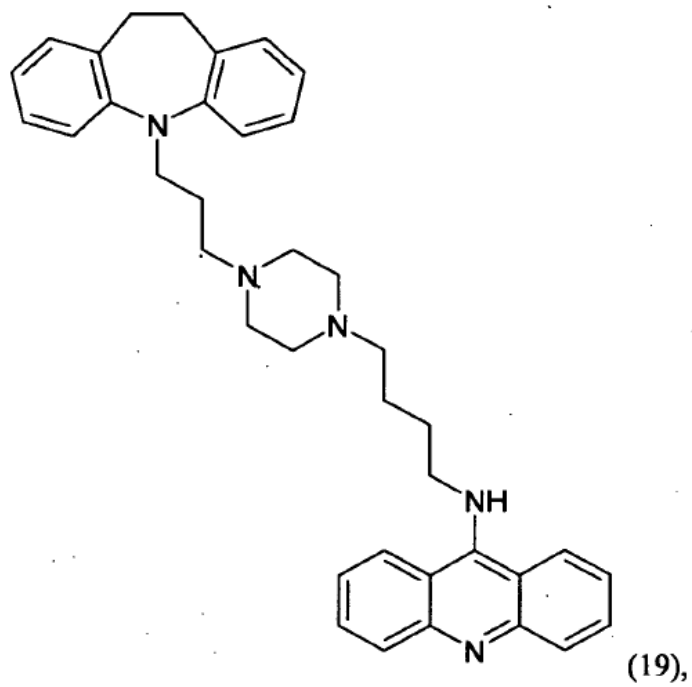
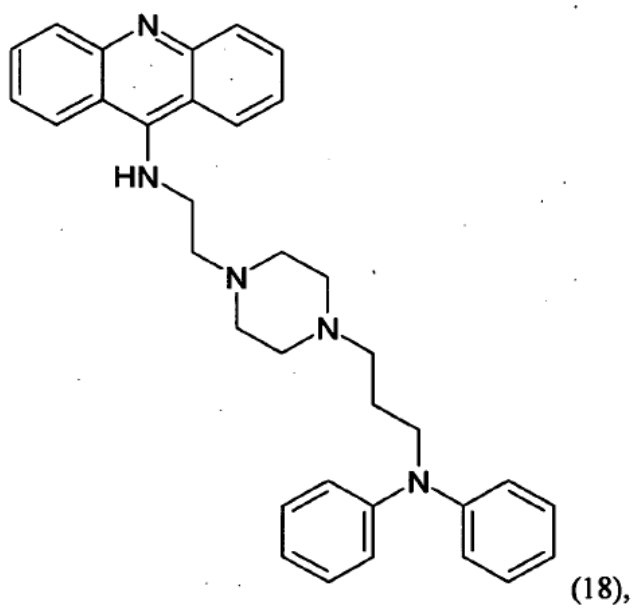
Se describen además compuestos de las fórmulas indicadas a continuación (15), (16) y (22) y/o sus enantiómeros y diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables:

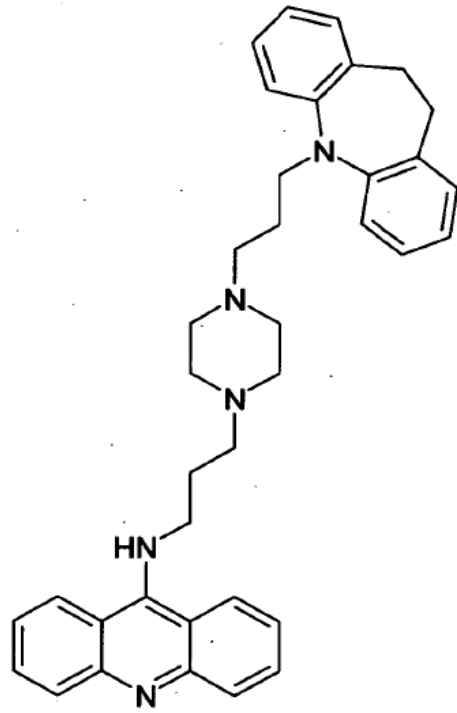


(15),

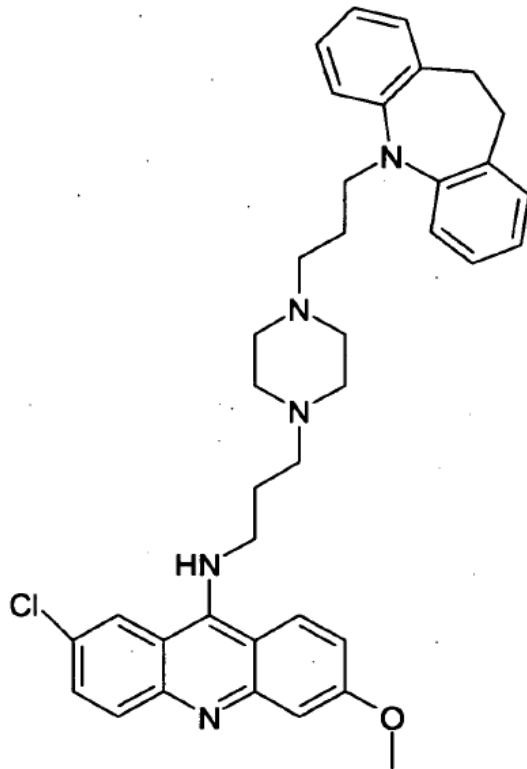
15



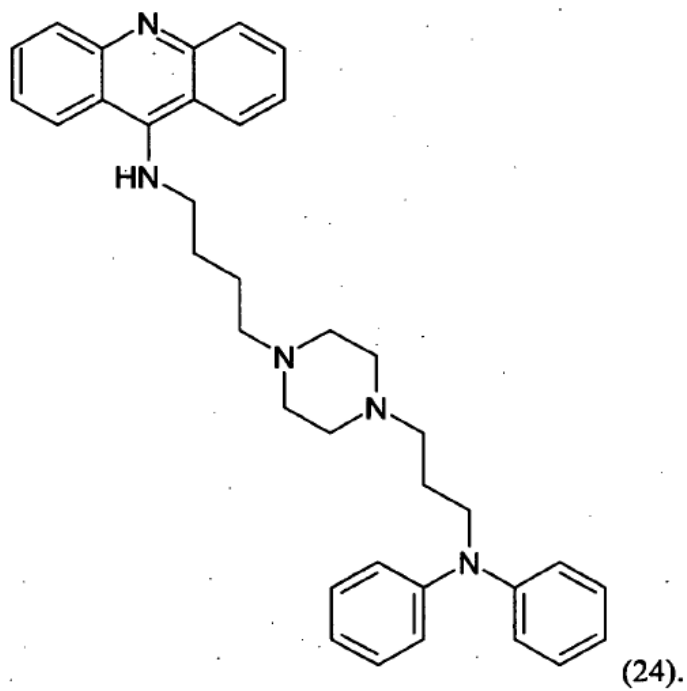
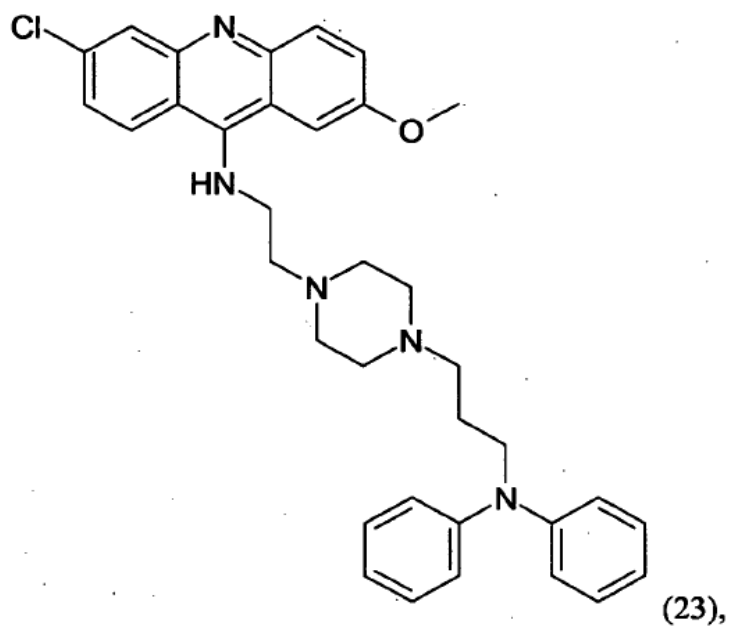
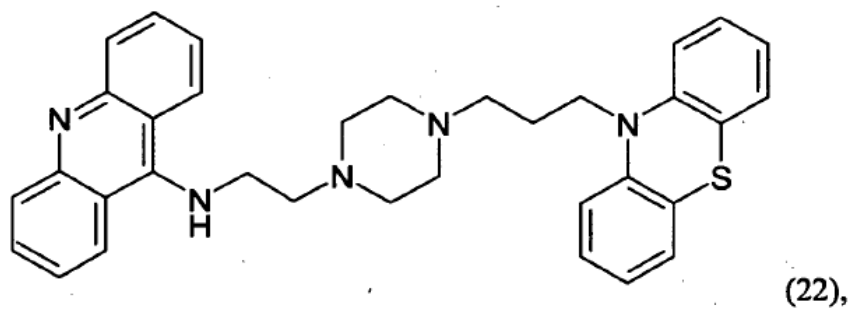




(20),



(21),



5 Los compuestos pueden producirse de acuerdo con métodos de síntesis habituales

Una ventaja de los compuestos en formas de realización preferidas se basa en que estos compuestos pueden atravesar membranas celulares. En particular, los compuestos de acuerdo con la invención pueden presentar una

buena capacidad de paso de la barrera hematoencefálica adecuada. Esto permite que los compuestos de acuerdo con la invención puedan utilizarse *in vivo* e *in vitro*. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse por ejemplo en cultivos celulares. En formas de realización especialmente preferidas pueden usarse compuestos de acuerdo con la invención también en tejidos u órganos. En particular, los compuestos de acuerdo con la invención permiten poder utilizarse en organismos.

Debido a sus propiedades ventajosas, los compuestos de acuerdo con la invención son adecuados para su uso como fármaco.

Un objetivo adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención, en particular a los compuestos de fórmulas generales (10) y (14), para la producción de un fármaco.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden administrarse de manera correspondiente a métodos habituales, se prefiere una administración oral o dérmica y/o una administración por medio de inyección, por ejemplo por vía intravenosa, por vía subcutánea y/o por vía intramuscular. Se prefiere especialmente una administración oral.

Una ventaja de los compuestos de acuerdo con la invención es que éstos pueden presentar una accesibilidad de la barrera hematoencefálica mejorada. De este modo puede conseguirse una alta disponibilidad de los compuestos en su sitio de acción, en particular en células del cerebro. Por la expresión "accesibilidad de la barrera hematoencefálica" se entiende en el sentido de la invención que los compuestos atraviesan la barrera hematoencefálica y pueden llegar al cerebro, a las células del cerebro, en particular a las neuronas. En formas de realización especialmente ventajosas, los compuestos llegan completamente o casi completamente a las células del cerebro y/o se encuentran completamente o casi completamente disponibles en las células del cerebro.

Esto es especialmente ventajoso dado que la cantidad de los compuestos a administrar en el caso de los compuestos de acuerdo con la invención puede ser claramente menor que en el caso de sustancias que presentan una accesibilidad de la barrera hematoencefálica menor. De manera ventajosa, puede reducirse de manera correspondiente la aparición de efectos secundarios mediante la administración de dosificaciones menores.

Dosificaciones preferidas de los compuestos de acuerdo con la invención se encuentran para la administración en seres humanos en el intervalo de ≥ 1 mg/día/75 kg de peso corporal a ≤ 1000 mg/día/75 kg de peso corporal, preferentemente en el intervalo de ≥ 10 mg/día/75 kg de peso corporal a ≤ 500 mg/día/75 kg de peso corporal, preferentemente en el intervalo de ≥ 30 mg/día/75 kg de peso corporal a ≤ 100 mg/día/75 kg de peso corporal, de manera especialmente preferente en el intervalo de ≥ 30 mg/día/75 kg de peso corporal a ≤ 50 mg/día/75 kg de peso corporal.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse en formas de realización ventajosas en particular para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico, el diagnóstico y/o la terapia de enfermedades, que están relacionadas con un plegamiento erróneo de proteínas. Entre estas enfermedades figuran por ejemplo enfermedades por priones y/o enfermedades degenerativas crónicas en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas.

Por la expresión "plegamiento erróneo de proteínas" se entiende en el sentido de la invención que las proteínas pueden estar plegadas de manera errónea o mal procesadas.

De manera ventajosa los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse para el tratamiento de organismos, tejidos y/o células vegetales y/o animales. En particular los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse para el tratamiento de mamíferos por ejemplo del ser humano.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden influir positivamente en un plegamiento erróneo de proteínas. En particular se descubrió sorprendentemente que formas de realización preferidas de los compuestos pueden reducir la cantidad de proteínas priónicas de plegamiento erróneo existentes en modelos de cultivo celular. De manera ventajosa los compuestos de acuerdo con la invención pueden mostrar en experimentos una mayor eficacia en el caso de la influencia de un plegamiento erróneo de proteínas, que los compuestos conocidos hasta el momento. En particular los compuestos de acuerdo con la invención pueden mostrar también una mayor eficacia que combinaciones de las sustancias conocidas hasta el momento.

Una ventaja especial de los compuestos de acuerdo con la invención puede realizarse por que mediante la administración de los compuestos de acuerdo con la invención puede prolongarse el tiempo desde una infección hasta la aparición de la enfermedad y/o puede prolongarse la supervivencia después de la aparición de la enfermedad.

Es especialmente ventajoso que los compuestos de acuerdo con la invención pueden llevar también en el caso de enfermedad avanzada o clínica a una disminución de las proteínas de plegamiento erróneo, en particular proteínas priónicas.

De los compuestos de acuerdo con la invención (e.V.) se determinó experimentalmente que reducen la concentración de colesterol en la superficie celular. Por lo tanto resultan también aplicaciones de los e. V. sobre trastornos del metabolismo lipídico/del colesterol. Además de las acridinas y fenotiazinas se conoce un efecto anti-parasitario/anti-protozoario. Este efecto se consigue así mismo por los e.V. y resultan por lo tanto aplicaciones en la

5

terapia de protozoos y enfermedades por parásitos. En particular se supone que los compuestos de acuerdo con la invención pueden mostrar un efecto positivo en el tratamiento de tripanosomas.

Sin estar ligado a una teoría particular, se supone además que los compuestos de acuerdo con la invención pueden tener un efecto positivo en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad de Alzheimer, y en particular pueden

10

mostrar un efecto positivo para la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

De manera correspondiente un objetivo adicional de la invención se refiere al uso de los compuestos de acuerdo con la invención, preferentemente de fórmula general (10) y (14), para la producción de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades, seleccionadas del grupo que comprende:

15

- enfermedades, que están relacionadas con un plegamiento erróneo de proteínas, tales como enfermedades por priones y/o enfermedades degenerativas crónicas, en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas,
- enfermedades, que están relacionadas con un aumento del colesterol en la sangre,
- enfermedades, que están relacionadas con una alteración del metabolismo lipídico y/o hiperlipidemias,
- enfermedades, que están relacionadas con una inflamación, tales como inflamaciones crónicas,
- enfermedades cardiovasculares en particular arteriosclerosis, y/o
- infecciones provocadas por parásitos en animales y plantas, en particular seres humanos y animales útiles, enfermedades provocadas por protozoos y/o por gusanos, en particular infecciones cerebrales provocadas por parásitos y/o protozoos.

20

25

Las enfermedades por priones pueden seleccionarse en particular del grupo que comprende enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, insomnio familiar mortal (FFI), kuru, escrapia y/o encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

30

Enfermedades degenerativas crónicas, en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas, se seleccionan preferentemente del grupo que comprende enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, diabetes de tipo I y tipo II, autismo, esquizofrenia, enfermedades bipolares, depresión, enfermedades de poliglutamina, demencia frototemporal, tauopatías, atropia sistémica múltiple, trastornos del sueño, discrasia de células plasmáticas, polineuropatía amiloidótica familiar, carcinoma tiroideo medular, insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardiaca congestiva, amiloidosis tal como amiloidosis cardiaca, amiloidosis sistémica y/o amiloidosis familiar.

35

Las enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas preferidas se seleccionan del grupo que comprende enfermedad de Alzheimer, demencia frototemporal, enfermedad de Parkinson, tauopatías, atropia sistémica múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esquizofrenia, enfermedades bipolares, depresión, enfermedades de poliglutamina, esclerosis múltiple y/o trastornos del sueño.

40

En particular en el caso del tratamiento de enfermedades neurodegenerativas del ser humano, mediante el uso de los compuestos de acuerdo con la invención puede conseguirse un efecto ventajoso sobre el desarrollo de la enfermedad, en particular puede reducirse la aparición de proteínas de plegamiento erróneo. Una ventaja adicional de los compuestos de acuerdo con la invención puede resultar por que éstos pueden utilizarse en menores dosificaciones. Además esto puede llevar a que no aparezca ningún efecto secundario o sólo pocos efectos secundarios. Esto permite que los compuestos de acuerdo con la invención puedan administrarse durante un periodo de tiempo más largo. Esto permite por ejemplo una administración para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, cuya terapia en determinadas circunstancias debe continuarse durante meses o años.

45

50

En formas de realización especialmente ventajosas, los compuestos de acuerdo con la invención pueden llevar a una disminución del colesterol en la sangre. Esto permite por ejemplo un uso en trastornos del metabolismo lipídico o hiperlipidemias. Además los compuestos pueden mostrar también un efecto antiinflamatorio y pueden usarse para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades cardiovasculares, en particular para la profilaxis de la arteriosclerosis.

55

Además, los compuestos son ventajosos también para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de malaria y otras infecciones provocadas por parásitos en seres vivos, animales y plantas, en particular animales útiles y el ser humano, tal como malaria, tripanosomiasis, enfermedad del sueño, amebiasis, leishmaniosis y/o toxoplasmosis. También puede emplearse un uso como agentes antiprotozoarios y/o como antihelmínticos por ejemplo contra nemátodos tales como gusano vermicular (*Enterobius*), ascáride (*Ascaris*), ascáride canina y felina (*Toxocara*), tricocéfalo (*Trichuris*), anquilostoma (*Nacator*, *Anchilostoma*), lombriz (*Spobngiloides*), gusano de Guinea (*Dracunculus*), o filarias, cestodos, y/o trematodos.

60

65

Una gran ventaja en el caso del uso de los compuestos de acuerdo con la invención, preferentemente de fórmula (10) puede realizarse por que éstos presentan una mejor accesibilidad de la barrera hematoencefálica y en particular en el caso de parásitos y/o infecciones por protozoos cerebrales tales como malaria cerebral, toxoplasmosis y/o abscesos cerebrales pueden mostrar una eficacia mejorada.

5 Sin estar ligado a una teoría particular, se supone además que los compuestos de acuerdo con la invención, preferentemente de fórmula (10), pueden mostrar un efecto inhibitor sobre la denominada resistencia a múltiples fármacos (MDR) proteínas tales como la glicoproteína P, de modo que puede ponerse a disposición una eficacia y una biodisponibilidad más efectiva en comparación con sustancias conocidas.

10 De manera ventajosa los compuestos de acuerdo con la invención pueden presentar una toxicidad sólo menor o despreciable en el caso de la administración. Esto permite por ejemplo la administración en altas dosificaciones, en particular la administración unitaria y/o repetida, limitada en el tiempo en dosificaciones en el intervalo de ≥ 10 mg/día/75 kg de peso corporal a ≤ 1000 mg/día/75 kg de peso corporal, por ejemplo durante un periodo de tiempo de al menos tres meses. La toxicidad baja o despreciable de los compuestos de acuerdo con la invención permite también una administración en una denominada terapia pulsátil. A este respecto pueden administrarse dosificaciones en el intervalo de ≥ 10 mg/día/75 kg de peso corporal a ≤ 1000 mg/día/75 kg de peso corporal por ejemplo durante en cada caso una semana, preferentemente al menos dos veces durante una semana, de manera interrumpida por un periodo de tiempo sin administración. Una administración de este tipo puede mejorar adicionalmente el efecto positivo de los compuestos sobre proteínas de plegamiento erróneo.

Un objeto adicional de la invención se refiere a fármacos que comprenden compuestos de acuerdo con la invención, preferentemente que comprenden compuestos de fórmulas (10) y (14).

25 Los fármacos que comprenden compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse para el tratamiento *in vivo* e *in vitro*. Un uso preferido de los fármacos que comprenden compuestos de acuerdo con la invención son el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades, que están relacionadas con un plegamiento erróneo de proteínas, tales como enfermedades por priones y/o enfermedades degenerativas crónicas, en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas.

30 Un objeto adicional de la invención se refiere a agente anti-priones que comprenden compuestos de acuerdo con la invención, preferentemente compuestos de fórmula (10).

35 La expresión "agente anti-priones" tienen en el sentido de esta invención el significado de que el agente que comprende compuestos de acuerdo con la invención puede influir positivamente en enfermedades por priones. En particular puede disminuirse la cantidad de proteínas priónicas de plegamiento erróneo que aparecen (PrPSc).

40 En formas de realización preferidas, el uso de los compuestos de acuerdo con la invención puede llevar a que en los medios examinados, células, tejidos y/u órganos disminuya la cantidad de proteínas de plegamiento erróneo existentes, en particular proteínas priónicas (PrPSc) y/o pueda evitarse completamente o casi completamente una aparición de proteínas de plegamiento erróneo.

45 Los compuestos de acuerdo con la invención pueden mostrar por ejemplo en experimentos que éstos son en comparación más activos que sustancias conocidas o también sus combinaciones. De este modo los compuestos de acuerdo con la invención pueden llevar a que disminuya la cantidad de proteínas priónicas de plegamiento erróneo presentes en mayor medida que en el caso de una administración de sustancias conocidas individuales o su combinación.

50 Se describe el uso de compuestos de acuerdo con la invención preferentemente de compuestos de fórmula general (10), para la purificación de fluidos biológicos, en particular fluidos corporales, que contienen proteínas de plegamiento erróneo preferentemente priones, en particular de suspensiones celulares. Los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse en particular para la purificación de fluidos biológicos contaminados con proteínas de plegamiento erróneo, preferentemente priones.

55 El término "purificación" tiene en este caso el significado de que en los fluidos biológicos disminuye la cantidad de proteínas de plegamiento erróneo después de una adición de los compuestos de acuerdo con la invención, en particular el término "purificación" puede entenderse en el sentido de esta invención en el significado de los términos "*clearing*" o "*clearance*". En particular, los compuestos de acuerdo con la invención pueden llegar en formas de realización especialmente ventajosas a una eliminación completa o casi completa de las proteínas de plegamiento erróneo.

Las suspensiones celulares pueden ser por ejemplo líquido ceforraquídeo, preferentemente las suspensiones celulares se seleccionan del grupo que comprende sangre y/o productos de la sangre.

65 En este sentido los fluidos pueden extraerse del organismo y los compuestos de acuerdo con la invención se añaden fuera del organismo, o los compuestos de acuerdo con la invención pueden añadirse a los fluidos, sin que éstos se

extraigan del organismo.

Así mismo se describe un procedimiento para la purificación de fluidos biológicos que contienen las proteínas de plegamiento erróneo, preferentemente priones, añadiéndose compuestos de acuerdo con la invención, preferentemente de fórmula (10) y (14), al fluido biológico a purificar, en particular suspensiones celulares tales como sangre o productos de la sangre. De manera opcional, los compuestos pueden separarse por ejemplo mediante cromatografía, diálisis y/o adsorción, después de una incubación de nuevo a partir del fluido biológico a purificar.

En formas de realización ventajosas adicionales del procedimiento, el fluido biológico puede examinarse antes y después de la adición de los compuestos de acuerdo con la invención mediante métodos adecuados para determinar la cantidad de proteínas de plegamiento erróneo contenidas.

En formas de realización ventajosas del procedimiento, el fluido biológico a purificar, en particular suspensiones celulares tales como sangre o productos de la sangre, pueden extraerse del organismo en primer lugar por ejemplo mediante punción y después de la purificación pueden añadirse de nuevo al organismo, por ejemplo mediante una plasmaféresis.

En formas de realización especialmente ventajosas del procedimiento para la purificación de fluidos biológicos tales como suspensiones celulares, en particular sangre, éste comprende las siguientes etapas:

- a) extracción opcional del fluido biológico de un organismo, por ejemplo mediante punción;
- b) incubación de los fluidos biológicos con los compuestos de acuerdo con la invención;
- c) opcionalmente separación de los compuestos, por ejemplo mediante cromatografía, diálisis y/o adsorción;
- d) opcionalmente añadir de nuevo el fluido biológico, por ejemplo mediante una plasmaféresis.

Los fluidos pueden almacenarse alternativamente por ejemplo en forma de conservas de sangre y/o añadirse en un momento posterior al organismo, del que se extrajeron o a uno distinto.

Ejemplos y figuras que sirven para ilustrar la presente invención se indican a continuación.

En las figuras muestra:

la figura 1 inmunotransferencias de tipo Western de lisados celulares diluidos con proteasa K de células ScNa2, que muestran bandas de la proteína priónica de plegamiento erróneo. Sc representa en este sentido el control negativo de células no tratadas, que muestran claramente bandas de la proteína priónica de plegamiento erróneo, Q representa células tratadas con quinacrina con 1 μ M como control positivo, que no muestran ninguna banda de la proteína de plegamiento erróneo. Puede apreciarse que en el caso de cultivos celulares que se incubaron con una concentración de 0,1 μ M y 0,3 μ M del compuesto de fórmula (10), no pudo detectarse en los lisados ninguna proteína priónica de plegamiento erróneo, mientras que las células tratadas con la concentración idéntica de quinacrina contenían aún proteínas priónicas de plegamiento erróneo.

Ejemplo 1

Producción de (6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-(4-{4-[3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-piperazin-1-il}-butil)-amina

Na(OAc)₃BH₃ (171 mg, 0,80 mmol) se añadieron a una disolución de 3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propionaldehído (100 mg, 0,40 mmol) y N-(3-cianopropil)-piperazina (122 mg, 0,80 mmol) en CH₂Cl₂ (10 ml). Después de 16 horas de agitación se diluyó la mezcla con CH₂Cl₂ (50 ml) y se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se evaporó. La purificación por medio de cromatografía ultrarrápida del residuo obtenido dio N-[3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-N'-(3-cianopropil)-piperazina (rendimiento: 106 mg, 68 %).

N-[3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-N'-(3-cianopropil)-piperazina (60 mg, 0,15 mmol) se disolvió en diétil éter seco (Et₂O) (5 ml) y se mezcló con LiAlH₄ (1,0 M en Et₂O, 0,15 ml, 0,15 mmol) a 0 °C. Después de un tiempo de reacción de 3 horas se añadieron 3 gotas de NaOH 0,5 N y se filtró la mezcla a través de gel de sílice (Celite®, 521 AW) y MgSO₄. La evaporación del disolvente dio 48 mg de N-[3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-N'-(3-aminopropil)-piperazina, que se disolvió con ligero calentamiento en fenol (1,5 g). La adición de 6,9-dicloro-2-metoxiacridina (70 mg, 0,25 mmol) estuvo seguida por 1 hora de agitación a 100 °C. La posterior adición de NaOH acuoso, extracción con EtOAc y evaporación de la fase orgánica dio (6-cloro-2-metoxi-acridin-9-il)-(4-{4-[3-(10,11-dihidro-dibenzo[b,f]azepin-5-il)-propil]-piperazin-1-il}-butil)-amina, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, con un rendimiento del 21 %.

Ejemplo 2

Aislamiento y purificación de un anticuerpo de gallina anti-proteína priónica de ratón policlonal

Aislamiento de inmunoglobulina:

- 5 Se recogieron huevos de gallinas inmunizadas con proteína priónica de ratón recombinante (recMoPrP). Las yemas de huevo se diluyeron en la relación 1 : 5 en disolución de acetato de sodio 20 mM fría, pH 5,2, y se mantuvieron durante la noche a 4 °C. Después de eliminar el material no soluble mediante centrifugación (20.000 x g, 20 min) se precipitó la inmunoglobulina mediante adición (NH₄)₂SO₄ al 20 % (p/v) y después de 2 horas se centrifugó a 4 °C (20.000 x g, 20 min). La inmunoglobulina granulada se disolvió en una disolución de Tris 20 mM, pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1 %, EDTA 1 mM.

Purificación:

- 15 Proteína priónica de ratón recombinante (recMoPrP) se disolvió en una suspensión de Sepharose activada con NHS (Amersham Pharmacia, lavado previamente de manera correspondiente de acuerdo con las instrucciones del protocolo del fabricante) en una disolución fría (4 °C) de NaHCO₃ 50 mM, pH 8,3, Triton X-100 1 %, DMSO al 20 % para dar 3 mg de proteína por ml de resina. Esta suspensión se agitó durante la noche a 4 °C. Los grupos NHS libres se bloquearon a continuación con glicina 50 mM (1 hora, temperatura ambiente). La resina se lavó entonces sucesivamente con disoluciones de Tris 50 mM, pH 8, glicina 50 mM pH 3, y por último Tris 20 mM pH 8, NaCl 150, Triton al 0,2 % X100, Tween-20 al 0,2 %, EDTA 2 mM. En este tampón se mezcló proteína priónica de ratón recombinante inmovilizada (recMoPrP) con inmunoglobulina de proteína priónica anti-ratón (aproximadamente 200 mg de inmunoglobulina por mg de proteína priónica de ratón) y se agitó durante la noche a 4 °C. La resina se recogió entonces y se lavó exhaustivamente, y a continuación se eluyó con una disolución de glicina 100 mM pH 3, NaCl 1 M, Triton X-100 al 1 %, ajustándose el valor de pH inmediatamente a continuación a pH 8. La inmunoglobulina anti-proteína priónica de ratón purificada se marcó entonces peroxidasa del rábano activada con EZ-Link™ maleimida (HRP) (Pierce Chemical, Rockford, Ill.) de manera correspondiente a las instrucciones del protocolo del fabricante.
- 30 Este anticuerpo reconoce únicamente la forma no glicosilada y monoglicosilada de la proteína priónica, que corresponde a la proteína priónica de plegamiento erróneo, pero no la forma diglicosilada.

Ejemplo 3

- 35 Ensayos de cultivo celular con compuestos de fórmulas (12), (13) y (14)

Células de neuroblastoma de ratón (N2a) se infectaron con priones de escarpia adaptados de ratón y se subclonaron (Bosque, P. J. y S. B. Prusiner (2000) "Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection" J Virol 74(9): 4377-86) y se cultivaron. Placas de cultivo celular confluentes de 10 cm se fraccionaron, se añadió en cada caso una gota 2-5*10⁴ de las células de neuroblastoma de ratón (ScN2a) infectadas priones de escarpia adaptados a ratón en cada caso en una placa de cultivo celular de 60 mm y se cultivaron con 4 ml de MEM (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) que contenía un 10 % (vol/vol) de suero bovino fetal (FCS), penicilina-estreptomina (100 unidades/ml) y L-glutamina (2 mM) durante unas semanas con 0,1 μM, 0,5 μM y 1 μM del compuesto (12) y (14) y 0,1 μM y 0,5 μM del compuesto (13). Durante esta semana se cambió cada segundo día el medio y se añadió al medio la cantidad correspondiente del compuesto sometido a ensayo.

Después de 7 días se lavaron las células una vez con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) y se lisaron en tampón de lisina (Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,5 %, desoxicolato 0,5 %). Los lisados se digirieron a continuación con proteinasa K (Merck, Darmstadt) (20 μg/ml, 30 min, 37 °C) y se detuvo la reacción con PMSF 2 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). A continuación se centrifugaron los lisados digeridos (45 min, 4 °C, 100.000 g), se extrajo el sobrenadante y se llevaron los gránulos a tampón de carga de gel (Tris-Cl 100 mM pH 6,8, SDS al 4 % (p/v), azul de bromófenol 0,2 % (p/v), glicerol al 20 % (v/v), β-mercaptoetano 200 mM). Las muestras se separaron sobre un gel de SDS (4-20 %, Biorad) y se detectó la proteína priónica con 0,3 μg/ml del anticuerpo de acuerdo con el ejemplo 2 por medio de inmunotransferencia de tipo Western (Enhanced Chemiluminescence (ECL) System, Amersham Pharmacia).

Como control negativo sirvieron células de neuroblastoma de ratón infectadas con priones de escarpia adaptados a ratón, que no se trataron con quinacrina, como control positivo sirvieron células que se trataron en las condiciones de ensayo con 1 μM de la sustancia anti-priones conocida quinacrina.

60 La forma de plegamiento erróneo de la proteína priónica no se alteró mediante el tratamiento con proteinasa K y pudo detectarse en la inmuno transferencia de tipo Western.

65 Se mostró que los compuestos (12), (13) y (14) mostraban una eliminación de la proteína priónica de plegamiento erróneo en las células infectadas, mostrando los compuestos (12) y (13) una mayor eficacia que el compuesto (14).

Ejemplo 4

De manera correspondiente a las condiciones del ejemplo 3 se incubaron y se trataron células de neuroblastoma de ratón infectadas con priones de escarpia adaptados a ratón con 0,05 μM , 0,075 μM , 0,1 μM y 0,3 μM del compuesto de fórmula (10) y se detectaron las proteínas priónicas de plegamiento erróneo en la inmunotransferencia de tipo Western.

Como control negativo sirvieron células de neuroblastoma de ratón infectadas con priones de escarpia adaptados a ratón, que no se trataron con quinacrina, como control positivo sirvieron células que se trataron en las condiciones de ensayo con 1 μM de la sustancia anti-priones conocida quinacrina. Como comparación sirvieron células que se trataron con quinacrina 0,1 μM y 0,3 μM .

Se mostró que, en el caso de cultivos celulares que se incubaron con una concentración de 0,1 μM y 0,3 μM del compuesto de fórmula (10), en los lisados no pudo detectar ninguna proteína priónica de plegamiento erróneo, mientras que las células tratadas con la concentración idéntica de quinacrina contenían aún proteínas priónicas de plegamiento erróneo. El compuesto (10) se mostró aproximadamente 10 veces más activo que quinacrina.

La inmunotransferencia de tipo Western representada en la figura 1 sirve para ilustrar los resultados de ensayo del ejemplo 4.

Ejemplo 5

Tinción con filipina

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos y se trataron tal como se describe en los ejemplos 3 y 4 con compuesto (10) 0,25 μM y quinacrina 1 μM . En el sexto día del tratamiento se lavaron las células una vez con PBS helado (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM). A continuación siguió la fijación de las células con paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Después se extrajo la disolución de paraformaldehído y se incubaron las células con filipina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, Sigma) durante 30 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron 4 veces con PBS y se examinaron bajo el microscopio con los conjuntos de filtros correspondientes. La tinción con filipina detecta colesterol celular.

Se mostró que en el caso de células (ScN2a) no tratadas el colesterol puede encontrarse principalmente en la superficie celular. En el caso de las células tratadas con el compuesto (10) se mostró una redistribución en compartimentos intracelulares, al igual que en el caso de las células tratadas con quinacrina. Esto muestra el efecto de los compuestos sobre el colesterol.

Ejemplo 6

Ensayos de actividad *in vivo* en un modelo de ratón

El efecto del compuesto de acuerdo con la fórmula (10) sobre una infección por priones *in vivo* se examinó en un modelo de ratón de las enfermedades por priones.

Se usaron ratones transgénicos (TG 20, Fischer y col., 1996, EMBO Journal Vol. 15, pág. 1255-64), que además del gen de PrP de ratón endógena sobreexpresan la proteína PrP de ratón endógena. Estos ratones tienen un tiempo de incubación reducido de priones de 92 ± 4 días, porque multiplican priones debido a la alta concentración de proteína priónica (PrPC) en el cerebro especialmente rápido, de modo que es necesaria una acción contra esta conversión acelerada.

Estos ratones se inocularon tres semanas antes del inicio de los ensayos por vía intracerebral con 100 μl de una homogeneizado de cerebro que contenía RML-escarpia diluido 10^{-5} (Chandler, Lancet, 1961, Vol. 1, pág. 1378-79). Al inicio de los ensayos se dificulta por lo tanto ya un efecto positivo, porque pueden haberse producido ya efectos neurotóxicos y/o daños cerebrales subclínicos.

El compuesto de acuerdo con la fórmula (10) se disolvió en primer lugar en etanol y entonces se diluyó en aceite de cardo en una concentración final de 10 mg/ml. El compuesto se aplicó por sonda gástrica ("*gavage*") a un grupo de 11 ratones tres veces por semana (lunes/ miércoles/ viernes) durante ocho semanas en una dosis de 2 mg/200 $\mu\text{l}/\text{ratón}$.

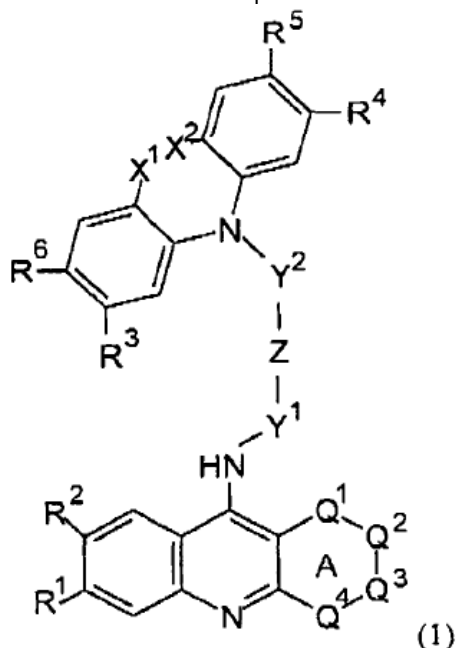
Un grupo control de ratones que no se trataron con el compuesto de acuerdo con la fórmula (10), murieron de manera correspondiente después de 92 ± 4 días de la enfermedad por priones, mientras que los ratones que se trataron con el compuesto de acuerdo con la fórmula (10), no murieron hasta después de 100 ± 5 días.

Por lo tanto pudo establecerse una prolongación de la supervivencia del 10 %, determinado por medio de la prueba t de Student ($p < 0,0001$), en las condiciones de ensayo. Estas condiciones coinciden con la situación clínica en la que los pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt Jakob buscan ayuda médica sólo en el estado avanzado.

5

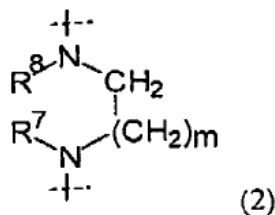
REIVINDICACIONES

1. Compuestos de acuerdo con la fórmula general (1) tal como se indica a continuación y/o sus enantiómeros, diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



5 en la que:

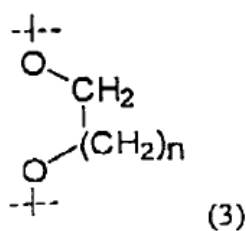
- A es un anillo de seis miembros, insaturado o parcialmente saturado;
 Q¹, Q², Q³, Q⁴ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende CH, C-halógeno, C-O-alquilo (C₁-C₁₀), C-CF₃, C-CN y/o CH₂;
 R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₁-C₁₀, alquinilo C₁-C₁₀, alquilo xilo C₁-C₁₀, CF₃, NH₂, NHR⁹, seleccionándose el resto R⁹ del grupo que comprende alquilo C₁-C₁₀ y/o acilo C₁-C₁₀, NO₂ y/o CN;
 X¹, X² son en cada caso H, o
 X¹ y X² forman juntos X, donde:
 X se selecciona del grupo que comprende CH₂, CH₂-CH₂, CH=CH y/u O;
 Y¹, Y² son en cada caso independientemente entre sí alquilo C₁-C₁₀ no ramificado o ramificado;
 Z es un elemento estructural Z¹ o Z² tal como se indica a continuación, donde: Z¹ presenta la siguiente fórmula general (2):



20 en la que:

- m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6,
 R⁷, R⁸ se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende H, alquilo C₁-C₁₀, formando R⁷ y R⁸ dado el caso a través de un grupo CH₂-CH₂ un anillo, y/o acilo C₁-C₁₀;

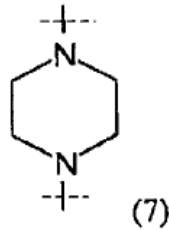
25 Z² presenta la siguiente fórmula general (3):



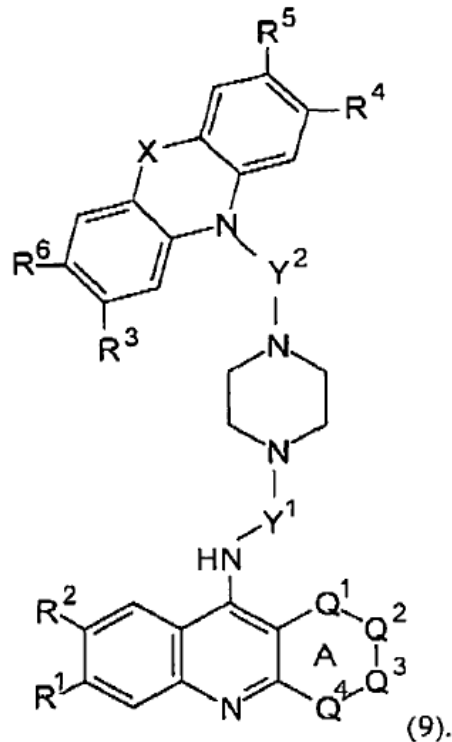
en la que:

n es 2, 3, 4, 5 o 6.

- 5 2. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados por que** Z¹ presenta la siguiente fórmula general (7):



- 10 3. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizados por que** los compuestos presentan la fórmula general (9) tal como se indica a continuación y/o sus enantiómeros, diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



- 15 4. Compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados por que**

Q¹, Q³, Q⁴ son en cada caso CH y
Q² se selecciona del grupo que comprende CH y/o C-O-CH₃.

- 20 5. Compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados por que**

Q¹, Q², Q³, Q⁴ son en cada caso CH₂.

- 25 6. Compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados por que**

Y¹, Y² se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende -(CH₂)_o- y/o -CH (CH₃)-(CH₂)_p-, donde:

- 30 o es 2, 3, 4, 5 o 6;
p es 2, 3, 4 o 5.

7. Compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados por que**

5 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H, halógeno, preferentemente seleccionado del grupo que comprende F, Cl y/o Br, NH_2 , NHR^9 , seleccionándose el resto R^9 del grupo que comprende alquilo C_1-C_5 y/o acilo C_1-C_5 , NO_2 , alquilo C_1-C_5 , preferentemente seleccionado del grupo que comprende metilo, etilo, isopropilo y/o terc-butilo, y/o alquioxilo C_1-C_5 , preferentemente seleccionado del grupo que comprende -O-metilo, -O-etilo, -O-isopropilo y/o -O-terc-butilo.

8. Compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados por que**

10 X es $-CH_2-CH_2-$.

9. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizados por que**

15 Y^1, Y^2 se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende $-(CH_2)_o-$ y/o $-CH(CH_3)-(CH_2)_p-$, donde:

o es 2, 3, 4, 5 o 6;
p es 2, 3, 4 o 5.

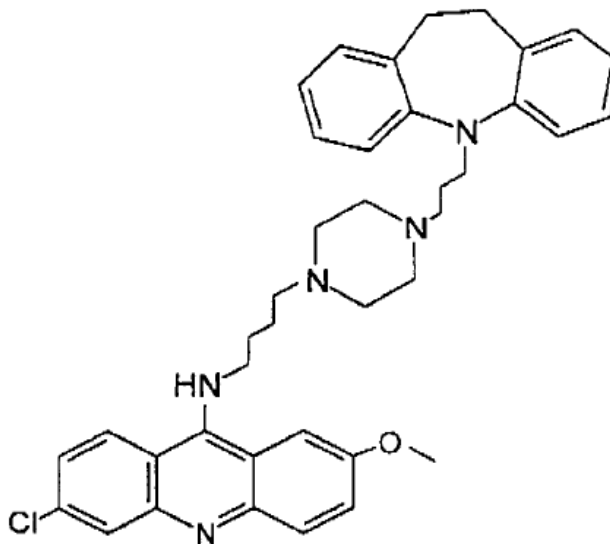
20 10. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizados por que**

Y^1, Y^2 son en cada caso independientemente entre sí $-(CH_2)_o-$, donde:

25 o es 3, 4 o 5.

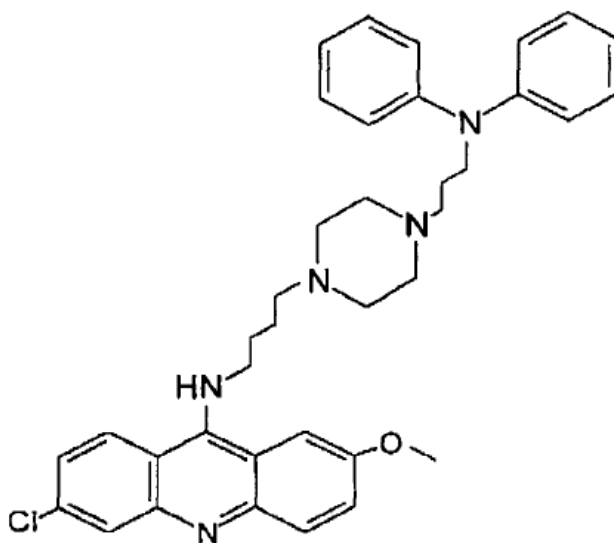
11. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizados por que** $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ se seleccionan en cada caso independientemente entre sí del grupo que comprende H y/o Cl.

30 12. Compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** la fórmula indicada a continuación (10) y/o sus enantiómeros, diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



(10).

35 13. Compuesto de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** la fórmula indicada a continuación (14) y/o sus enantiómeros, diastereómeros así como sus sales farmacéuticamente aceptables:



(14).

14. Uso de compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para la producción de un fármaco.
- 5 15. Uso de compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, preferentemente de fórmula (10), para la producción de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de enfermedades seleccionadas del grupo que comprende:
- 10 - enfermedades, que están relacionadas con un plegamiento erróneo de proteínas, tales como enfermedades por priones y/o enfermedades degenerativas crónicas, en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas,
- enfermedades, que están relacionadas con un aumento del colesterol en la sangre,
- enfermedades, que están relacionadas con una alteración del metabolismo lipídico y/o hiperlipidemias,
- 15 - enfermedades, que están relacionadas con una inflamación, tales como inflamaciones crónicas,
- enfermedades cardiovasculares en particular arteriosclerosis, y/o
- infecciones provocadas por parásitos en animales y plantas, en particular seres humanos y animales útiles, enfermedades provocadas por protozoos y/o por gusanos, en particular infecciones cerebrales provocadas por parásitos y/o protozoos.
- 20 16. Uso de compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado por que** las enfermedades por priones se seleccionan del grupo que comprende enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, insomnio familiar mortal, kuru, escrapia y/o encefalopatía espongiiforme bovina.
- 25 17. Uso de compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado por que** las enfermedades degenerativas crónicas en particular enfermedades neurodegenerativas y/o neuropsiquiátricas se seleccionan del grupo que comprende enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, diabetes de tipo I y tipo II, autismo, esquizofrenia, enfermedades bipolares, depresión, enfermedades de poliglutamina, demencia frontotemporal, tauopatías, atropía sistémica múltiple, trastornos del sueño, discrasia de células plasmáticas, polineuropatía
- 30 amiloidótica familiar, carcinoma tiroideo medular, insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, amiloidosis tal como amiloidosis cardíaca, amiloidosis sistémica y/o amiloidosis familiar.
- 35 18. Uso de compuestos de acuerdo con la reivindicación 15, **caracterizado por que** las infecciones provocadas por parásitos se seleccionan del grupo que comprende malaria, tripanosomiasis, enfermedad del sueño, amebiasis, leishmaniasis y/o toxoplasmosis.
19. Fármaco que comprende compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, preferentemente de fórmula (10).
- 40 20. Agente anti-priones que comprende compuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, preferentemente de fórmula (10).

Fig. 1

