(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 705**

(51) Int. CI.:

C07D 417/06 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2011 PCT/EP2011/064893**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12031941**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11755294 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2614060**

(54) Título: **Tietilperazina para el tratamiento de una beta-amiloidopatía o alfa-sinucleopatía**

(30) Prioridad:

07.09.2010 DE 102010044561

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2017

(73) Titular/es:

IMMUNGENETICS AG (100.0%)
Gerhart-Hauptmann-Strasse 23
18055 Rostock, DE

(72) Inventor/es:

PAHNKE, JENS, PROF.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Tietilperazina para el tratamiento de una beta-amiloidopatía o alfa-sinucleopatía

La acumulación de proteínas o fragmentos de proteínas (péptidos) en el cerebro es una característica significativa de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. En el caso de la demencia de Alzheimer (enfermedad de Alzheimer, AD) y de la angiopatía β-amiloide cerebral (CAA) es desencadenante de la enfermedad la agregación de péptidos β-amiloide (Aβ), no siendo conocido el mecanismo subyacente. La Aβ-proteostasia, es decir el equilibrio de producción y degradación/transporte por medio de receptores o proteasas, se ve alterado en caso de la AD y CAA. Sin embargo, a la separación de los péptidos Aβ mediante transportadores celulares (transportadores ABC) se le ha concedido hasta ahora poca atención. En el caso de la enfermedad de Parkinson (enfermedad de Parkinson) se acumula la proteína α-sinucleína, que entre otras cosas regula la distribución de dopamina en la sustancia negra. En el caso de la α-sinucleinopatía enfermedad de Parkinson se sabe que los transportadores ABC desempeñan un papel decisivo para el transporte (Kortekaas *et al.*, Ann Neurol 2005, 57, 176-179). Según esto existen varias subfamilias A-G, que pueden transportar distintos sustratos de manera bidireccional (metabolitos, fármacos, péptidos, proteínas, iones) e incluso pueden cambiarse de manera recíproca en la función de transporte (por ejemplo ABCB1 y ABCC1, Tao *et al.* Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 64, 5, 961-969).

El documento WO2008/092898A1 describe una combinación de dos principios activos para el tratamiento de enfermedades que se producen mediante agregación de proteínas. En el caso de uno de los principios activos se trata de un derivado de fenotiazina, no incluyéndose tietilperazina. El documento WO96/04915A1 describe el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer por medio de derivados de fenotiazina o tioxantenos, no incluyéndose tietilperazina. El documento WO2008/133884A2 describe el tratamiento de una pluralidad de enfermedades neurodegenerativas con una pluralidad de principios activos. En el caso de uno de los principios activos se trata de tietilperazina. Sin embargo, todos los datos experimentales se refieren a la enfermedad de Huntington.

Por medio de distintos modelos de ratón modificados mediante ingeniería genética pudo mostrarse que el transportador ABC (el elemento estructural conjunto de los transportadores ABC es un casete de unión a ATP y un poro de transporte), ABCC1, es un importante transportador de proteínas/péptidos, en particular transportador de Aβ, que tiene efectos funcionales extraordinarios sobre la acumulación de proteínas cerebral. ABCC1 es además un importante transportador de α-sinucleína.

A continuación se describen los estudios con respecto a la actividad de transportadores a modo de ejemplo en el transporte de Aβ.

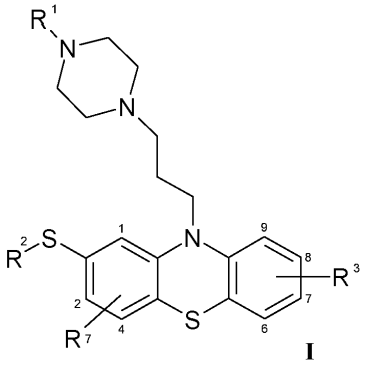
Para la determinación de la actividad de ABCC1 *in vivo* se separó mediante ingeniería genética en ratones transgénicos que expresan APP en cada caso el transportador ABCB1, el transportador ABCG2 o el transportador ABCC1 (ratones knockout).

A este respecto se encontró que:

i) la cantidad de Aβ en los ratones a los que les faltan el transportador ABCC1 había aumentado 12 veces,
ii) la pérdida de transportador ABCB1 conduce solo a un aumento de 3 veces y
iii) la pérdida de ABCG2 no tiene ningún efecto de acumulación de Aβ.

Por tanto era objetivo de la presente invención facilitar sustancias que influyan de manera adecuada en el transportador ABCC1 para poder tratar así enfermedades neurodegenerativas, en particular β-amiloidopatías o α-sinucleinopatías. Este objetivo se solucionó con la 2-(R^2-tio)-10-[3-(4-R^1-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina de acuerdo con la reivindicación 1. Otras formas de realización preferentes resultan de las reivindicaciones dependientes.

En otras palabras se solucionó el objetivo mediante la 2-(R^2-tio)-10-[3-(4- R^1-piperazin-1-il)propil]-10H-fenotiazina de acuerdo con la fórmula general I



I

en la que el resto R es un grupo metilo, el resto R^2 es un grupo etilo y los restos R^3 y R^7 son hidrógeno, para el tratamiento de una β-amiloidopatía o una α-sinucleinopatía, que van acompañadas de un depósito de proteínas cerebral y una actividad reducida del transportador ABCC1 cerebral.

Además existe tanto en el caso de las α-sinucleinopatías como en el caso de las β-amiloidopatías una necesidad de posibilidades de reconocer o diagnosticar o prediagnosticar estas enfermedades.

Era también objetivo de la memoria descriptiva la facilitación de un procedimiento, con el que pudieran diagnosticarse o prediagnosticarse α-sinucleinopatías como también β-amiloidopatías. Este objetivo se soluciona mediante un procedimiento para el diagnóstico o prediagnóstico de una β-amiloidopatía o α-sinucleinopatía o para la determinación del riesgo de una persona de experimentación de padecer una enfermedad de este tipo, en el que la persona de experimentación toma ya sustancias que se transportan a través del transportador ABCC1 cerebral, que está constituido por las siguientes etapas:

a) determinación de la cantidad de la sustancia ingerida en muestras de líquidos corporales de la persona de experimentación en un momento determinado;
b) repetición de la determinación de la etapa a) en al menos otro momento posterior;
c) comparación de las cantidades determinadas en la etapa a) y b) con cantidades que se habían definido en momentos iguales como características para personas de experimentación, que en el momento de la extracción de la muestras no mostraban ninguna indicación clínica de una β-amiloidopatía o α-sinucleinopatía.

Que la persona de experimentación toma ya al menos una sustancia que se transporta a través del transportador ABCC1 cerebral significa que esta sustancia no debe administrarse en primer lugar. Más bien ésta existe ya en el cuerpo de la persona de experimentación, por ejemplo debido a un tratamiento farmacológico de otra enfermedad. Las muestras de líquidos corporales de la persona de experimentación, que se someten a estudio, son preferentemente muestras de plasma sanguíneo, suero sanguíneo y/o líquido cefalorraquídeo.

La β-amiloidopatía es preferentemente una demencia de Alzheimer, la α-sinucleinopatía es preferentemente la enfermedad de Parkinson. Eventualmente puede ser la α-sinucleinopatía también una demencia por cuerpos de Lewy (DLB). Las sustancias que se transportan a través del transportador ABCC1 cerebral se seleccionan preferentemente de antibióticos (por ejemplo difloxacino, grepafloxacino), fármacos virostáticos/antivirales (por ejemplo saquinavir, ritonavir), antialérgicos/antihistamínicos (por ejemplo cimetidina), fármacos cardiovasculares (por ejemplo verapamilo), antidepresivos (por ejemplo citalopram), antihiperuricémicos (por ejemplo probenecid), citoestáticos (por ejemplo metotrexato, etoposit, edatrexato, ZD1694), vitaminas/análogos de vitaminas (por ejemplo metotrexato, ácido fólico, L-leucovorina), antiflogísticos (por ejemplo indometacina), antiepilépticos (por ejemplo ácido valproico), hormonas/derivados de hormonas (por ejemplo 17β-estradiol), leucotrienos (por ejemplo LTC4), muestras fluorescentes (por ejemplo calceína, Fluo-3, BCECF, SNARF), metabolitos de sustancias naturales (producidos de manera endógena) acoplados con GSH, sulfato o glucurónido, toxinas o de fármacos (por ejemplo 2,4-dinitrofenil-SG, bimane-SG, N-etilmaleimida-SG, doxorubicina-SG, tiotepa-SG, ciclofosfamida-SG, melfalan-SG, clorambucilo-SG, ácido etacrínico-SG, metolaclor-SG, atrazina-SG, sulforafan-SG, aflatoxina B1-epóxido-SG, 4-nitroquinolina 1-óxido-SG, As(SG)3, etoposid-Gluc, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL)-3β-O-Gluc, SN-38-gluc, 4-metilumbelliferil-β-d-gluc, sulfato de 6-hidroxi-5,7-dimetil-2-metilamino-4-(3-piridilmetil)-benzotiazol (E3040S)-Gluc, leucotrieno C4, prostaglandina A2-SG, 15-desoxi-Δ12,14 prostaglandina J2-SG, hidroxinonenal-SG, 17β-estradiol-17-β-d-gluc, glucuronosilbilirrubina, bis-lucuronosilbilirrubina, hidrodesoxicolato-6-α-Gluc, estrona-3-sulfato, sulfato de deshidroepiandrosterona, sulfatolitocolato) (véase también Deeley RG *et al.*: Substrate recognition and transport by multi drug resistance protein 1 (ABCC1), FEBS letters 2006, 580 (4), pág. 1103-1111.)

Este análisis indirecto de la actividad de transportador del transportador ABCC1 puede aprovecharse para el diagnóstico/prediagnóstico de una correspondiente enfermedad. En personas de experimentación que toman ya sustancias que pueden transportarse por ABCC1 de otros modos puede someterse a estudio el perfil de la concentración de principio activo en líquidos corporales, preferentemente plasma sanguíneo, suero sanguíneo y/o

líquido cefalorraquídeo. Una medición temporalmente dependiente muestra para personas de experimentación, en las que existe una actividad de transportador ABCC1 reducida en comparación con personas de experimentación sanas, una curva de concentración de sustancias retardada o desplazada (concentración c trazada con respecto al tiempo t), es decir el máximo de la curva aparece de manera temporalmente modificada.

Cuando resulta una curva desplazada en comparación con el caso sano, esto es una indicación de una actividad modificada del transportador ABCC1. Esto significa que entonces también sustancias tales como Aβ o α-sinucleína se transportan peor y es por consiguiente una indicación de una correspondiente enfermedad.

Tanto los modelos de ratón como también la influencia farmacológica del ABCC1 muestran que éste es un transportador transmembrana celular importante para la proteína Aβ e implican que la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo ocupan una posición clave para la excreción de Aβ fuera del cerebro. Pudo mostrarse que la activación farmacológica selectiva del transportador ABCC1 reduce significativamente la carga cerebral con Aβ y puede usarse así terapéuticamente para el tratamiento de enfermedades con proteostasia cerebral alterada. Además puede aprovecharse el análisis de la actividad de transportador del transportador ABCC1, tal como se ha descrito anteriormente, para el diagnóstico/prediagnóstico indirecto o directo de una correspondiente enfermedad. El análisis directo sería posible por medio de la administración de sustancias que se transportan a través del transportador ABCC1, y su determinación. El análisis indirecto se explicó ya anteriormente.

Las modificaciones de mecanismos de exportación, que se encuentran relacionados con transportadores ABC, pueden influir sustancialmente en el perfil de agregación temporal de Aβ y otras proteínas cerebrales. Como consecuencia de esto repercute positivamente una influencia de la función del transportador ABCC1 sobre el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas, en particular Alzheimer. El “tratamiento de enfermedades neurodegenerativas” comprende en este sentido la profilaxis como también el tratamiento de enfermedades ya existentes.

El papel de los transportadores ABC en la excreción de Aβ se sometió a estudio por primera vez de manera que se determinó que ABCC1 puede transportar Aβ. Para ello se usaron ensayos Transwell *in vitro* con células endoteliales (endothelialcelltranswellassay, ECTA) de células endoteliales capilares primarias, cultivadas de cerebros de ratón (mezcla de cultivo celular):

Los cultivos primarios de células endoteliales de capilares cerebrales de ratones deficientes en ABCB1, deficientes en ABCC1 (knockout) y de ratones control (C57Bl/6, FVB/N) se usaron para someter a estudio la actividad de transporte específica de Aβ. El transporte de Aβ desde el compartimento abluminal (cerebro) hacia el compartimento luminal (sangre) está alterado en endotelios deficientes en ABCB1 y deficientes en ABCC1. La velocidad promedio de transporte de Aβ durante las primeras seis horas tras la administración de péptidos de Aβ (Aβ42) ascendía a 2,2 pg/min para las células control. A diferencia de esto alcanzaron las células deficientes en ABCC1 solo la mitad de la capacidad de transporte (1,0 pg/min). En las células deficientes en ABCB1 apenas estaba presente el transporte de Aβ (0,3 pg/min). Otros estudios de endotelios capilares y células del plexo coroideo dieron como resultado que el transportador ABCB1 se expresa mucho en endotelios capilares cerebrales, mientras que la expresión de ABCC1 endotelial es más baja en capilares cerebrales.

Por medio de modelos de ratón de Alzheimer deficientes en transportadores ABC generados de nuevo se sometió a estudio entonces la significancia relativa de miembros de la familia de transportadores ABC *in vivo*. Los ratones modificados mediante ingeniería genética presentan en cada caso una deficiencia (knock out) de transportadores ABC específicos ABCG2, ABCB1 o ABCC1.

La inmunohistoquímica de Aβ de cortes cerebrales mostró:

i) aumentos significativos en el número cortical y el tamaño de placas positivas para Aβ en ratones deficientes en ABCC1 en comparación con ratones control (véase la figura 1 y 2a-c).
ii) Los ratones deficientes en ABCB1 mostraron un aumento más bajo del número y tamaño de placas de Aβ que ratones deficientes en ABCC1.
iii) Entre los ratones control y los ratones deficientes en ABCG2 no pudo detectarse ninguna diferencia significativa (figura 2a-c).

Para la determinación de la cantidad de Aβ soluble en tampón (en su mayor parte monómeros y oligómeros más pequeños) y de Aβ soluble en guanidina (en su mayor parte material fibrilar o agregado) se usaron ensayos de inmunoadsorción acoplado a enzimas (Enzyme-linkedimmunoabsorbentassays, ELISAs) para Aβ.

De acuerdo con los resultados morfológicos de la inmunohistoquímica mostraron los ratones deficientes en ABCC1 un aumento significativo en caso de Aβ agregado en comparación con los ratones control en todos los momentos de medición. La carga cerebral con Aβ era la más intensa en una edad de 25 semanas. En este momento eran los valores de Aβ (Aβ42) 12 veces más altos que en los ratones control. El Aβ soluble en tampón aumentó igualmente

con la edad, sin embargo tras 25 semanas, en el momento de la carga de placas más alta, disminuyeron mucho los valores del Aβ soluble en el grupo deficiente en ABCC1.

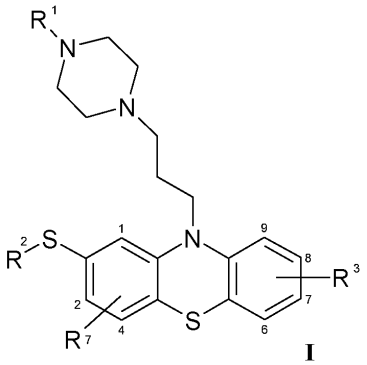
Se realizaron otros estudios que proporcionaron otras pruebas de la relación entre el transporte eventualmente deficiente por medio de ABCC1 y la agregación de Aβ.

Las cinéticas de transporte de transportadores ABC dependen entre otras cosas de características de proteínas/péptidos específicas, como la carga específica. La variante tipo holandesa de la proteína precursora de amiloide (mutante holandés, APP_{dt}), que introduce una carga negativa adicional cerca del sitio de corte de la α-secretasa de APP y conduce así a una angiopatía amiloide cerebral grave (CAA), influye en la eliminación de $A\beta_{dt}$ a través de la barrera hematoencefálica. Los análisis de inmunotransferencia tipo Western de capilares cerebrales y plexo coroideo (CP) de ratones control mostraron una expresión fuerte de ABCB1 en endotelios capilares cerebrales (BC) y de ABCC1 en el CP (figura 3d). Dado que los transportadores ABC desempeñan un importante papel en la eliminación del Aβ, se asumió que ratones deficientes en ABC, APP_{dt}-transgénicos (en la barrera hematoencefálica y en la barrera hemato-plexo coroideo) presentan una acumulación reforzada de $A\beta_{dt}$ en vasos meníngeos. El grado de la CAA en los ratones APP_{dt} deficientes en ABC se cuantificó en la edad de 24 meses. De acuerdo con la suposición estaba muy alterado al menos el 51 % de los vasos (> 75 % de la pared vascular cargada con Aβ) en los animales deficientes en ABCC1 en comparación con el 23 % en los controles (figura 3c).

Basándose en estos resultados se sometió a estudio en qué medida pudo reducirse/influirse el contenido de Aβ soluble en el cerebro mediante activación mediada por principios activos de transportadores ABC. Se trataron ratones con depósitos de amiloide durante 30 días con la tietilperazina anti-emética (Torecan®, 2-(etiltio)-10-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propil]-10H-fenotiazina). Dos veces al día se administraron 3 mg/kg de peso corporal por vía intramuscular. El tratamiento profiláctico comenzó ya antes de que los ratones formaran placas seniles. Las mediciones ELISA de los animales tratados mostraron una reducción de la cantidad de Aβ de al menos el 31 % en los ratones tratados en comparación con animales tratados con vehículo (vehículo = agua) (figura 3e). Los resultados están reproducidos gráficamente en la figura 3.

La capacidad de eliminación de Aβ resultó un factor clave en la regulación de la acumulación intracerebral de Aβ.

Como activador especialmente eficaz del transportador ABCC1 resultó tietilperazina (Torecan®). Otros derivados partiendo de la misma estructura base mostraron igualmente buenos resultados en la activación del transportador ABCC1. Los correspondientes derivados están representados en la fórmula general I



I

en la que los restos

R^1 y R^2 son iguales o distintos y son en cada caso independientemente entre sí grupos alquilo C_1-C_6, que presentan independientemente entre sí eventualmente otro sustituyente seleccionado de grupo alquilo, arilo, acilo (preferentemente acetilo), amino, nitro, sulfonilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ariltio, alquiltio y átomo de halógeno, presentando los respectivos grupos alquilo eventualmente al menos otro átomo de halógeno y el resto

R^3 se encuentra en una de las posiciones 6-9 del sistema de anillo de fenotiazina, preferentemente en la posición 6, 7 u 8, y un átomo de hidrógeno o es un grupo alquilo, arilo, acrilo (preferentemente acetilo), amino, nitro, sulfonilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ariltio o alquiltio o un átomo de halógeno, presentando los respectivos grupos alquilo eventualmente al menos otro átomo de halógeno, o es un grupo NR^4R^5 o OR^6, siendo R^4, R^5 y R^6 iguales o distintos y seleccionándose en cada caso independientemente entre sí de hidrógeno y grupo alquilo C_1-C_3 y el resto

R^7 se encuentra en una de las posiciones 1, 2 o 4 del sistema de anillo de fenotiazina, preferentemente en la posición 2 o 4, y un átomo de hidrógeno o es un grupo alquilo, arilo, acrilo (preferentemente acetilo), amino, nitro, sulfonilo, hidroxilo, alcoxilo, ariloxilo, ariltio o alquiltio o un átomo de halógeno, presentando los respectivos grupos alquilo eventualmente al menos otro átomo de halógeno, o es un grupo NR^8R^9 o OR^{10}, siendo R^8, R^9 y

R^{10} iguales o distintos y seleccionándose en cada caso independientemente entre sí de hidrógeno y grupo alquilo C_1-C_3.

Estos derivados son correspondientemente muy adecuados para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en particular de β-amiloidopatías o α-sinucleinopatías, comprendiendo el tratamiento tal como se han mencionado anteriormente tanto la profilaxis como el tratamiento de enfermedades ya existentes. El átomo de halógeno/los átomos de halógeno se seleccionan preferentemente de flúor y cloro. Los grupos acilo (-(C=O)-R) de los restos $R^{1, 2, 3, 7}$ son preferentemente grupos acetilo (-C(=O)CH_3). Preferentemente son los restos R^1 y R^2 iguales o distintos y en cada caso independientemente entre sí un grupo alquilo C_1-C_6 o un grupo alquilo C_1-C_6 (preferentemente alquilo C_1) sustituido con un grupo acetilo, así como los restos R^3 y R^7 son hidrógeno o un grupo acetilo. Preferentemente son los restos R^1 y R^2 iguales o distintos y en cada caso independientemente entre sí un grupo alquilo C_1-C_3. Además se prefiere que los restos R^3 y R^7 sean hidrógeno. Se prefiere especialmente cuando el resto R^1 sea un grupo metilo, el resto R^2 sea un grupo etilo y los restos R^3 y R^7 sean hidrógeno (tietilperazina, Torecan®). En el uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ha resultado ventajoso añadir a la 2-(R^2-tio)-10-[3-(4-R^1-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina otros principios activos, preferentemente 1-benzohidrilpiperazinas, lo más preferentemente 1-benzohidril-4-cinamil-piperazina (cinarizina).

Distintas enfermedades neurodegenerativas pueden tratarse con el derivado de 2-(R^2-tio)-10-[3-(4-R^1-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina de acuerdo con la invención o pueden diagnosticarse por medio de los análisis indirectos descritos anteriormente. En una forma de realización especialmente preferente es la enfermedad neurodegenerativa una β-amiloidopatía, en particular demencia de Alzheimer (AD). Otra forma de realización se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa es una α-sinucleinopatía, en particular enfermedad de Parkinson (PD). Ambas enfermedades, es decir β-amiloidopatía y α-sinucleinopatías, se caracterizan por depósitos de proteínas cerebrales que pueden tratarse por medio de una activación del transportador ABCC1 o pueden diagnosticarse por medio de su actividad.

Otras enfermedades que pueden tratarse igualmente a través de la activación del transportador ABCC1 o pueden diagnosticarse por medio de la actividad del transportador ABCC1, se mencionan a continuación. Así es otra enfermedad que puede tratarse la demencia por cuerpos de Lewy (LBD). Ésta está caracterizada igualmente por agregación de proteínas cerebral, es decir es una α-sinucleinopatía como el Parkinson.

Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Huntington (HD). Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa sea una enfermedad causadas por priones, en particular la enfermedad de Creutzfeld-Jacob (CJD) o insomnio familiar fatal (FFI). Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa sea una tauopatía, en particular degeneración cortico-basal (CBD), síndrome de Steel-Richardson-Olszewski (PSP, progessivesupranuclearpalsy- parálisis supranuclear progresiva) o enfermedad de Pick (PiD). Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa sea una degeneración frontotemporal (FTLD), en particular degeneración positiva para ubiquitina, degeneración positiva para TDP43 o degeneraciones negativas para ubiquitina y TDP43. Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa sea esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa sea una ataxia espinocerebelar (SCA) o paraparesia espástica (SPG). Otra forma de realización no de acuerdo con la invención se refiere al caso de que la enfermedad neurodegenerativa/neuroinmunológica sea esclerosis múltiple (EM) o un síndrome relacionado con EM, en particular ADEM o síndrome de Devic.

Descripción de las figuras

Muestran

La figura 1a que la densidad cortical de palcas neuríticas en ratones deficientes en ABCC1 (ABCC1ko) se ha elevado en ~75 %;

la figura 1b,c que el tamaño de placa promedio se ha elevado (+34 %) debido al mayor número de placas (+63 %) con un tamaño de más de 700 μm^2 y una frecuencia más baja de placas más pequeñas (-24 %). Barras de error, erro estándar (n≥3);

la figura 1d que la coloración IHC en ratones deficientes en ABCG2 (ABCG2ko), deficientes en ABCB1 (ABCB1ko), deficientes en ABCC1 (ABCC1ko) y en ratones control muestra una densidad superficial más alta de Aβ en animales deficientes en ABCC1. Las placas típicas del mismo tamaño están representadas en corte, las barras de escala representan 500 μm (vista superior) y 50 μm (corte) (*p<0,05);

la figura 2a que la densidad de placas en el córtex (cubierta) y el tamaño en ratones deficientes en transportadores ABC específicos es elevada. En particular, los ratones deficientes en ABCC1 (ABCC1ko) muestran una carga elevada de amiloide Aβ (barras gris claro, en cada caso a la derecha fuera en las agrupaciones individuales), w = semana en el eje de abscisas;

la figura 2b que el tamaño de placa total en ratones deficientes en ABCC1 (ABCC1ko) y deficientes en ABCB1 (ABCB1ko) en la edad de 25 semanas es elevado, w = semana en el eje de abscisas;

la figura 2c que el aumento total en el tamaño de placa está asociado con la aparición de menos placas pequeñas y más placas más grandes (>700 μm^2), mientras que el número de placas de tamaño medio sigue estando en el mismo valor, barras de error, error estándar (n≥5), *p<0,05;

la figura 3 que la deficiencia de ABCC1 fomenta la acumulación de Aβ y $A\beta_{dt}$ y que la activación de ABCC1 (mediante administración de Torecan) reduce los valores de Aβ; en la que

la figura 3a muestra que en una edad de 25 semanas la deficiencia en ABCC1 conduce a un aumento marcado (~12 veces) en Aβ insoluble; y

la figura 3b muestra que la cantidad de Aβ42 soluble en tampón en una edad de 25 semanas se reduce notablemente en comparación con 22 semanas (-56 %). Esto se basa probablemente en la deposición en depósitos insolubles. En la misma edad, la superficie ocupada por deposiciones de Aβ, que se mide en la inmunohistoquímica, se ha elevado en un 83 % (barras de error, error estándar n≥5, p<0,05);

la figura 3c muestra que el 53 % de los vasos sanguíneos se ven muy alterados por CAA (>75 % de las paredes vasculares presentan Aβ). Esto se refiere a ratones deficientes en ABCC1 (ABCC1ko) en comparación con el 23 % en los controles (n=3);

la figura 3d muestra que la expresión de ABCC1 puede observarse predominantemente en el plexo coroideo (CP), mientras que ABCB1 se expresa principalmente en los capilares del cerebro (BP);

la figura 3e muestra que la activación de ABCC1 mediante tietilperazina (Torecan) reduce los valores de Aβ en ratones (-28 %), barras de error, error estándar (n=4, *p<0,05).

Ejemplos

Animales

Se adquirieron ratones APP-transgénicos (APP, APP_{dt}) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, EE.UU.) y de la Universidad de Tübingen (Tübingen, Alemania). Los ratones deficientes en NEP se adquirieron de Riken Brain Research Institute (Saitama, Japón). Los ratones deficientes en ABCG2, ABCB1 y ABCC1 se adquirieron de Taconic-Farms (Dinamarca). Todas las líneas de ratón transgénicas y deficientes se cruzaron durante al menos 9 generaciones en el fondo genético FVB. Los ratones se mantuvieron en ciclo de luz/oscuridad de 12h/12h a 23 ºC con libre acceso a alimentos y agua.

Procedimientos

Preparación de tejidos

Para la preparación de tejidos se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical y se perfusionaron por vía transcardíaca con PBS (solución fisiológica de cloruro de sodio, tamponada con fosfato). El cerebro se separó y se colocó un hemisferio en paraformaldehído al 4 % tamponado para incrustación en parafina e inmunohistoquímica. El otro hemisferio se congelo rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 ºC para análisis bioquímicos.

ELISA

Se usaron kits ELISA (TH40HS, TK42HS) de The Genetics Company (TGC, Schlieren, Suiza) para la cuantificación de Aβ. Se homogeneizaron los hemisferios cerebrales usando PreCellys24 (12 s, 6.500 rpm). Tras adición de tampón carbonato (pH 8,0) se mezclaron los homogeneizados usando PreCellys (5 s, 5.000 rpm) y se centrifugaron durante 90 min a 4 ºC y 24.000 g, para separar especies de Aβ insolubles y solubles. El sobrenadante que queda (fracción soluble en tampón) se mezcló con clorhidrato de guanidina 8 M en una proporción de 1:1,6. Para la extracción de las especies de Aβ agregadas se disolvió el sedimento en 8 volúmenes de clorhidrato de guanidina 5 M, se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se centrifugó a 24.000 g durante 20 min a 4 ºC. El sobrenadante que queda representaba la fracción soluble en guanidina (GuaHCl). Se midieron tres veces contenidos en proteínas

de todas las muestras, usándose un espectrofotómetro Nanodrop1000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, EE.UU.). Los ELISA se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante usando diluciones apropiadas.

Inmunotransferencias tipo Western

Para las inmunotransferencias tipo Western se prepararon homogeneizados tisulares. Las concentraciones de proteína total de los extractos se determinaron usando un ensayo BCA (Pierce, Teil von Thermo Fisher Scientific, Rockford, EE.UU.). Tras la electroforesis de 10 μg de proteína total por pista se sometieron a inmunotransferencia las proteínas en membranas de PVDF. Tras el bloqueo en el 5 % de leche en polvo en tampón TBST (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %) durante 1 h a temperatura ambiente, se sometieron a estudio las inmunotransferencias o bien para determinar ABCB1 (1:500, D-11, Santa Cruz), ABCC1 (1:200, Alexis Bio) o β-actina (1:20.000, Sigma) durante la noche a 4 ºC. Como anticuerpos de detección se usaron HRP anti-ratón, HRP anti-rata o HRP anti-liebre. Para la visualización se usaron un kit de detección Amersham ECL Plus y una cámara Roper-CoolSnap HQ^2.

Inmunohistoquímica (IHC)

Los cerebros fijados en formalina se incrustaron en parafina y se cortaron secciones de 4 μm de espesor. Tras la separación de la parafina se trataron posteriormente las secciones con un autoteñidor BondMax™ (Menarini/Leica, Alemania). La inmunotinción se inició tras el bloqueo de peroxidasa endógena (5 min) y reencuentro de epítopos (epitoperetrieval) durante 5 min con ácido fórmico al 95 % (para anticuerpos 6F3D, Dako, Alemania) y ácido fórmico al 70 % (para anticuerpos 4G8, Millipore, Alemania). Los anticuerpos primarios se incubaron de manera rutinaria a temperatura ambiente durante 30 min con las siguientes diluciones: 6F3D (1:100), 4G8 (1:500). Los anticuerpos primarios se detectaron con el kit de detección BondMax™ Bond Polymer Refine y según el protocolo estándar DAB R30. Los cortes se digitalizaron completamente con una resolución de 230 nm usando un escáner MiraxDesk/MiraxMidi y a continuación se analizaron automáticamente usando el paquete de software AxioVision (Zeiss, Alemania).

Evaluación de la gravedad de la CAA

Los cortes cerebrales de ratones APP_{dt} se tiñeron con anticuerpos 4G8. Al menos dos secciones no consecutivas se sometieron a estudio para determinar CAA de los vasos meníngeos de manera ciega. Todos los vasos meníngeos se contaron manualmente y se clasificó la gravedad de la CAA tal como sigue:

Categoría I: no alterado
Categoría II: ≤25 % de la periferia teñida de manera positiva
Categoría III: ≤50 % de la periferia teñida de manera positiva
Categoría IV: ≤75 % de la periferia teñida de manera positiva
Categoría V: ≤100 % de la periferia teñida de manera positiva

El número promedio de vasos para cualquier categoría se calculó con respecto al número total de vasos detectados.

Ensayo Transwell de células endoteliales (ECTA)

Se prepararon células endoteliales de capilares de cerebro de ratón tal como se ha descrito en Coisne *et al*. (Coisne, C. *et al*. Mouse syngenic *in vitro* blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in zerebral endothelium. Laboratory Investigation; 85, 734-746 (2005)). Al menos diez ratones de 3-4 semanas de edad se decapitaron y se separaron los cerebros. Tras disecar el tronco cerebral, la sustancia blanca y la meninge se homogeneizó el tejido en dos volúmenes de tampón de lavado B (WBB) (Hanks bufferedsaltsolution (HBBS), HEPES 10 mM, BSA al 0,1 %) usando un homogeneizador Dounce de vidrio de 15 ml (Wheaton Industries, Millville, NJ; EE.UU). Un volumen de solución de dextrano al 30 % se añadió al homogeneizado. Se centrifugó dos veces a 3.000 g y 4 ºC. El sedimento que contenía los vasos se resuspendió en WBB y se partieron los vasos grandes manualmente mediante pipeteado fuerte de la solución. Se usó filtración a vacío por membranas de 60 μm (SEFAR, Suiza) para separar vasos grandes de los capilares. Tras tratamiento combinado con colagenasa/dispasa (HBSS, HEPES 10 mM, TCLK 0,15 μg/ml, DNAsa-I 10 μg/ml, colagenasa/dispasa 1 mg/ml (Roche)) se consiguió una suspensión de células individuales mediante pipeteado fuerte adicional de la solución. Las células endoteliales se introdujeron en insertos Transwell revestidos con Matrigel (poros de 0,4 μm, Greiner Bio-One, Alemania) con una densidad de 120.000 células por inserto y se dejaron crecer en un cultivo glial de soporte.

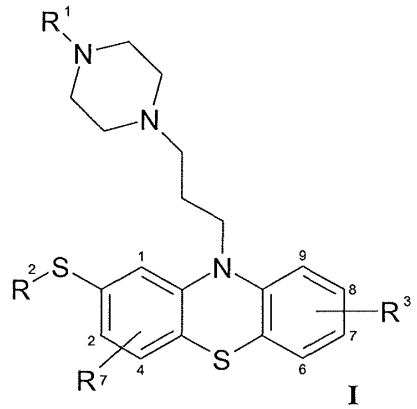
Se usó amarillo azufre para la determinación del flujo paracelular durante el ensayo. El medio de cultivo del compartimento abluminal se sustituyó con una solución que contenía 10 ng de Aβ42 (concentración final 1,6 nM). A continuación se extrajeron muestras del compartimento luminal tras 2 h, 6 h o 24 h y se determinó el contenido en Aβ con ELISA (TK42-highsense, TGC, Suiza). La velocidad de transporte se determinó tal como se ha descrito en Coisne *et al*. (Coisne, C. *et al*. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. Laboratory Investigation; 85, 734-746 (2005)).

Estadísticas de ELISA

La prueba de bondad de ajuste de Lilliefors (alfa= 0,05) se aplicó a los datos de ELISA y a los datos de ELISA transformados en log, para diferenciar entre la suposición de datos de muestras distribuidos de manera normal y la suposición de datos de muestras distribuidos de manera normal en log. A pesar del pequeño tamaño de muestras se rechazó para los dos conjuntos de datos la hipótesis cero (H_0) para 5 de 44 muestras. De acuerdo con la observación de que predomina sesgos positivos (skew) y datos de muestras estrictamente positivos se descartó la suposición de datos distribuidos de manera normal. Los valores medios y los intervalos de confianza se calcularon suponiendo una distribución normal en log subyacente. La prueba de suma de rangos de Wilcoxon se aplicó para comparar los datos de ELISA de las distintas cepas de ratón para cada momento.

REIVINDICACIONES

1. 2-(R^2-tio)-10-[3-(4-R^1-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina de acuerdo con la fórmula general I



I

en la que
el resto R^1 es un grupo metilo, el resto R^2 es un grupo etilo y los restos R^3 y R^7 son hidrógeno,
para el tratamiento de una β-amiloidopatía o una α-sinucleinopatía, que van acompañadas de un depósito de proteínas cerebral y una actividad reducida del transportador ABCC1 cerebral.

2. 2-(etil-tio)-10-[3-(4-metil-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que se añaden otros principios activos.

3. 2-(etil-tio)-10-[3-(4-metil-piperazin-1-il)propil]-10H-fenotiazina para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por que como otros principios activos se añaden 1-benzohidrilpiperazinas.

4. 2-(etil-tio)-10-[3-(4-metil-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, caracterizada por que como 1-benzohidrilpiperazina se añade 1-benzohidril-4-cinamil-piperazina.

5. 2-(etil-tio)-10-[3-(4-metil-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la β-amiloidopatía es la demencia de Alzheimer.

6. 2-(etil-tio)-10-[3-(4-metil-piperazin-1-il)propil]-10*H*-fenotiazina para su uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la α-sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson o demencia por cuerpos de Lewy.

Figura 1a

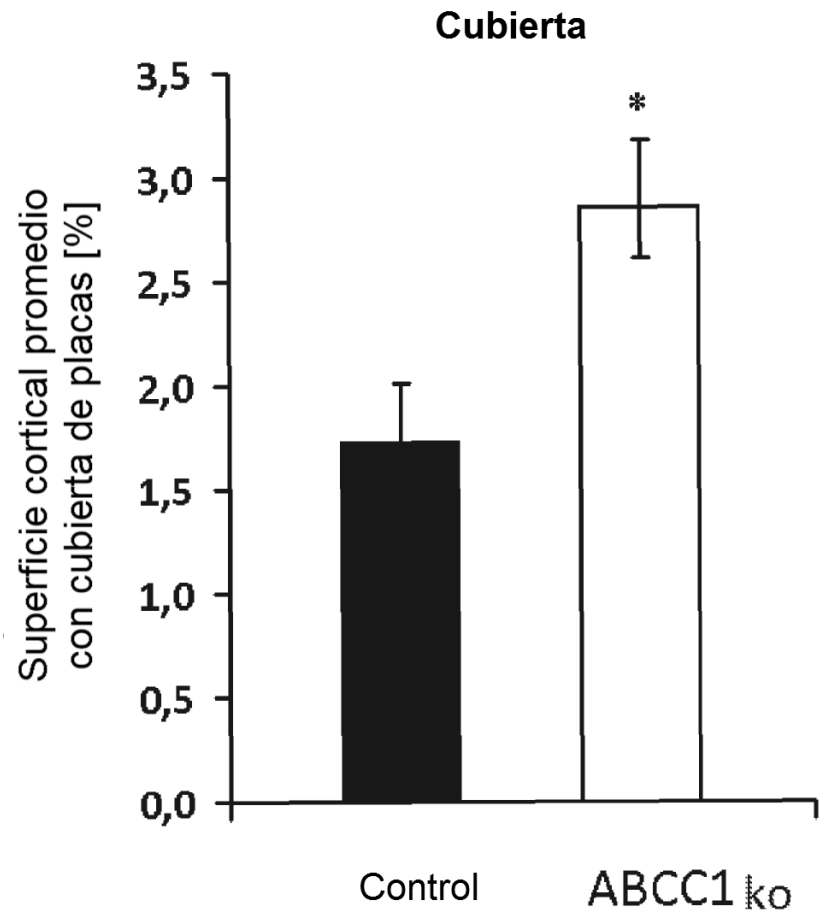

Cubierta
Superficie cortical promedio con cubierta de placas [%]
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
Control
ABCC1 ko

Figura 1b

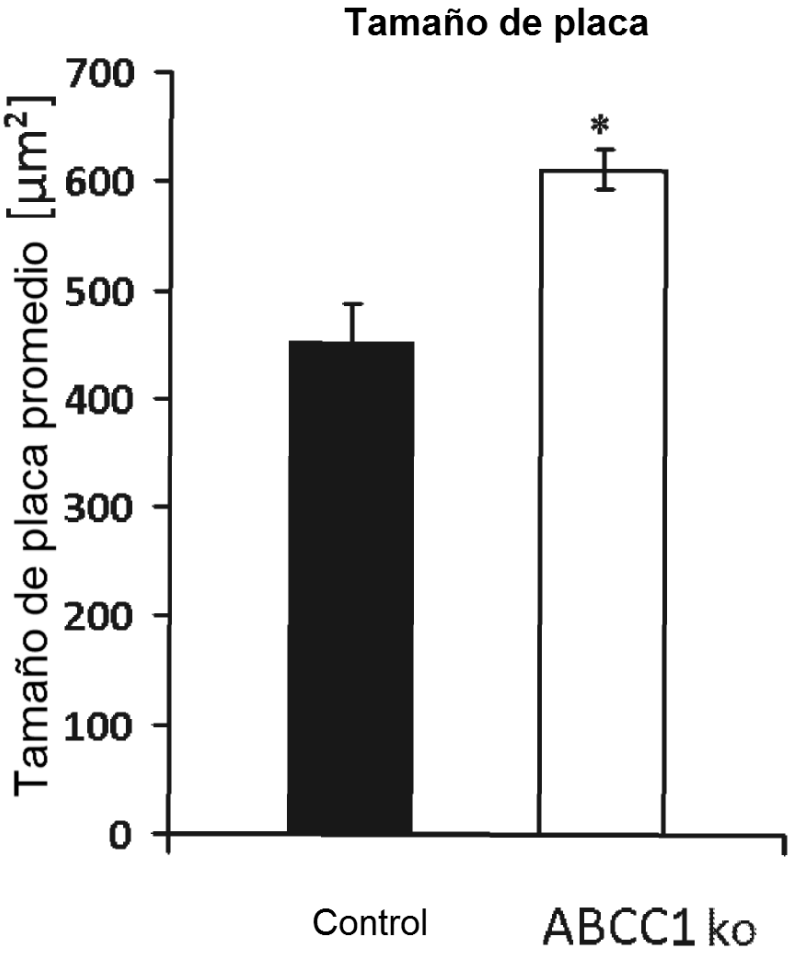

Tamaño de placa
Tamaño de placa promedio [µm²]
700
600
500
400
300
200
100
0
*
Control
ABCC1 ko

Figura 1c

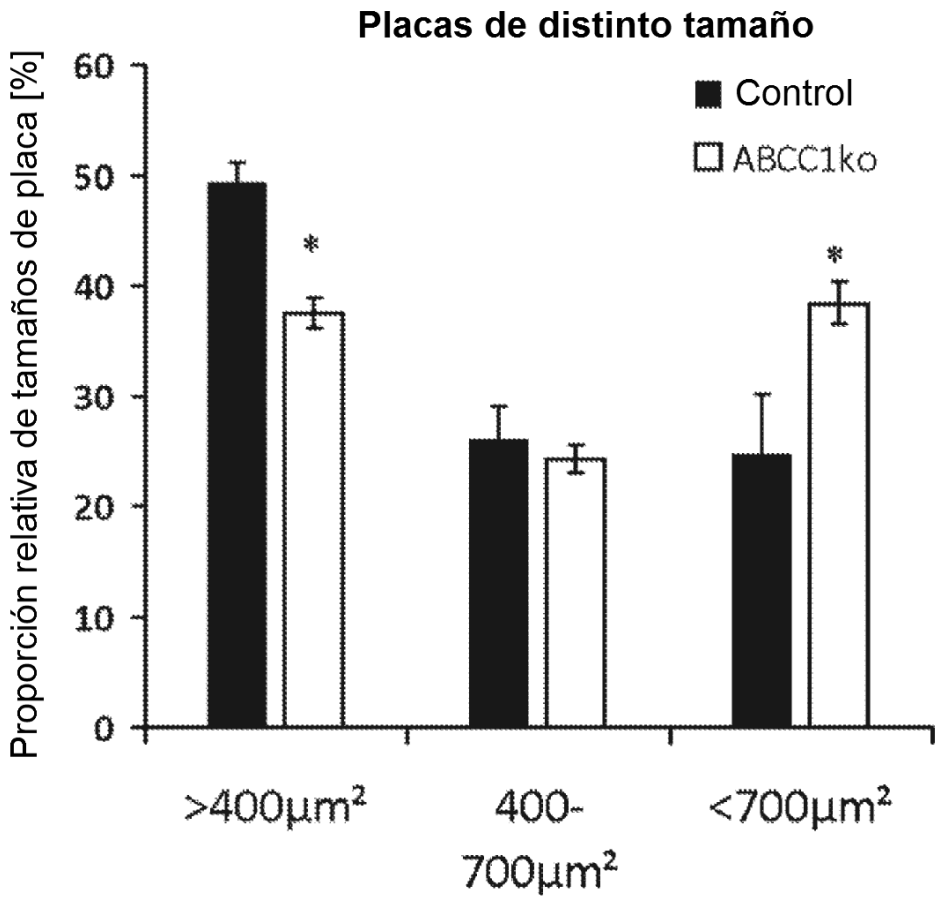

Placas de distinto tamaño
Control
ABCC1ko
Proporción relativa de tamaños de placa [%]
60
50
40
30
20
10
0
*
*
>400µm²
400-
700µm²
<700µm²

Figura 1d

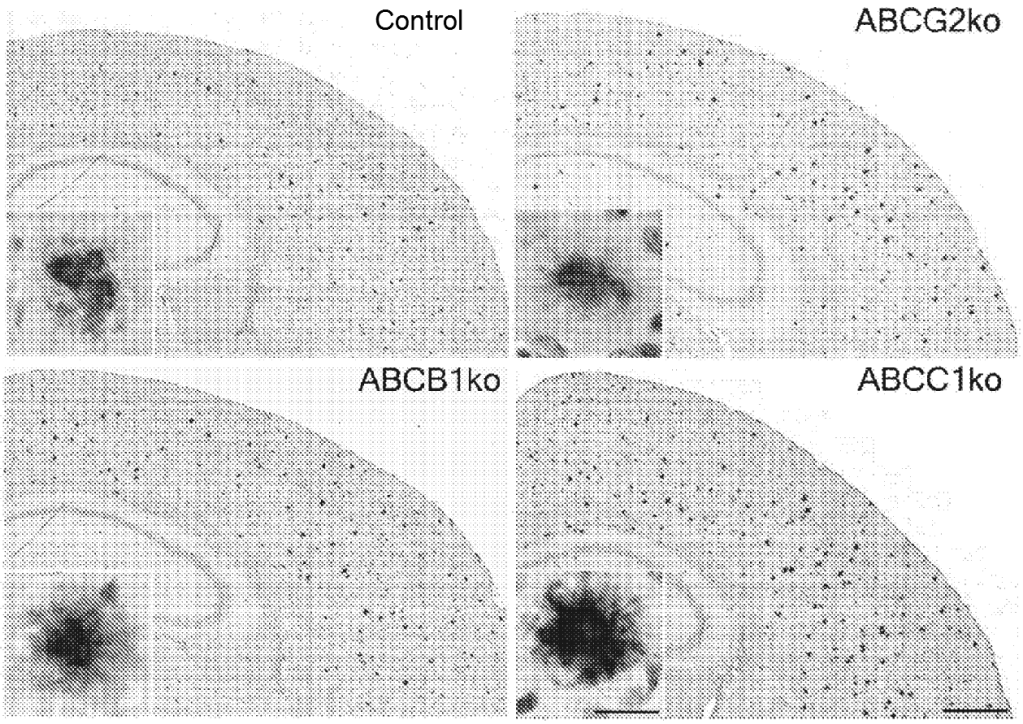


Figura 2a

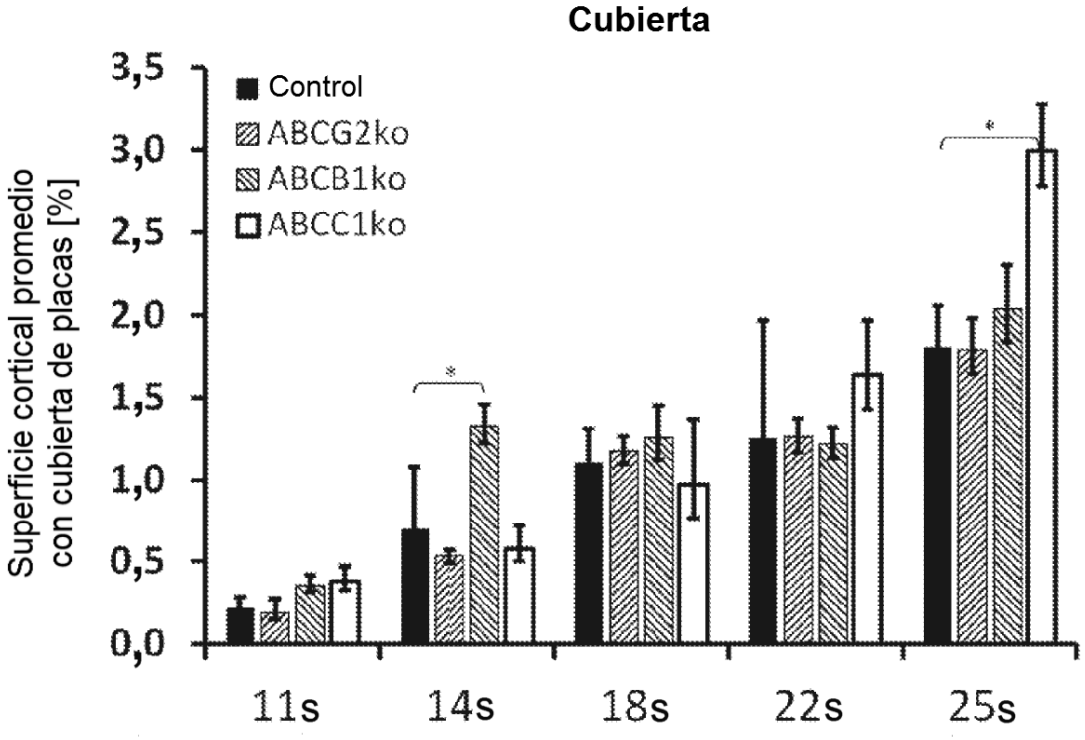

Cubierta
Control
ABCG2ko
ABCB1ko
ABCC1ko
Superficie cortical promedio con cubierta de placas [%]
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
11s
14s
18s
22s
25s
*
*

Figura 2b

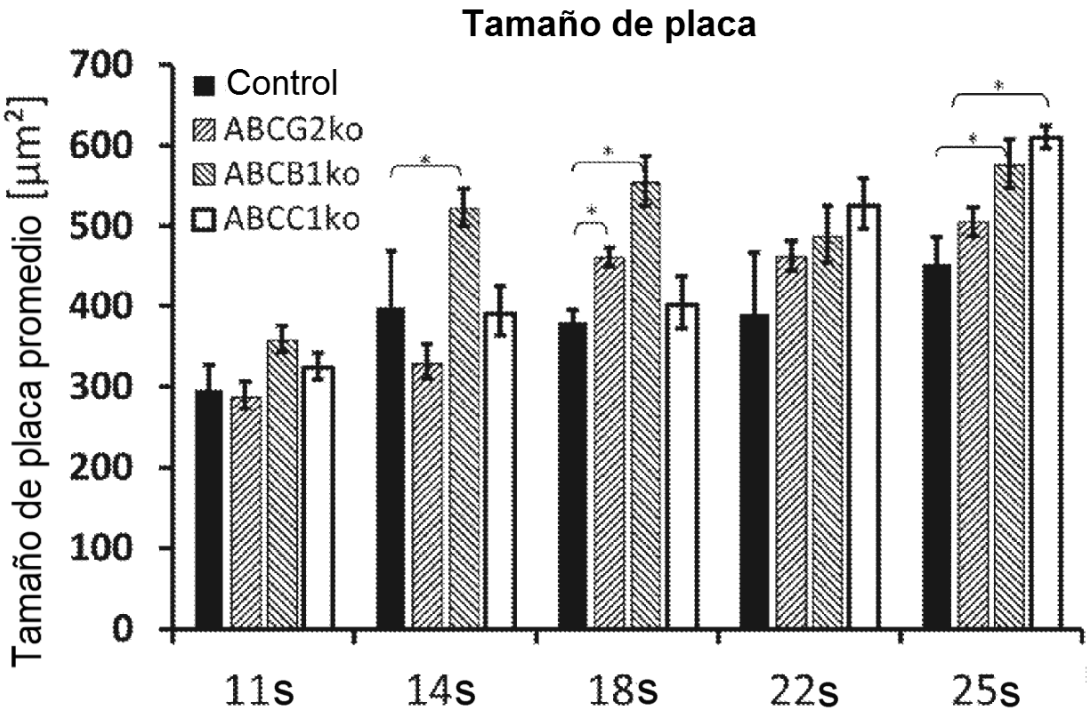

Tamaño de placa
Control
ABCG2ko
ABCB1ko
ABCC1ko
Tamaño de placa promedio [µm²]
700
600
500
400
300
200
100
0
11s
14s
18s
22s
25s
*

Figura 2c

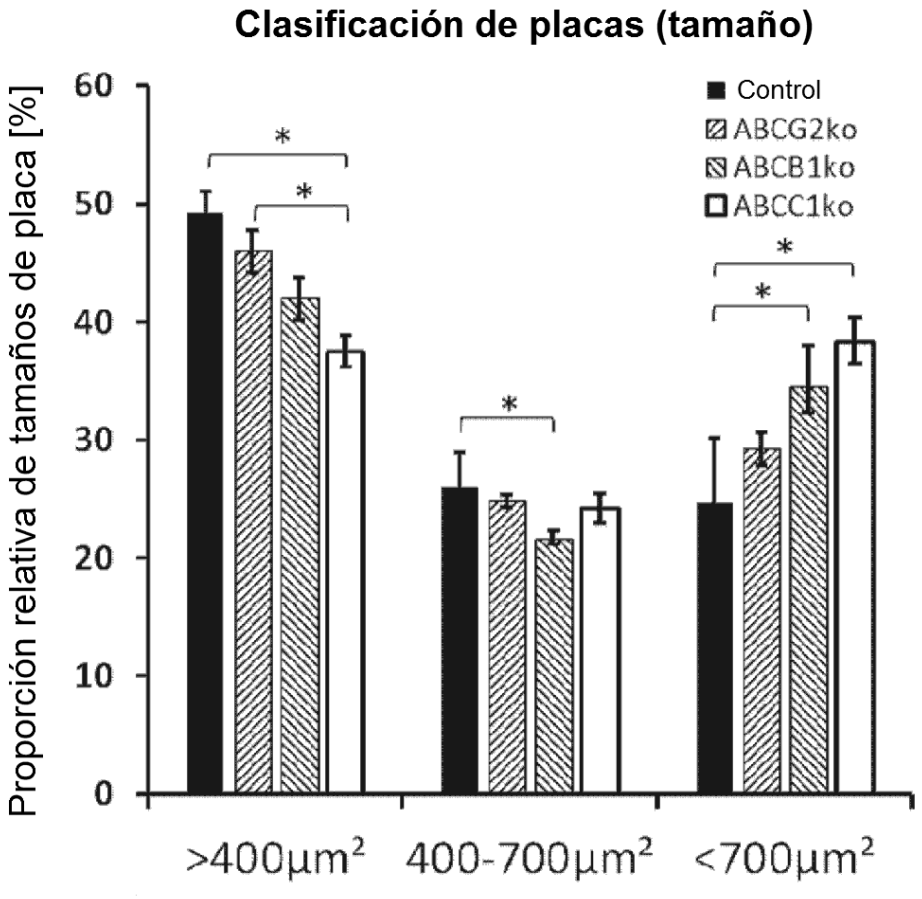

Clasificación de placas (tamaño)
Proporción relativa de tamaños de placa [%]
60
50
40
30
20
10
0
Control
ABCG2ko
ABCB1ko
ABCC1ko
*
*
*
*
*
>400µm²
400-700µm²
<700µm²

Figura 3a

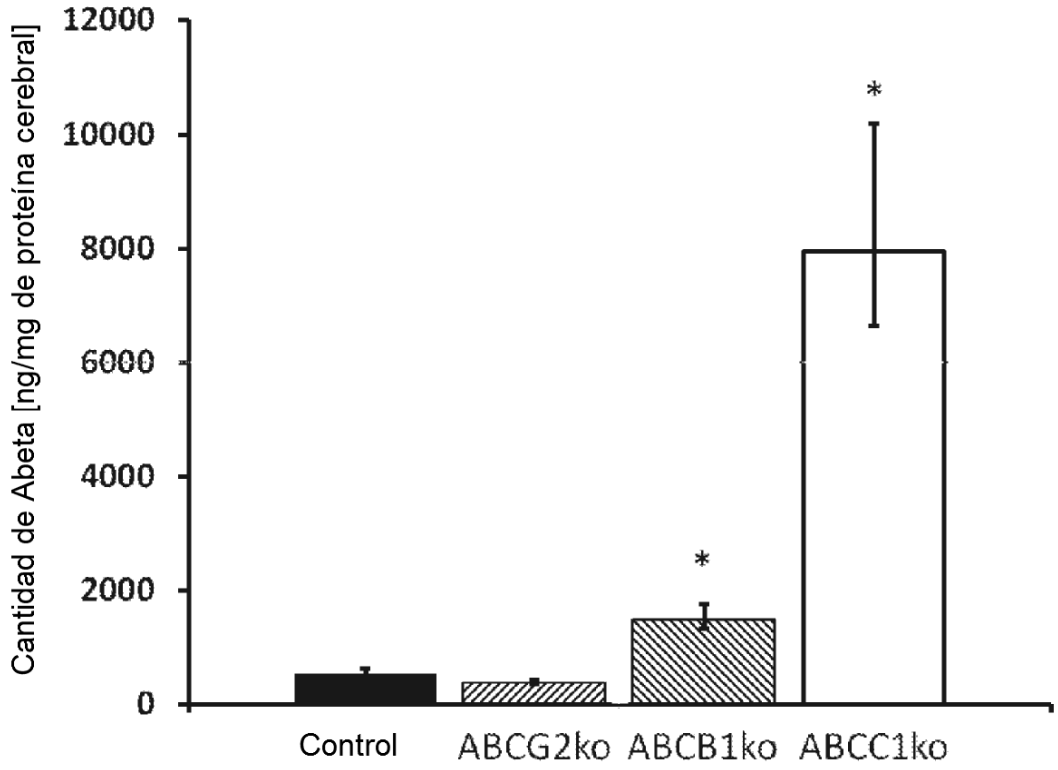

Cantidad de Abeta [ng/mg de proteína cerebral]
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
*
Control
ABCG2ko
ABCB1ko
ABCC1ko

Figura 3b

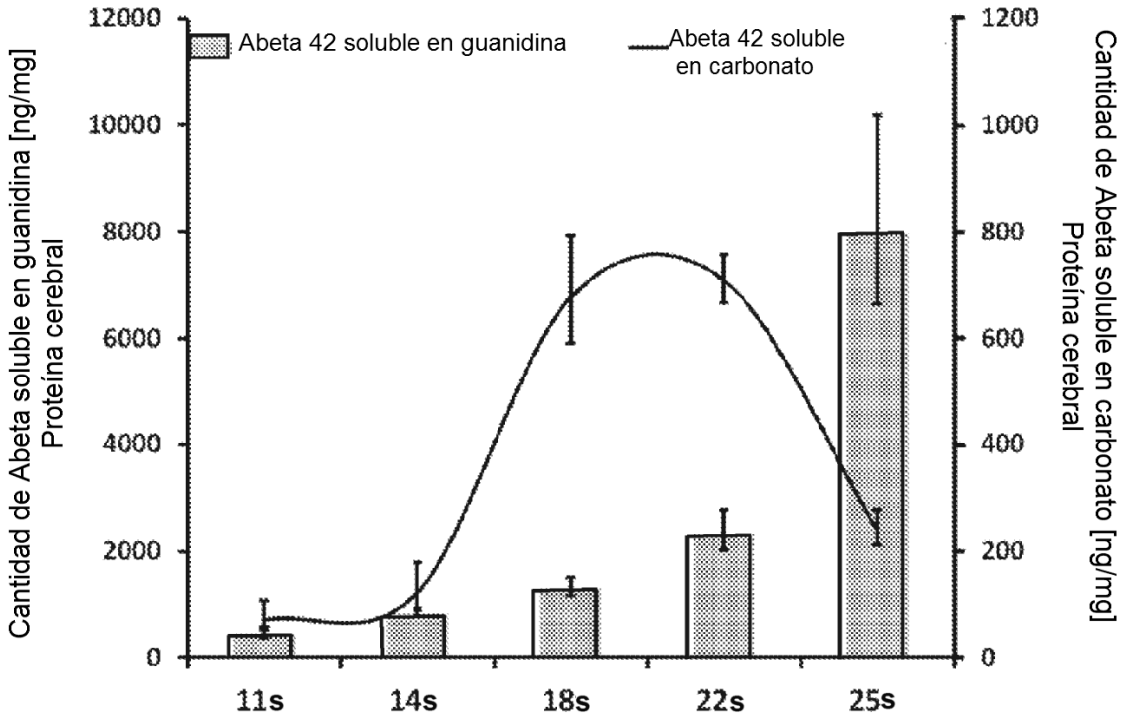

Abeta 42 soluble en guanidina
Abeta 42 soluble en carbonato
Cantidad de Abeta soluble en guanidina [ng/mg] Proteína cerebral
Cantidad de Abeta soluble en carbonato [ng/mg] Proteína cerebral
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1200
1000
800
600
400
200
0
11s
14s
18s
22s
25s

Figura 3c

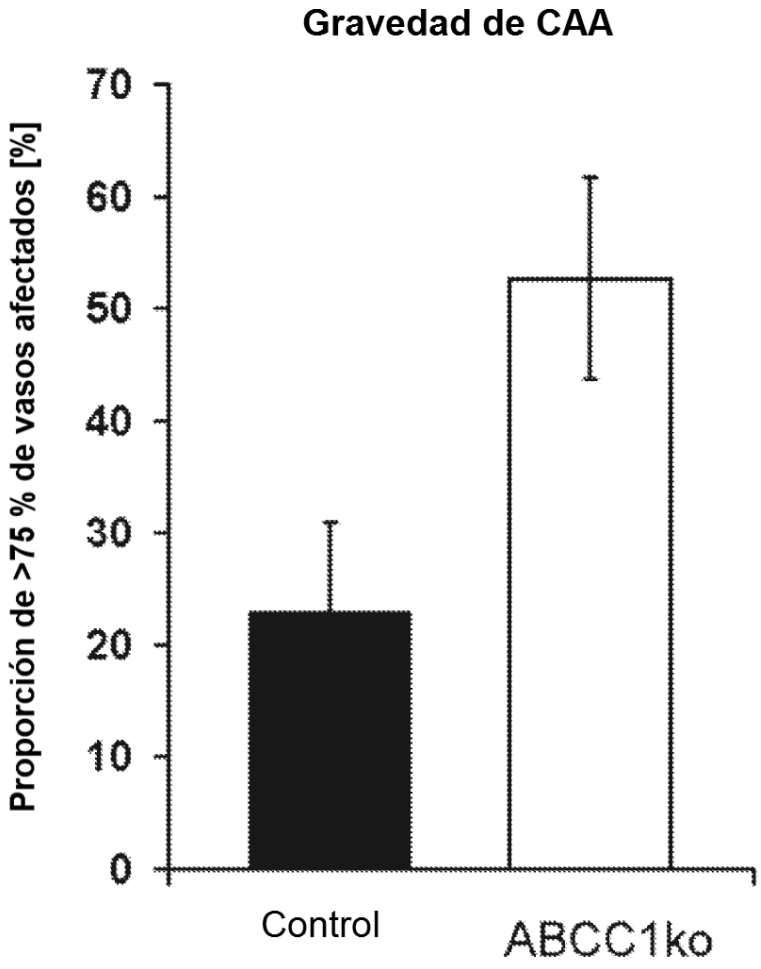

Gravedad de CAA
Proporción de >75 % de vasos afectados [%]
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
ABCC1ko

Figura 3d

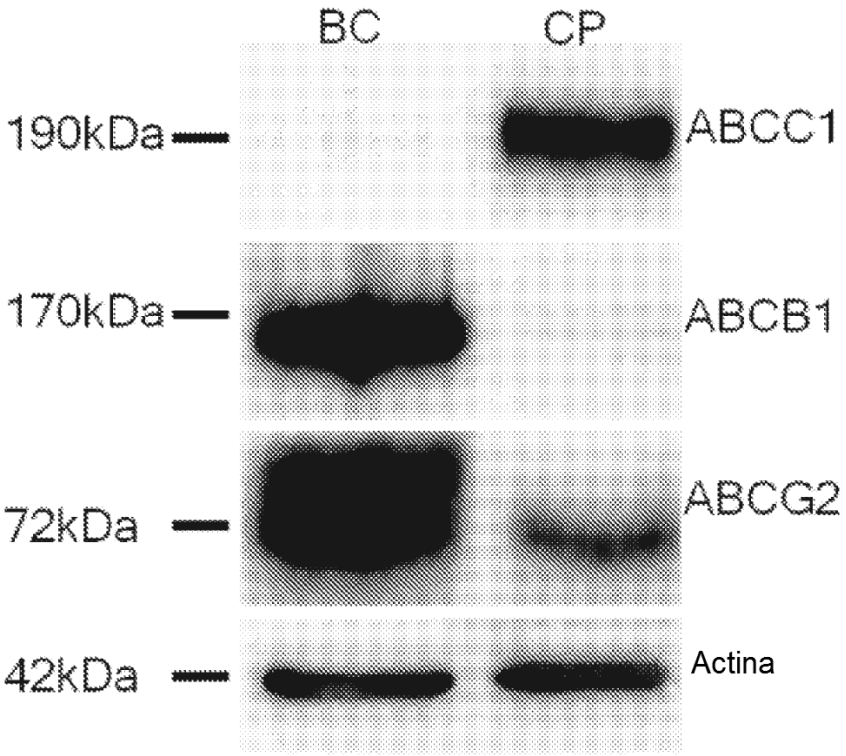
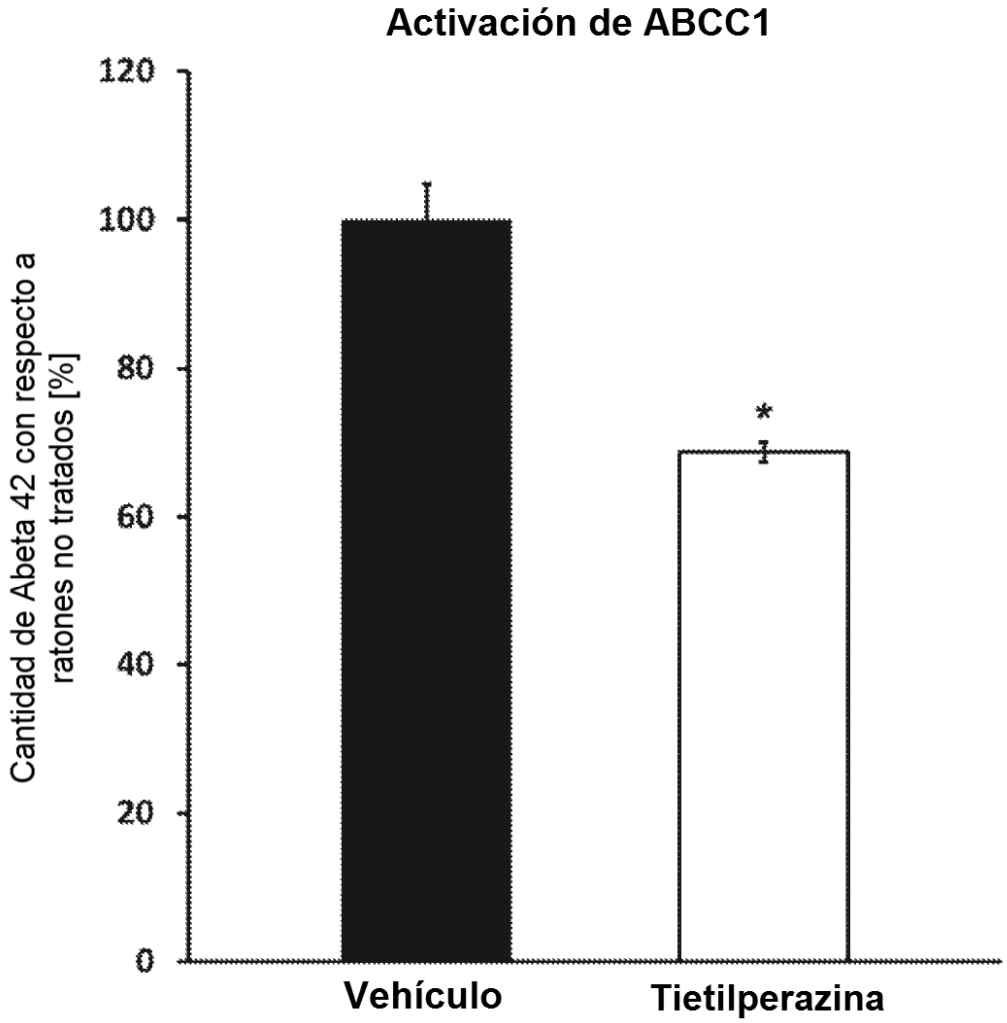


Figura 3e


Activación de ABCC1
Cantidad de Abeta 42 con respecto a ratones no tratados [%]
120
100
80
60
40
20
0
*
Vehículo
Tietilperazina