

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 960**

51 Int. Cl.:

**C07D 219/12** (2006.01)

**A61K 31/435** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2016 PCT/EP2016/055633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2016 E 16710161 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3271335**

54 Título: **Nuevo derivado de 1,4-bis(3-aminopropil)piperazina y su uso**

30 Prioridad:

**16.03.2015 EP 15305384**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.06.2019**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL ET  
UNIVERSITAIRE DE LILLE (CHRU) (33.3%) y  
UNIVERSITÉ DE LILLE (3.3%)**

72 Inventor/es:

**SERGEANT, NICOLAS;  
BUEE, LUC;  
MELNYK, PATRICIA;  
GAY, MARION y  
LE FUR, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 715 960 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**

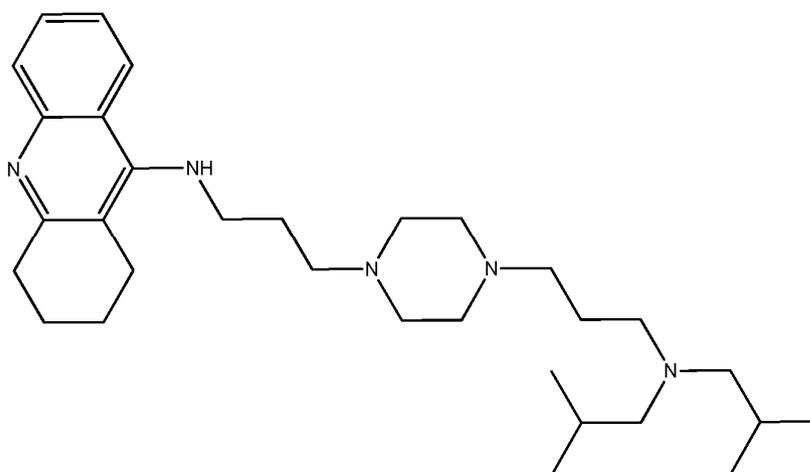
Nuevo derivado de 1,4-bis(3-aminopropil)piperazina y su uso

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto, *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma, a su preparación, a las composiciones farmacéuticas que los contienen y al uso de los mismos en el tratamiento y/o la prevención de las tauopatías.

**Estado de la técnica**

La *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina, que tiene la estructura de Fórmula I:



Fórmula I

20 pertenece a una familia de derivados de 1,4-bis(3-aminopropil)piperazina desvelados anteriormente en el documento WO 2006/051489 y que son útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas con disfunción de la APP.

25 La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas tiene mecanismos celulares y moleculares comunes que incluyen la agregación de proteínas y formación de cuerpos de inclusión.

La definición de los diferentes tipos de lesiones se realiza con respecto al compuesto molecular que los constituye. La degeneración neurofibrilar (DNF) es una de las lesiones cerebrales más observadas debida a una cascada de eventos moleculares que combinan modificaciones anormales de las isoformas de la proteína Tau asociadas con los microtúbulos, su agregación y acumulación progresiva en material fibrilar dentro de las neuronas.

35 La proteína Tau se expresa principalmente en las neuronas del sistema nervioso central, en el que interactúa con la tubulina para estabilizar los microtúbulos y potencia el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos. Esta propiedad estabilizadora está controlada por las isoformas y la fosforilación. Las isoformas de Tau son el producto de un corte y empalme alternativo a partir de la transcripción de un solo gen *MAPT* (proteína asociada con los microtúbulos Tau) ubicado en el cromosoma 17.

40 Existen seis isoformas de Tau en el tejido cerebral humano, y se distinguen por su número de dominios de unión (tres o cuatro dominios de unión). Las isoformas son el resultado de un corte y empalme alternativo en los exones 2, 3 y 10 del gen Tau. Los dominios de unión están ubicados en la región media carboxi-terminal de la proteína y están cargados positivamente (lo que le permite la unión a los microtúbulos cargados negativamente). Las isoformas con cuatro dominios de unión que contienen el exón 10 tienen una mejor afinidad con los microtúbulos, lo que permite una mejor estabilización de estos microtúbulos, que aquellas con tres dominios de unión.

45 Tau es una fosfoproteína, cuyos sitios de fosforilación se distribuyen esencialmente en ambos lados del dominio de unión a los microtúbulos. La fosforilación de Tau da produce la interrupción de la organización de los microtúbulos.

En varias enfermedades neurodegenerativas denominadas "tauopatías", las isoformas de la proteína Tau

anormalmente fosforiladas e hiperfosforiladas se agregan en estructuras fibrilares dentro de las neuronas para formar los denominados ovillos neurofibrilares (NFT). Estas tauopatías difieren principalmente entre sí en cuanto a la fosforilación y al contenido de las isoformas de Tau. La hiperfosforilación, la fosforilación anormal y la agregación están constantemente presentes en la degeneración neurofibrilar.

5 La calidad, intensidad y/o ubicación espacial de la degeneración neurofibrilar está extremadamente correlacionada con el deterioro de las funciones cognitivas. Estas deficiencias son particularmente incapacitantes para el paciente que ya no es autónomo.

10 Por consiguiente, existe la necesidad de tratamientos capaces de evitar la agregación patológica de la proteína Tau en el cerebro humano y las consecuencias de esta agregación.

Algunos tratamientos se han centrado en los inhibidores de la quinasa, los activadores de la fosfatasa o los anticuerpos anti-Tau (véase, por ejemplo, el documento WO 2014028777). Sin embargo, ninguno de estos  
15 tratamientos ha conducido con éxito a un tratamiento comercial de las tauopatías hasta lo que sabe el solicitante, en especial, en el caso de las enfermedades neurodegenerativas raras tales como la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado a mutaciones del cromosoma 17 (FTDP-17) de *MAPT*.

20 Por lo tanto, todavía existe la necesidad en la técnica de un tratamiento para las tauopatías, que sea capaz de restablecer con éxito un metabolismo normal de Tau.

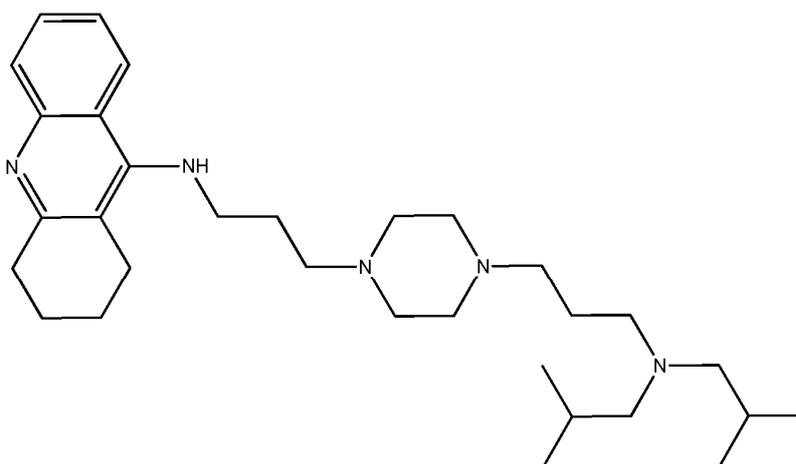
### Objeto de la invención

25 La presente invención se basa en los descubrimientos inesperados de que el compuesto de Fórmula I, la *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina, es útil para rectificar el metabolismo de la proteína Tau, en particular, modificando la fosforilación patológica de la proteína Tau y aumentando la proteólisis de la proteína Tau.

30 La invención se dirige, por tanto, al compuesto de Fórmula I, o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, así como a las composiciones que comprenden dichos compuestos y a su uso en el tratamiento y/o la prevención de una tauopatía.

### Descripción detallada de la invención

35 La invención se refiere al compuesto que tiene la Fórmula I,



I

40 o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo.

El compuesto de Fórmula I, así como sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, se pueden marcar isotópicamente, en especial, se pueden deutero. La forma deutero es útil para la dosificación del compuesto en un entorno biológico.

45 El compuesto de fórmula I, o sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, son útiles para rectificar el metabolismo de la proteína Tau en los siguientes puntos esenciales:

- 1) disminuir la fosforilación de la proteína Tau;
- 2) aumentar los productos catabolitos de la proteína Tau.

- 5 Por "tauopatía" se entiende un trastorno caracterizado por un metabolismo anormal de la proteína Tau, en particular, por una fosforilación e/o hiperfosforilación anormales de la proteína Tau y/o la presencia de niveles elevados (superiores a un nivel de control normal, por ejemplo, superiores a un nivel de control normal para un individuo o una población de individuos del mismo grupo de edad) de Tau o isoforma de Tau o polipéptidos Tau y/o formas patológicas de Tau en una célula, un tejido o un fluido, preferentemente, en el tejido cerebral y/o líquido cefalorraquídeo. Más específicamente, una Tauopatía se refiere a un trastorno en el que se observan agregados intracelulares de proteínas Tau anormalmente modificadas, tales como los ovillos neurofibrilares (NFT), cuerpos de Pick, cuerpos astrocíticos con mechones y/o cuerpos de inclusión muscular, preferentemente al menos ovillos neurofibrilares (NFT).
- 10
- 15 Las tauopatías incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y complejo de parkinsonismo y demencia de Guam, enfermedad de grano argirofílico, encefalopatía traumática crónica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, parkinsonismo de Guadalupe, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis de cuerpos de inclusión, atrofia de múltiples sistemas, distrofia miotónica de Steinert, distrofia miotónica de tipo II, neurodegeneración de la enfermedad de Huntington con acumulación de hierro en el cerebro, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de la neurona motora no guamánica con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Paget, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral de proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), retraso mental relacionado con SLC9A6, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de un solo ovillo, demencia por infarto múltiple, apoplejía isquémica, encefalopatía traumática crónica (ETC), lesión cerebral traumática (TBI), apoplejía y tauopatía de la materia blanca con inclusiones gliales globulares.
- 20
- 25
- 30 Debido a su capacidad para rectificar el metabolismo de la proteína Tau como se describe anteriormente, el compuesto de Fórmula I, o una de sus sales o solvatos farmacéuticos, es útil como medicamento, en particular, para su uso en el tratamiento o la prevención de una tauopatía.
- 35 Por lo tanto, la invención también se refiere al compuesto de Fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, según lo definido en el presente documento para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una tauopatía seleccionada entre enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y complejo de parkinsonismo y demencia, enfermedad de grano argirofílico, encefalopatía traumática crónica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, parkinsonismo de Guadalupe, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis de cuerpos de inclusión, atrofia de múltiples sistemas, distrofia miotónica, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de la neurona motora no guamánica con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral de proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), retraso mental relacionado con SLC9A6, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de un solo ovillo, demencia por infarto múltiple, apoplejía isquémica, encefalopatía traumática crónica (ETC), lesión cerebral traumática (TBI), apoplejía y tauopatía de la materia blanca con inclusiones gliales globulares. Más preferentemente, la tauopatía se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y demencia frontotemporal (FTD). Más preferentemente, la tauopatía se selecciona entre demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y demencia frontotemporal (FTD).
- 40
- 45
- 50
- 55 En otros términos, la invención también proporciona compuestos para su uso en un método para tratar y/o prevenir una tauopatía, en particular, los citados anteriormente, así como realizaciones de los mismos, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de Fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en el presente documento.
- 60 En una realización particular, la invención también se refiere a un compuesto de Fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, como se define en el presente documento para su uso en retrasar, en un paciente, la aparición de una tauopatía según lo descrito anteriormente.
- 65 En otros términos, la invención proporciona compuestos para su uso en un método para retrasar, en un paciente, la aparición de una tauopatía, que comprende administrar, a un paciente que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del

mismo.

De acuerdo con una característica adicional de la presente invención, se proporcionan compuestos para su uso en un método para modular el metabolismo patológico de Tau, en un paciente, preferentemente un animal de sangre caliente, y aún más preferentemente, un ser humano, que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Más preferentemente, se proporcionan compuestos para su uso en un método para alterar la fosforilación patológica de la proteína Tau en un paciente, preferentemente un animal de sangre caliente, y aún más preferentemente, un ser humano, que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar, a dicho paciente, una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En general, para un uso farmacéutico, el compuesto de Fórmula I, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, puede formularse como una composición farmacéutica que comprende al menos el compuesto de la invención, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, y al menos un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos y/o principios activos adicionales.

Por medio de ejemplos no limitantes, la composición farmacéutica puede estar en una forma de dosificación adecuada para la administración oral, para la administración parenteral (tal como mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, o infusión intravenosa), para la administración tópica (incluyendo ocular), para la administración por inhalación, mediante un parche dérmico, mediante un implante, mediante un supositorio, etc. Dichas formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, según la forma de administración, así como los métodos y los vehículos, diluyentes y excipientes para su uso en la preparación de los mismos, serán evidentes para el experto en la materia; se hace referencia a la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences". Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma sólida y volverse a disolver o suspenderse antes de su uso.

Algunos ejemplos preferidos, pero no limitantes, de formas farmacéuticas incluyen comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pomadas, cremas, lociones, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, gotas, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles (que, en general, se reconstituyen antes de su uso) para la administración en forma de un bolo y/o para la administración continua, que pueden formularse con vehículos, excipientes y diluyentes que sean adecuados en sí para dichas formulaciones, tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, celulosa, agua (estéril), metilcelulosa, metil- y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, aceites comestibles, aceites vegetales y aceites minerales o mezclas adecuadas de los mismos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener opcionalmente otras sustancias que se usan comúnmente en formulaciones farmacéuticas, tales como agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes dispersantes, agentes disgregantes, agentes estabilizantes, agentes isotónicos, agentes de carga, cargas, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes colorantes, agentes antibacterianos y/o agentes antifúngicos tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, agentes dispensadores, reguladores de flujo, agentes de liberación, etc. Las composiciones también pueden formularse para proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada de los compuestos activos contenidos en las mismas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención están preferentemente en una forma de dosificación unitaria, y pueden envasarse adecuadamente, por ejemplo, en una caja, un blíster, un vial, un frasco, un sobrecito, una ampolla o en cualquier otro soporte o recipiente monodosis o multidosis adecuado (que puede estar debidamente etiquetado); opcionalmente, con uno o más folletos que contengan información del producto y/o instrucciones de uso. En general, dichas dosis unitarias contendrán entre 0,05 y 1.000 mg, y en general, entre 1 y 500 mg, de al menos un compuesto de la invención, por ejemplo, aproximadamente 10, 25, 50, 100, 200, 300 o 400 mg por dosis unitaria.

Normalmente, dependiendo de la afección que se va a prevenir o tratar y de la vía de administración, el compuesto activo de la invención generalmente se administrará entre 0,01 y 100 mg por kilogramo, más normalmente, entre 0,1 y 50 mg, tal como entre 1 y 25 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 o 25 mg, por kilogramo de peso corporal del paciente al día, que puede administrarse como una sola dosis diaria, dividida en una o más dosis diarias, o esencialmente de forma continua, por ejemplo, usando una infusión por goteo.

El compuesto de Fórmula I de la invención, y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables, pueden prepararse de diferentes maneras mediante reacciones conocidas por el experto en la materia. Los esquemas de reacción que se describen en el apartado de ejemplos ilustran a modo ilustrativo diferentes enfoques posibles.

Las sales y los solvatos de los mismos pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia, tales como las que implican precipitación, cristalización, recristalización, liofilización, transferencia de fase o resinas de

intercambio iónico.

En general, las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de Fórmula I pueden prepararse, por ejemplo, de la siguiente manera:

- 5 (i) haciendo reaccionar el compuesto de Fórmula I con el ácido deseado;
- (ii) convirtiendo una sal del compuesto de Fórmula I en otra mediante la reacción con un ácido apropiado o por medio de una columna de intercambio iónico adecuada.
- 10 Todas estas reacciones se llevan a cabo normalmente en solución. La sal puede precipitar de la solución y recogerse por filtración o puede recuperarse por evaporación del disolvente. El grado de ionización en la sal puede variar desde completamente ionizado hasta casi no ionizado.

### Definiciones

15 Las definiciones y explicaciones que figuran a continuación son para los términos que se usan en toda la solicitud, incluyendo tanto la memoria descriptiva como las reivindicaciones.

20 En el presente documento, a menos que se indique lo contrario, cualquier referencia a los compuestos de la invención, significa el compuesto de Fórmula I como tal, así como sus sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables.

25 Cuando se describen los compuestos de la invención, los términos usados deben interpretarse de acuerdo con las siguientes definiciones, a menos que se indique lo contrario.

Los términos "sal" se refieren a cualquier sal de adición de ácido obtenida del compuesto de la invención, teniendo dicha sal una actividad biológica esencialmente similar en comparación con la actividad biológica del compuesto de la invención. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos no limitantes incluyen las sales de acetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato, carbonato, bisulfato, sulfato, borato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrogenofosfato/dihidrogenofosfato, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, tanato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato y xinafoato. También pueden formarse hemisales de ácidos, por ejemplo, sales de hemisulfato. Preferentemente, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de clorhidrato, bromhidrato, bisulfato, sulfato, nitrato, citrato, acetato y fosfato. En particular, se prefiere el clorhidrato.

40 El término "solvato" se usa en el presente documento para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol o agua. El término "hidrato" se emplea cuando dicho disolvente es agua.

45 Todas las referencias a compuestos de Fórmula I incluyen las referencias a sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de la invención incluyen compuestos de Fórmula I como se ha definido anteriormente en el presente documento, que incluyen todos los polimorfos y hábitos cristalinos de los mismos, profármacos e isómeros de los mismos (incluyendo los isómeros ópticos, geométricos y tautoméricos) y compuestos marcados isotópicamente de Fórmula I.

50 El término "paciente" se refiere a un animal de sangre caliente, más preferentemente, un ser humano, que/quien está a la espera de recibirlo, o está recibiendo atención médica o es/será el objeto de un procedimiento médico.

55 El término "ser humano" se refiere a un sujeto de ambos sexos y en cualquier etapa de desarrollo (es decir, neonato, lactante, juvenil, adolescente, adulto). En una realización, el ser humano es un adolescente o un adulto, preferentemente, un adulto.

60 Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", como se usan en el presente documento, pretenden incluir el alivio, la atenuación o anulación de una afección o enfermedad y/o sus síntomas asociados.

Los términos "prevenir", "previene" y "prevención", como se usan en el presente documento, se refieren a un método para retrasar o impedir la aparición de una afección o enfermedad y/o sus síntomas asociados, impidiendo que un paciente adquiera una afección o enfermedad, o reduciendo el riesgo de que un paciente adquiera una afección o enfermedad.

65 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" (o, más simplemente, una "cantidad eficaz"), como se usa en el

presente documento, significa la cantidad de agente activo o principio activo (por ejemplo, *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina) que sea suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en el paciente al que/a quién se administra.

5 El término “administración”, o una variante del mismo (por ejemplo, “administrar”), significa proporcionar el agente activo o principio activo *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina, solo o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable, al paciente en el que/en quien se debe tratar o prevenir la afección, el síntoma o la enfermedad.

10 Por “farmacéuticamente aceptable” se entiende que los ingredientes de una composición farmacéutica son compatibles entre sí y no perjudiciales para el paciente.

La expresión “vehículo farmacéutico”, como se usa en el presente documento, significa un vehículo o medio inerte usado como disolvente o diluyente en el que se formula y/o administra el agente farmacéuticamente activo. Los ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticos incluyen cremas, geles, lociones, soluciones y liposomas.

La presente invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos pretenden ser representativos de realizaciones específicas de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

## 20 Descripción de las figuras

**Figura 1:** Determinación mediante electroforesis en gel 1D de la expresión de la proteína Tau usando anticuerpos Pan-Tau (Tau-Nter, Tau-Cter) y de la fosforilación de la proteína Tau usando anticuerpos Tau dependientes de la fosforilación (S199P, S396) y epítipo no fosforilado comprendido entre 198-205 (Tau-1), en condiciones no inducidas (NI), inducidas, pero no tratadas (NT) y con administración de HCl•Compuesto I.

**Figura 2:** Determinación mediante electroforesis en gel 2D de la expresión de la proteína Tau usando anticuerpos Pan-Tau (Tau-Nter, Tau-Cter) y de la fosforilación de la proteína Tau mediante el uso del anticuerpo Tau dependiente de la fosforilación (S396), con una afección inducida, pero no tratada (Control) y con la administración de HCl•Compuesto I.

**Figura 3:** Aumento de los catabolitos C-terminales de Tau y reducción de la fosforilación en la serina 199. El patrón 2D de las proteínas Tau del cerebro de los animales WT tratados con 0,5 mg/Kg o 1 mg/Kg se reveló como un anticuerpo pan-Tau (Tau- Cter) y un anticuerpo dependiente de la fosforilación contra la serina 199 fosforilada.

**Figura 4:** Evaluación del laberinto de agua de Morris de la memoria espacial de ratones C57BL/6J de tipo silvestre (WT) y ratones Thy-Tau22, tratados o no con 0,5 mg/kg de HCl•Compuesto I.

A: Representación de la distancia hasta alcanzar la plataforma (longitud del recorrido) en función del tiempo (días).  
B: Representación del porcentaje de tiempo empleado en el cuadrante diana (“T”) (donde la plataforma se posiciona durante la fase de aprendizaje) frente a los demás (“O”).

**Figura 5:** Medición inmunohistoquímica de la patología de tau en ratones Thy-Tau22 no tratados (0 mg/kg) o tratados con HCl•Compuesto I (HCl•Compuesto I a 0,5 mg/kg).

**Figura 6:** Análisis bioquímico de la expresión de Tau, catabolitos y fosforilación mediante SDS-PAGE 1D y transferencia Western.

## EJEMPLOS QUÍMICOS

Las siguientes abreviaturas se usan en toda la presente solicitud: °C: grados centígrados, BINAP: 2,2'-bis(difenilfosfin)-1,1'-binaftilo, dba: dibencilidenoacetona, DCE: dicloroetano, DCM: diclorometano, δ: desplazamientos químicos de RMN expresados en ppm, equiv.: equivalente/s, Et: etilo, g: gramo/s, HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento, l: litro/s, LCMS: HPLC acoplada a espectrómetro de masas, Me: metilo, mg: miligramo/s, min: minuto/s, ml: mililitro/s, mol: mol/es, mmol: milimol/es, μmol: micromol/es, EM: Espectrometría de Masas, RMN: Resonancia Magnética Nuclear, ppm: partes por millón, TA: temperatura ambiente (aprox. 15-25 °C), Xantphos: 4,5-Bis(difenilfosfin)-9,9-dimetilxanteno, tr: tiempo de retención.

Todas las temperaturas informadas se expresan en grados centígrados (°C); todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (TA) a menos que se indique lo contrario.

## Materiales y métodos

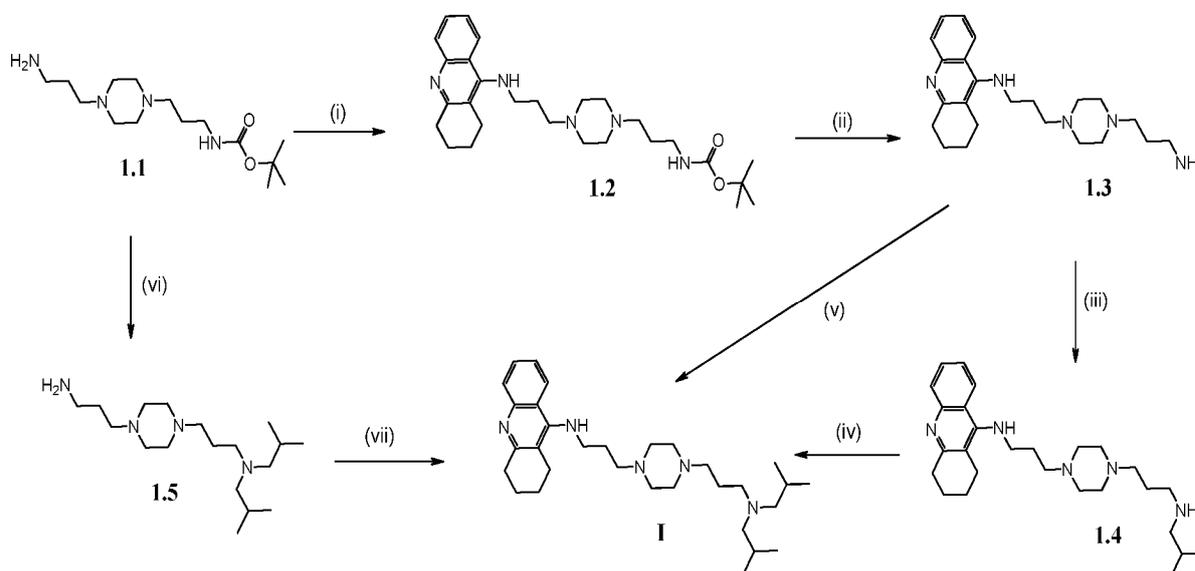
Los productos químicos y disolventes se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional a

menos que se indique lo contrario. Las reacciones se controlaron mediante TLC realizada en láminas Macherey-Nagel Alugram® Sil 60/UV<sub>254</sub> (espesor de 0,2 mm). La purificación de los productos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna usando gel de sílice Macherey-Nagel (malla 230-400).

5 Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker DRX 300 (funcionando a 300 MHz para <sup>1</sup>H y 75 MHz para <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm en relación con el tetrametilsilano (TMS) o con la señal de protones residual en disolventes deuterados. Los cambios químicos se presentan en forma de posición ( $\delta$  en ppm), multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, sept = septuplete, a = ancho y m = masivo), constante de acoplamiento (J en Hz), integral relativa y asignación. Las atribuciones de protones y carbonos se  
10 realizaron mediante el análisis de experimentos 1D y 2D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C).

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas Varian de triple cuadrupolo de 1.200 W dotado de una columna Super ODS TSK-gel no polar C18 (4,6 x 50 mm), usando ionización por electronebulización y un detector de UV (matriz de diodos).

15 El compuesto de fórmula I se puede preparar de acuerdo con los tres métodos establecidos en el Esquema 1 que se presenta a continuación.



20

Esquema 1

Reactivos y condiciones: (i) 9-Cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Xantphos, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, dioxano, reflujo; (ii) Dioxano saturado en HCl, 20 °C; (iii) Isobutiraldehído, NaBH<sub>4</sub>, DCE, 20 °C; (iv) Isobutiraldehído o isobutiraldehído-d<sub>7</sub>, NaBH<sub>4</sub>, DCE, 20 °C; (v) Isobutiraldehído o Isobutiraldehído-d<sub>7</sub>, STAB, DCM, 20 °C (vi) *J. Med. Chem.* 2003, 46, 542-557; (vii) 9-Cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, BINAP, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, dioxano, reflujo.

25

### Ejemplo 1: síntesis de *N*-[3-(4-{3-[(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino]propil]piperazin-1-il)propil]carbamato terc-butílico (1.2)

30

En un matraz secado al horno y bajo atmósfera de nitrógeno, se pusieron 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina (0,50 g, 2,3 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,05 g, 3,22 mmol) en dioxano (7,45 ml). La mezcla se desoxigenó pasando una corriente de nitrógeno a través de la misma. Se añadieron Xantphos (0,20 g, 0,35 mmol) y Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (0,11 g, 0,12 mmol). Luego, se añadió *N*-[3-[4-(3-aminopropil)piperazin-1-il]propil]carbamato **1.1** preparado de acuerdo con *J. Med. Chem.* 2003, 46, 542-557 (0,83 mg, 2,76 mmol) disuelto en dioxano (7,45 ml) a la mezcla. La mezcla de reacción se agitó durante  
35 24 horas. La solución se filtró a través de una capa de celite y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (eluyente DCM/MeOH del 0 al 10 %, luego NH<sub>3</sub> sat. de DCM/MeOH del 0 al 4 %). El compuesto del título (1,00 g, rendimiento del 90 %) se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo.

35

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7,95 (dd, <sup>3</sup>J = 1,1 Hz, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, 1H); 7,82 (dd, <sup>3</sup>J = 0,9 Hz, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H); 7,45 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,2 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,2 Hz, 1H); 7,24 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,2 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,3 Hz, 1H); 5,53 (t a, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz, 1H); 5,06 (t a, <sup>3</sup>J = 5,4 Hz, 1H); 3,48 (m, 2H); 3,12 (m, 2H); 2,98 (t, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 2H); 2,66 (t, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 2H); 2,55-2,32 (M, 12H); 1,85-1,72 (M, 6H); 1,59 (m, 2H), 1,35 (s, 9H).

40

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158,4; 156,0; 151,0; 147,5; 128,7; 128,0; 123,3; 123,0; 120,3; 115,9; 78,7; 57,0; 53,2; 48,9; 39,8; 34,0; 28,4; 27,2; 26,4; 25,7; 22,9.

45

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculado:** 482,3, **Observado:** 482,4 [M+H]<sup>+</sup>, 382,2 [M+H-Boc]<sup>+</sup>; tr: 1,8 min

**Ejemplo 2: *N*-[3-[4-(3-(3-aminopropil)piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (1.3)**

Se disolvió *N*-[3-(4-{3-[(1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-il)amino]propil}piperazin-1-il)propil]carbamato 1.2 (90 mg, 0,19 mmol) en dioxano saturado con HCl (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 15 horas. El disolvente se evaporó. El residuo se disolvió en MeOH(NH<sub>3</sub>) y se agitó durante 2 horas. El disolvente se evaporó. El residuo se disolvió en 15 ml de DCM y se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) a 9,4:0,6 (v/v)). El compuesto del título (70 mg, rendimiento del 98 %) se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo.

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8,01 (dd, <sup>4</sup>J = 0,9 Hz, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, 1H); 7,87 (dd, <sup>4</sup>J = 0,9 Hz, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, 1H); 7,51 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,4 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,3 Hz, 1H); 7,30 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,3 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,3 Hz, 1H); 5,13 (s a, 1H); 3,55 (t, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 2H); 3,04 (t, <sup>3</sup>J = 6,4 Hz, 2H); 2,71 (M, 4H); 2,65-2,37 (M, 12H); 1,91-1,79 (M, 8H); 1,64 (m, 2H).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158,4; 151,1; 147,5; 128,7; 128,1; 123,4; 123,0; 120,3; 115,9; 57,0; 53,4; 49,0; 40,8; 34,0; 30,5; 27,2; 25,7; 22,9.

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculado:** 382,3, **Observado:** 382,2 [M+H]<sup>+</sup>; tr: 1,3 min;

**Ejemplo 3: *N*-[3-(4-{3-[(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (1.4)**

A una solución agitada de *N*-[3-[4-(3-aminopropil)piperazin-1-il]propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina 1.3 (100 mg, 0,26 mmol) en tolueno (5 ml), se añadió isobutiraldehído (0,04 ml, 0,4 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo con un aparato de Dean-Stark durante 1 hora (hasta que no aparecieron más gotas). Se evaporó el tolueno, y el residuo se disolvió en DCE (5 ml). Se añadió NaBH<sub>4</sub> (15 mg, 0,4 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 horas. Se añadieron 10 ml de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se agitó durante 1 hora. Se añadieron 5 ml de DCM, y se separaron las capas. Se lavó la capa orgánica con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El compuesto se usó sin purificación para la siguiente etapa.

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8,03 (dd, <sup>4</sup>J = 1,0 Hz, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, 1H); 7,90 (dd, <sup>4</sup>J = 0,9 Hz, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, 1H); 7,54 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,3 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,3 Hz, 1H); 7,33 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,3 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,3 Hz, 1H); 5,14 (s a, 1H); 3,57 (m, 2H); 3,05 (t, <sup>3</sup>J = 6,2 Hz, 2H); 2,74 (t, <sup>3</sup>J = 5,5 Hz, 2H); 2,65 (t, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, 2H); 2,56-2,40 (M, 14H); 1,94-1,66 (M, 11H); 0,92 (d, <sup>3</sup>J = 6,6 Hz, 6H).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158,5; 151,1; 147,6; 128,8; 128,1; 123,4; 123,0; 120,3; 116,0; 58,2; 57,4; 53,5; 49,0; 34,1; 28,5; 27,2; 25,7; 23,0; 20,7.

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculado:** 438,3, **Observado:** 438,3 [M+H]<sup>+</sup>; tr: 1,5 min.

**Ejemplo 4: Isobutiraldehído-*d*7: 2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metil(2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)propanal***N*-Metoxi-2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metil-*N*-metil(<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)propanamida

A una solución agitada de ácido 2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metil(<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)propanoico (93 μl, 1 mmol) en DCM (3,8 ml), se añadieron *N*-metilmorfolina (0,715 ml, 6,5 mmol), EDC 1HCl (249 mg, 1,3 mmol), HOBt (175 mg, 1,3 mmol) y clorhidrato de *N*,*O*-dimetil-hidroxilamina (204 mg, 2,1 mmol). La mezcla se agitó durante 15 horas. Se añadieron 5 ml de DCM a la mezcla de reacción y se lavó la capa orgánica con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 ml), solución de HCl 1 M (2 x 5 ml) y salmuera (1 x 5 ml).

La capa orgánica se usó sin evaporación ni purificación para la siguiente etapa.

**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 3,70 (s, 3H, H<sub>b</sub>); 3,19 (s, 3H, H<sub>a</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 178,3; 61,4; 32,3; 29,1; 18,3.

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculado:** 139,2, **Observado:** 139,8 [M+H]<sup>+</sup>

Isobutiraldehído-*d*7: 2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metil(2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)propanal

A una solución de *N*-metoxi-2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)metil-*N*-metil(<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)propanamida en DCM (5 ml, 1 mmol), se añadió LiAlH<sub>4</sub> (0,9 ml, 0,9 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora. Se añadió solución saturada de KHSO<sub>4</sub> (4,2 ml) gota a gota. Se añadieron 5 ml de DCM y la capa orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 ml), solución de HCl 1 M (2 x 5 ml) y salmuera (1 x 5 ml). La capa orgánica se secó, se filtró y se usó tal cual.

**Ejemplo 5: *N*-[3-(4-{3-[Bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (I)**Primer protocolo (iv)

A una solución agitada de *N*-[3-(4-{3-[(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina 1.4 (230 mg, 0,52 mmol) en tolueno (10 ml), se añadió isobutiraldehído (0,07 ml, 0,8 mmol). La mezcla de reacción se calentó con un aparato de Dean-Stark durante 1 hora (hasta que no aparecieron más gotas de agua). Se evaporó el tolueno, y el residuo se disolvió en DCE (10 ml). Se añadió NaBH<sub>4</sub> (30 mg, 0,8 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 horas. Se añadieron 15 ml de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La mezcla se agitó durante 1 hora. Se añadieron 10 ml de DCM, y se separaron las capas. Se lavó la capa orgánica con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x

15 ml). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre alúmina (eluyente DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 9,8:0,2 (v/v)).

El compuesto del título (30 mg, rendimiento del 12 %) se obtuvo en forma de un aceite incoloro.

5

#### Segundo protocolo (v)

A la capa orgánica que contenía isobutiraldehído-*d*7 (Ejemplo 4), se añadió *N*-[3-[4-(3-aminopropil)piperazin-1-il]propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina **1.3** (80 mg, 0,21 mmol). La mezcla se agitó durante 1 hora y se añadió STAB (190 mg, 0,899 mmol). La mezcla se agitó durante 15 horas. Se añadieron 5 ml de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y la mezcla se agitó durante 1 hora. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 5 ml). La capa orgánica se secó, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), de 10:0 a 9,5:0,5 (v/v)).

10

15 El compuesto del título (36 mg, rendimiento del 34 %) se obtuvo en forma de un aceite incoloro.

#### Tercer protocolo (vii)

En un matraz secado al horno y bajo atmósfera de nitrógeno, se pusieron 9-cloro-1,2,3,4-tetrahidroacridina (257 mg, 1,12 mmol), (+/-) BINAP (167 mg, 0,15 equiv.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (546 mg, 1,4 eq), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (162 mg, 0,15 eq) y 3 ml de 1,4-dioxano seco. Se añadió *N*-[3-[4-(3-aminopropil)piperazin-1-il]propil]-*N*-isobutil-2-metil-propan-1-amina **1.5** (349 mg, 2,07 mmol) preparada de acuerdo con Ryckebusch A *et al. J. Med. Chem.* 2003, 46, 542-557 en dioxano seco (3 ml), y la mezcla se agitó a 90 °C durante 12 h. La solución se filtró a través de una capa de celite y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH//95/5).

20

25

El compuesto del título (419 mg, rendimiento del 12 %) se obtuvo en forma de un aceite incoloro.

#### Caracterización de *N*-[3-[4-(3-aminopropil)piperazin-1-il]propil]-*N*-isobutil-2-metil-propan-1-amina 1.5:

30 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 3,05 (t, <sup>3</sup>J = 7,2 Hz, 2H); 3,00-2,60 (M, 18H); 2,10-1,80 (M, 6H); 1,02 (d, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 12H).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 61,1; 53,8; 53,5; 50,7; 37,6; 24,2; 22,5; 21,3; 19,5.

**LC-MS (ESI) m/z** calculado: 313,3, encontrado: 313,2 [M+H]<sup>+</sup>; tr: 1,15 min

#### Caracterización de *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina I:

##### **compuesto con <sup>1</sup>H**

40 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8,45 (d, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H); 7,8-7,9 (M, 2H); 7,64 (ddd, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, <sup>3</sup>J = 6,7 Hz, <sup>4</sup>J = 1,1 Hz, 1H); 4,14 (t, <sup>3</sup>J = 6,6 Hz, 2H); 3,6-4,1 (M, 8H); 3,35-3,55 (M, 6H); 3,11 (d, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 4H); 3,0-3,1 (M, 2H); 2,79 (m, 2H); 2,5-2,3 (M, 4H); 2,20 (sept, <sup>3</sup>J = 6,6 Hz, 2H); 1,9-2,0 (M, 4H); 1,09 (d, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 12H).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 156,5; 150,9; 138,2; 132,8; 125,5; 124,9; 118,8; 115,9; 112,2; 61,1; 51,2; 44,3; 28,1; 24,7; 24,0; 21,6; 20,4; 19,5; 19,4; 18,1.

**LC-MS (ESI) m/z** Calculado: 494,4, Observado: 494,4 [M+H]<sup>+</sup>; tr: 1,4 min;

45

##### **compuesto con *d*14**

50 **RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8,04 (dd, <sup>4</sup>J = 0,9 Hz, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7,90 (dd, <sup>4</sup>J = 0,7 Hz, <sup>3</sup>J = 7,7 Hz, 1H, H<sub>8</sub>); 7,54 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,3 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7,32 (ddd, <sup>4</sup>J = 1,2 Hz, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, <sup>3</sup>J = 8,3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 5,27 (s a, 1H, NH); 3,59 (m, 2H, H<sub>d</sub>); 3,07 (t, <sup>3</sup>J = 5,4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>); 2,73 (t, <sup>3</sup>J = 5,8 Hz, 2H, H<sub>1</sub>); 2,57-2,40 (M, 14H, H<sub>a</sub>, H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>d</sub>); 2,04 (s, 4H, H<sub>e</sub>); 1,96-1,82 (M, 6H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>c</sub>); 0,92 (m, 2H, H<sub>c</sub>).

**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158,3; 151,2; 147,3; 128,6; 128,2; 123,4; 123,1; 120,2; 115,8; 63,7; 57,4; 53,5; 49,2; 33,9; 27,2; 25,8; 22,9; 20,4; 19,4.

**LC-MS (ESI) m/z** Calculado: 508,5, Observado: 508,4 [M+H]<sup>+</sup>; tr: 1,5 min;

55

#### **Ejemplo 6: Clorhidrato de *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil}piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina**

60 Se formó el clorhidrato del compuesto con <sup>1</sup>H del Ejemplo 5 obtenido de acuerdo con el tercer protocolo del Ejemplo 5 después del tratamiento con MeOH/HCl. El compuesto del Ejemplo 5 se solubilizó en MeOH, se trató con HCl 1 M hasta pH = 1 y luego se liofilizó.

**EJEMPLOS BIOLÓGICOS****Materiales y métodos**5 Anticuerpos

Los anticuerpos Tau dependientes de la fosforilación y Pan-Tau incluían Tau-Nter (M19G, 1/10.000, Sergeant *et al.*, 1999), Tau-Cter (1/10.000, Sergeant *et al.*, 1999, Le Freche *et al.*, 2012), Tau-1 (1/5.000, Merck Millipore), S199P (dirigido contra la serina fosforilada 199, 1/4.000, Sergeant *et al.*, 1999), S396 fosforilada de Tau (dirigido contra la fosforserina 396, 1/10.000, Lifetechnologies), 404 fosforilada de Tau (1/10.000, Lifetechnologies), 422 (clon 2H9, un anticuerpo monoclonal casero desarrollado contra un péptido fosforilado que contiene el resto serina 422 fosforilado de Tau, numeración de acuerdo con la isoforma de Tau-441 de cerebro humano más larga), AT8 (1/1.000, Thermo Scientific), AT270 (1/2000, Thermo Scientific), AT100 (1/1.000, Thermo Scientific). La enolasa específica de las neuronas (1/10.000),  $\beta$ -actina (1/5.000) y  $\beta$ -tubulina (1/10.000) se adquirieron en Sigma-Aldrich.

15

Cultivo y transfección celular

Las células de la estirpe celular de neuroblastoma humano SKNSH-SY5Y que expresan la isoforma 412 de Tau humana (con las secuencias codificantes del exón 2 y 10) (o SY5Y-Tau46) fueron como se ha descrito previamente en Bretteville *et al.*, 2009.

20

Tratamiento farmacológico

Se trataron células de neuroblastoma SKNSH-SY5Y que expresan la isoforma 412 de Tau humana (con las secuencias codificantes del exón 2 y 10) con 10  $\mu$ M de la sal clorhidrato de *N*-[3-(4-{3-[bis(2-metilpropil)amino]propil]piperazin-1-il)propil]-1,2,3,4-tetrahidroacridin-9-amina (Ejemplo 6, en adelante denominado "HCl•Compuesto I") que se diluyó en el medio de cultivo como se describe en Bretteville *et al.*, 2009.

25

Tratamiento de animales

30

Se adquirieron animales C57BL/6J de tipo silvestre de 3 meses en Charles Rivers Laboratories (Francia) y se dejó que se aclimataran en las instalaciones de los animales durante al menos una semana antes de cualquier tratamiento. Las colonias transgénicas Thy-Tau22 (antecedentes genéticos de C57BL/6J) se obtuvieron cruzando machos heterocigotos Thy-Tau22 con hembras C57BL/6 de tipo silvestre. La estirpe transgénica de ratón Thy-Tau22 muestra una patología Tau similar a la enfermedad de Alzheimer progresiva específica de la neurona sin déficit motor. En este modelo, se observa un desarrollo progresivo de NFT en el hipocampo y en la amígdala, que son paralelos a las deficiencias en el comportamiento (Schindowski *et al.*, 2006). Además, en el hipocampo, las especies de Tau hiperfosforiladas y fosforiladas de manera anómala se acumulan dentro de la zona somatodendrítica (Schindowski *et al.*, 2006).

35

40

Todos los animales se alojaron en una instalación libre de patógenos de 5 a 6 animales por jaula (jaulas Techniplast 1284L). Tenían acceso libre a alimentos y agua en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y se mantuvieron a una temperatura constante de 22 °C.

45

Para el tratamiento con animales, los animales se distribuyeron al azar y se administró el compuesto de Fórmula I en el agua de bebida a una concentración final de 0,5 o 1 mg/kg. Los botes de bebida se cambiaron una vez a la semana, el consumo de volumen se midió a lo largo del periodo de tratamiento. Se evaluaron el consumo de comida y el peso corporal. En animales de tipo silvestre, el estudio piloto del tratamiento farmacológico se realizó durante un mes para establecer la inocuidad del tratamiento con el compuesto de Fórmula I. Esto se basó en las evaluaciones fisiológicas, sociales y de comportamiento. Los machos Thy-Tau22 fueron tratados durante 4 meses a partir de los 3 meses de edad. Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética local (n.º 342012, CEEA).

50

Evaluación de la memoria espacial usando el laberinto de agua de Morris

55

Antes de cualquier prueba de comportamiento, se evaluaron las exploraciones y la locomoción del animal tratado y no tratado en un escenario de campo abierto (OF) de 25 cm x 25 cm. Se realizaron simultáneamente cuatro adquisiciones en el escenario unido. Cada ratón se colocó en el escenario y se dejó que explorara durante al menos 5 min. Los parámetros que incluyen la distancia, la velocidad escalar, y la velocidad se adquirieron mediante la grabación de vídeo usando el equipo y software de seguimiento de vídeo EthoVision (Noldus, Information Technology, París, Francia) en una sala dedicada para ello. La ansiedad, que podría interferir con la prueba de la memoria, fue evaluada mediante el laberinto elevado en cruz (EPM). Los ratones se colocaron en el centro de un laberinto en forma de cruz que consistía en dos brazos abiertos de 10 cm de ancho y dos brazos cerrados elevados a 50 cm del suelo. Se evaluaron la locomoción, la distancia, la velocidad escalar y la velocidad, así como el número de entradas en los brazos, el tiempo transcurrido en los brazos abiertos frente al de los cerrados, el porcentaje de entradas en los brazos abiertos y el tiempo por minuto dedicado en los brazos abiertos en un total de 5 minutos de prueba.

65

Laberinto de agua de Morris

Las capacidades de memoria y aprendizaje espacial se evaluaron en una versión convencional de adquisición y retención de plataforma oculta de la tarea del laberinto de agua de Morris (Van der Jeugd *et al.*, 2013). Se llenó una piscina circular de 90 cm con agua opacificada con pintura blanca no tóxica y se mantuvo a 21 °C. Se ocultó una plataforma redonda de rescate de 10 cm, 1 cm debajo de la superficie del agua en una posición fija. Se designaron arbitrariamente cuatro posiciones alrededor del borde del tanque para dividirlo en cuatro los puntos cardinales (Norte, Este, Oeste y Sur) delimitando cuatro cuadrantes. Este cuadrante diana contiene la plataforma de rescate, rodeada por un cuadrante adyacente y un cuadrante opuesto. En la prueba de adquisición, cada ratón realizó cuatro pruebas de natación al día con al menos 10 min de intervalo intertrial, durante cuatro días consecutivos de entrenamiento. La posición inicial fue pseudoaleatoria en todos los ensayos. Los ratones que no pudieron encontrar la plataforma oculta en 2 min se colocaron manualmente en la plataforma. Se les permitió permanecer en ella durante 15 s antes de volver a colocarlos en sus jaulas. El tiempo requerido para encontrar la plataforma de rescate oculta (latencia de escape) se usó como un índice de aprendizaje espacial y se registró usando el sistema de seguimiento de vídeo Ethovision XT (Noldus, Francia). También se midieron la velocidad escalar de natación y la distancia total. 72 h después de la fase de adquisición, se retiró la plataforma oculta y se evaluó la memoria espacial en un ensayo de sondeo de 60 s. La proporción de tiempo pasado en el cuadrante diana frente a los otros cuadrantes se consideró como un índice de memoria espacial.

Muestras de cerebro de ratón

Tras la evaluación del comportamiento, se extrajo sangre en tubos de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf, Francia), los ratones se sacrificaron por dislocación cervical para evitar cualquier modificación instrumental a la anestesia (Lefreche *et al.* 2012). Se diseccionaron hipocampos y cortezas, y se congelaron instantáneamente en tubos de 1,5 ml (Eppendorf). El tejido se homogenizó en tampón de Tris-HCl (10 mM pH 7,4) que contenía sacarosa 320 mM, inhibidores de la proteasa (sin mini EDTA completo, Roche) tratados con ultrasonidos y centrifugados a 12.000 xg durante 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se logró la concentración de proteínas usando el kit de ensayo de cuantificación de proteínas BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sobrenadante se procesó además para los análisis bioquímicos o se mantuvo a -80 °C. Para geles 1D o 2D, se usó el mismo tampón de lisis. Por lo tanto, se añadió una cantidad igual de proteína en el tampón Tris con una solución que contenía urea 7 M, tiourea 2 M con SDS al 2 % y se sometió a ultrasonidos a 60 Hz 30 pulsos.

SDS-PAGE 1D y transferencia Western

Para el análisis de transferencia Western de proteínas Tau, se realizó la SDS-PAGE de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando gel de acrilamida en gradiente de Bis-Tris al 4-12 % (NuPage® Bis-Tris PreCast 12 pocillos, Life Technologies). Los pesos moleculares aparentes se calibraron usando los marcadores de peso molecular (Novex y Magic Marks, Life Technologies). La electroforesis se realizó bajo una tensión continua de 100 V/por gel durante 1 h. Las proteínas se tiñeron de manera reversible con Ponceau Red para verificar la calidad de la eficacia de la transferencia de proteínas. Para la transferencia Western, se bloquearon las membranas en Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1 % (v/v) (TBS-T) y 5 % (p/v) de leche desnatada (TBS-M) durante 30 min, y se incubaron durante la noche a 4 °C el anticuerpo primario. Se enjuaga la membrana de nitrocelulosa tres veces agitando suavemente en TBS-T durante 10 min cada vez. Luego, se incubó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (cadenas H + L), Vector Laboratories). Los complejos inmunorreactivos se revelaron usando el kit de transferencia Western ECL™ y la adquisición de imágenes se realizó con el analizador de imágenes de luminiscencia LAS-3000 (FujiFilm Lifesciences) o se expuso a Amersham Hyperfilm ECL™ (G&E healthcare). Las imágenes digitalizadas se procesaron con el programa informático ImageJ (NIH).

Electroforesis en gel bidimensional

La electroforesis en gel bidimensional se realizó de acuerdo con el procedimiento recientemente publicado (Fernández-Gómez *et al.*, 2014). Brevemente, se enjuagaron las células una vez con PBS y se lisaron en tampón UTS (urea 7 M, tiourea 2 M, SDS al 2 %) y se sometieron a ultrasonidos a 60 Hz 30 pulsos. El lisado se precipitó con metanol/cloroformo. Se precipitaron 50 µg de proteínas usando el procedimiento de cloroformo/metanol y el sedimento se disolvió en tampón 2D [urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4 % y Pharmalytes 3-10 al 0,6 % (G&E Healthcare)]. Se rehidrataron 3-11 tiras de gradiente de pH inmovilizadas Immobiline™ DryStrip de 11 cm (G&E Healthcare) con 200 µl que contenían una cantidad final de 50 µg de proteína, y se logró el isoelectroenfoco con un IPGPhor III (G&E Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las tiras se estratificaron en un gel de poli-acrilamida de Bis-Tris al 4-12 % de XT™ Precast Criterion (BioRad) y se procesaron con una tensión constante de 100 V como se describe para la SDS-PAGE 1D. La transferencia Western se realizó como se ha descrito anteriormente para la SDS-PAGE 1D y la transferencia Western.

Cuantificación de Tau en plasma de ratón

La dosis de Tau h se logró usando los kits de ELISA Innotest® para Tau total y Tau h fosfo-181 (Fujirebio Europe) de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. La dosis de Tau h o Tau fosforilada se realizó con 25 o 75 µl de plasma.

#### Inmunofluorescencia

5 Se sembraron células de neuroblastoma SY5Y-APPWT en portaobjetos de cámara de cultivo celular (Labtek) y se dejaron crecer en DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10 %. El tratamiento con compuestos se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito en el párrafo del tratamiento farmacológico. Tras 48 h, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M (PBS) durante 15 min a temperatura ambiente. Las  
10 células se lavaron 3 veces con PBS enfriado con hielo y se bloquearon con PBS complementado con BSA al 1 %. Los anticuerpos se incubaron durante la noche a 4 °C en PBS-BSA, se enjuagaron 3 veces con PBS enfriado con hielo y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con rodamina o FTIC secundario (Lifesciences Technologies). Se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con Vectashield con medio de montaje DAPI (Laboratorios Vector). Se adquirieron imágenes con un microscopio Zeiss Apotome o un microscopio confocal Leica.  
15 Todos los datos se analizaron usando un programa informático Photoshop Element 6 (Adobe) sin ninguna modificación de las imágenes en bruto.

#### Inmunohistoquímica

20 Se incubaron secciones coronales en serie (n = 3) de las mismas coordenadas cerebrales (George Paxinos *et al.*) con los anticuerpos AT100 o AT8 dependientes de la fosforilación. Reconocieron respectivamente el epítipo fosforilado de tau en los restos de Thr 212-Ser 214 y Ser 202-Thr 205. La cuantificación de las neuronas marcadas se realizó usando el programa informático NIH-Image J y se expresó en unidades arbitrarias (UA).

#### Análisis estadísticos

Los resultados se presentaron como las medias ± ETM. Las diferencias entre los valores medios se evaluaron usando la prueba t de Student, ANOVA de una vía seguido de una prueba LSD de Fisher post-hoc con el programa informático GraphPad Prism 6. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

30

### **Resultados**

#### Efecto modulador sobre la fosforilación de Tau y la degradación de Tau

35 Se analizó el efecto del compuesto de Fórmula I sobre la fosforilación de Tau *in vitro* e *in vivo*. Se trataron células SKNH-SY5Y de neuroblastoma que expresaban la isoforma de Tau humana 412 (con las secuencias codificantes de los exones 2 y 10) con 10 µM del compuesto de Fórmula I.

#### *Experimentos in vitro*

40

La expresión y la fosforilación total se evaluaron mediante electroforesis en gel 1D y 2D usando anticuerpos dependientes de la fosforilación y pan-Tau (Figuras 1 y 2). El anticuerpo Tau S199P dependiente de la fosforilación se dirige contra el resto de serina 199 fosforilado (numeración de acuerdo con la isoforma de Tau humana más larga) y es un marcador temprano de la hiperfosforilación de Tau durante la degeneración neurofibrilar (Maurage *et al.*, 2003). El anticuerpo S396 se dirige a un epítipo que comprende la serina 396 fosforilada de Tau (numeración según la isoforma tau cerebral más larga de 441 aminoácidos). Se induce la expresión de Tau mediante el tratamiento con tetraciclina y las células se trataron posteriormente con el compuesto de Fórmula I. Se compara el cambio de la expresión o la fosforilación de Tau con la afección inducida pero no tratada.

45

50 No se observó ningún cambio significativo en la expresión de Tau con el compuesto de Fórmula I, aunque la fosforilación de Tau en las serinas 199 y 396 se redujo en las células tratadas con el compuesto de Fórmula I (Figura 1).

Estos resultados se corroboraron usando electroforesis en gel 2D. En condiciones de control, las isoformas de Tau se resolvieron entre pI 6,5 y 10,5. Después del tratamiento con el compuesto de Fórmula I, se observó una reducción de los isoformas al pI neutro con el anticuerpo dependiente de la fosforilación Tau396 (S396), así como con los anticuerpos pan-Tau dirigidos tanto al extremo N como al extremo C (Figura 2).

55

#### *Experimentos in vivo*

60

Para determinar además el efecto del compuesto de Fórmula I en el metabolismo de Tau, se trataron los animales C57/BL6 de tipo silvestre con 0,5 y 1 mg/Kg del compuesto de Fórmula I durante 1 mes y se evaluó la expresión de *MAPT* endógena mediante electroforesis en gel 2D. Las isoformas de la proteína Tau consisten en tres series que varían de pI 10 a 6. Las isoformas principales y más básicas corresponden a la isoforma de Tau de ratón que comprende la única secuencia codificante del exón 10. Las otras dos series de isoformas de peso molecular de 64 y 69 kDa son isoformas de Tau que, además del exón 10, contienen secuencias codificantes del exón

65

2 o del exón 2 + 3, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 3 con el anticuerpo Tau-Cter, la distribución de isovariantes de Tau no cambió significativamente en los animales tratados, aunque los productos catabólicos de Tau de bajo peso molecular (indicados por las flechas en la Figura 3) aumentaron en número e intensidad a 0,5 mg/kg e incluso más significativamente a 1 mg/kg del compuesto de Fórmula I.

De manera interesante, cuando se usa el anticuerpo S199, se detectan 5 isovariantes de Tau en la afección no tratada, y el número de isovariantes teñidas disminuyó a 3 y 2 isovariantes a ambas dosis (0,5 mg/kg y 1 mg/kg) del compuesto de Fórmula I, respectivamente. La superficie de las manchas también se redujo, lo que sugiere una menor abundancia del sitio fosforilado tras el tratamiento, aunque el perfil 2D global de las isoformas de Tau de longitud completa se conserva después del tratamiento.

En conjunto, estos resultados sugieren que el compuesto de Fórmula I modula el metabolismo de Tau endógeno, en particular, reduciendo la fosforilación de Tau y aumentando la proteólisis de Tau.

#### Memoria espacial preservada y patología de Tau reducida en animales transgénicos Thy-Tau22

El desarrollo en el hipocampo de NFT en Thy-Tau22 se correlaciona con un deterioro de la memoria espacial (Laurent *et al.*, 2015). La memoria espacial se puede preservar mediante el ejercicio voluntario (Belarbi *et al.*, 2011) o la inmunoterapia (Troquier *et al.*, 2012), lo que convierte a Thy-Tau22 en un buen modelo para probar el efecto beneficioso o perjudicial de los fármacos. Se trataron los ratones Thy-Tau22 durante 4 meses con 0,5 mg/kg de HCl•Compuesto I y se evaluó la memoria espacial usando el laberinto de agua Morris.

Como se muestra en la Figura 4A, la fase de aprendizaje no es significativamente diferente entre los grupos de animales del panel superior. Después de 5 días de aprendizaje, la distancia hasta alcanzar la plataforma se reduce, lo que demuestra que los ratones han aprendido con éxito. En la prueba de sondeo, realizada 72 horas después del último día de aprendizaje, el Compuesto de Fórmula I no tuvo un efecto significativo, mientras que, en los ratones Thy-Tau22, se conservó la memoria espacial.

En animales de tipo silvestre, el animal tuvo una preferencia significativa por los cuadrantes diana en lugar de los otros tres cuadrantes independientemente del tratamiento (Figura 4B). Por lo tanto, el Compuesto de Fórmula I no afectó al rendimiento cognitivo de los animales de tipo silvestre.

Los animales Thy-Tau22 pasaron el mismo % de tiempo en el cuadrante diana (en el que la plataforma se posiciona durante la fase de aprendizaje) en comparación con los demás. La falta de distinción se interpreta como una pérdida de memoria espacial. En el animal tratado con Thy-Tau22, los ratones pasaron más tiempo en el cuadrante diana y, por lo tanto, mostraron una memoria espacial preservada. El análisis estadístico ANOVA mostró que un tratamiento con el compuesto de Fórmula I protegió o preservó a los ratones Thy-Tau22 de desarrollar problemas de memoria espacial.

Se investigó la carga de NFT en el hipocampo CA1 mediante inmunohistoquímica y cuantificación. Como se ha mencionado anteriormente, AT100 reconoce los sitios patológicos de Tau (restos Thr 212-Ser 214), y AT8 se usa para detectar la presencia de tau fosforilada (restos Ser 202-Thr 205). Como se muestra en la Figura 5, la superficie media de tinción medida tras la tinción con AT100 se redujo significativamente en el animal tratado con HCl•Compuesto I, mientras que no se observaron diferencias significativas después de la inmunotinción con AT8. AT100 reconoció un epítipo patológico de Tau, lo que sugiere que el HCl•Compuesto I tiene un impacto en el desarrollo de la patología de tau, pero no necesariamente en las proteínas Tau fosforiladas marcadas por AT8.

Para evaluar más a fondo esta hipótesis, se investigaron la expresión y la fosforilación de Tau más a fondo mediante la transferencia Western (Figura 6).

Las proteínas cerebrales (del hipocampo) de los animales thy-tau22 no tratados y tratados con HCl•Compuesto I se resolvieron mediante SDS-PAGE 1D y las proteínas Tau se marcaron con anticuerpos Pan-Tau (N-ter, C-ter). Los catabolitos detectados con estos anticuerpos se indican como f-Nter y f-Cter. Las variantes fosforiladas de Tau se tiñeron con pSer199 (contra la serina 199 fosforilada), pSer262 (contra la serina 262 fosforilada), pSer396 (contra la serina 396 fosforilada), pSer404 (contra la serina 404 fosforilada), pSer422 (contra la serina 422 fosforilada) y Tau-1 (contra el epítipo no fosforilado comprendido entre los restos de aminoácidos 198-205). La cuantificación de cada epítipo fosforilado se expresa como la proporción de epítipo fosforilado tras la señal de Tau humana total determinada mediante la tinción de N-ter. Esta proporción se proporciona como el % de variación de la condición de control (animales Thy-Tau22 no tratados) cuyo valor es arbitrario dado el valor del 100 %.

Se observó una reducción significativa de la fosforilación de Tau en los sitios de fosforilación 396 y 404, mientras que otros sitios de fosforilación no se modificaron significativamente (Figura 6). De forma más interesante, los productos de catabolitos C-terminales de Tau a 43 kDa aumentaron significativamente mientras que los catabolitos N-terminales disminuyeron significativamente (Figura 6). Estos resultados sugieren que un tratamiento con el

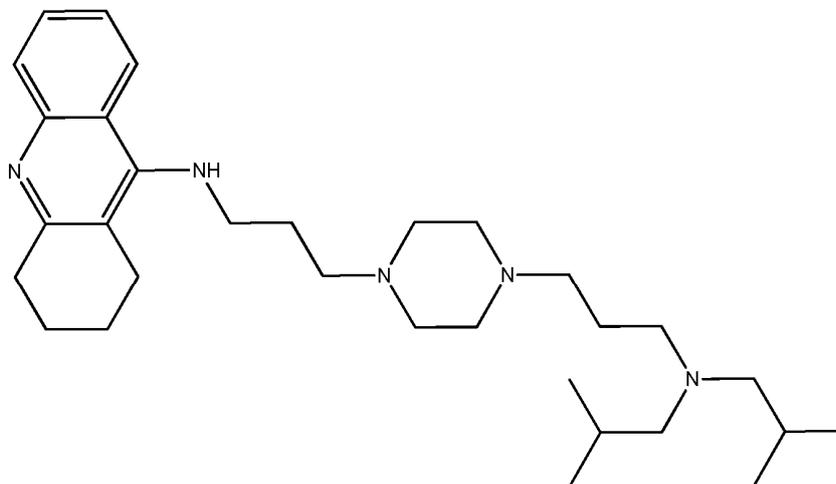
HCl•Compuesto I reduce la carga de la patología de Tau al reducir la fosforilación de Tau y al aumentar el catabolismo de Tau, lo que basta para preservar el modelo animal Thy-Tau22 de degeneración neurofibrilar del desarrollo de un deterioro de la memoria espacial.

## 5 REFERENCIAS

- 10 Belarbi K., Burnouf S., Fernandez-Gomez F. J., Desmercières J., Troquier L., Brouillette J., Tsambou L., Grosjean M. E., Caillierez R., Demeyer D., Hamdane M., Schindowski K., Blum D., Buee L. "Loss of medial septum cholinergic neurons in THY-Tau22 mouse model: what links with tau pathology?" *Curr Alzheimer Res.* septiembre de 2011;8(6):633-8.
- 15 Bretteville A1, Ando K., Ghestem A., Loyens A., Bégard S., Beauvillain J. C., Sergeant N., Hamdane M., Buee L. "Twodimensional electrophoresis of tau mutants reveals specific phosphorylation pattern likely linked to early tau conformational changes". *PLoS One.* 2009;4(3):e4843. doi: 10.1371/journal.pone.0004843.
- 20 Fernandez-Gomez F. J., Jumeau F., Derisbourg M., Burnouf S., Tran H., Eddarkaoui S., Obriot H., Dutoit-Lefevre V., Deramecourt V., Mitchell V., Lefranc D., Hamdane M., Blum D., Buee L., Buee-Scherrer V., Sergeant N. "Consensus brain-derived protein, extraction protocol for the study of human and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting". *J Vis Exp.* 10 de abril de 2014;(86). doi: 10.3791/51339.
- 25 Laurent C., Burnouf S., Ferry B., Batalha V. L., Coelho J. E., Baqi Y., Malik E., Mariciniak E., Parrot S., Van der Jeugd A., Faivre E., Flaten V., Ledent C., D'Hooge R., Sergeant N., Hamdane M., Humez S., Muller C.E., Lopes L. V., Buee L., Blum D. "A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy". *Mol Psychiatry.* 2 de diciembre de 2014. doi: 10.1038/mp.2014.151.
- 30 Le Freche H., Brouillette J., Fernandez-Gomez F. J., Patin P., Caillierez R., Zommer N., Sergeant N., Buee-Scherrer V., Lebuffe G., Blum D., Buee L. "Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia: an association to postoperative deterioro cognitivo". *Anesthesiology.* abril de 2012;116(4):779-87. doi: 10.1097/ALN.0b013e31824be8c7.
- 35 Maurage C. A., Sergeant N., Ruchoux M. M., Hauw J. J., Delacourte A. "Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology". *Acta Neuropathol.* febrero de 2003;105(2):89-97.
- 40 Ryckebusch, A., Deprez-Poulain, R., Maes, L., Debreu-Fontaine, M.-A., Mouray, E., Grelhier, P., Sergheraert, C. (2003) "Synthesis and *in Vitro* and *in Vivo* Antimalarial Activity of N1-(7-Chloro-4-quinoly)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine Derivatives". *J. Med. Chem.* 46, 542-557.
- 45 Sergeant N., Watzel A., Delacourte A. "Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms". *J Neurochem.* Marzo de 1999;72(3):1243-9.
- 50 Troquier L., Caillierez R., Burnouf S., Fernandez-Gomez F. J., Grosjean M. E., Zommer N., Sergeant N., Schraen-Maschke S., Blum D., Buee L. "Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach". *Curr Alzheimer Res.* Mayo de 2012;9(4):397-405.
- Van der Jeugd A., Vermaercke B., Derisbourg M., Lo A. C., Hamdane M., Blum D., Buee L., D'Hooge R. "Progressive age-related cognitive decline in tau mice". *J Alzheimers Dis.* 2013;37(4):777-88. doi: 10.3233/JAD-130110.

## REIVINDICACIONES

1. El compuesto que tiene la Fórmula I



I

5

o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

10

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.

15

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una tauopatía.

5. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la tauopatía se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y complejo de parkinsonismo y demencia, enfermedad de grano argirofílico, encefalopatía traumática crónica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, parkinsonismo de Guadalupe, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis de cuerpos de inclusión, atrofia de múltiples sistemas, distrofia miotónica, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de la neurona motora no guamánica con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefalítico, angiopatía amiloide cerebral de proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), retraso mental relacionado con SLC9A6, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de un solo ovillo, demencia por infarto múltiple, apoplejía isquémica, encefalopatía traumática crónica (ETC), lesión cerebral traumática (TBI), apoplejía y tauopatía de la materia blanca con inclusiones gliales globulares.

20

25

30

6. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la tauopatía se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y demencia frontotemporal (FTD).

35

7. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la tauopatía se selecciona entre demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal, enfermedad de Pick y demencia frontotemporal (FTD).

40

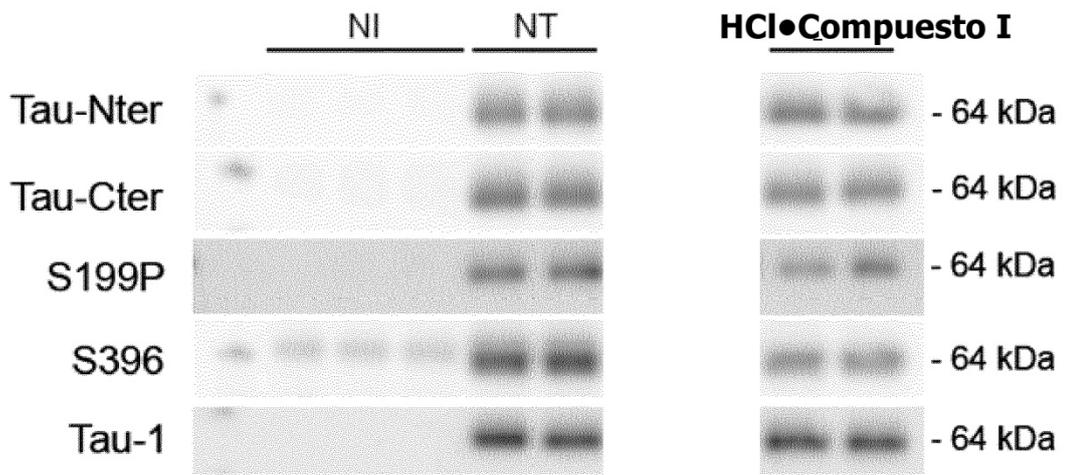


Fig. 1

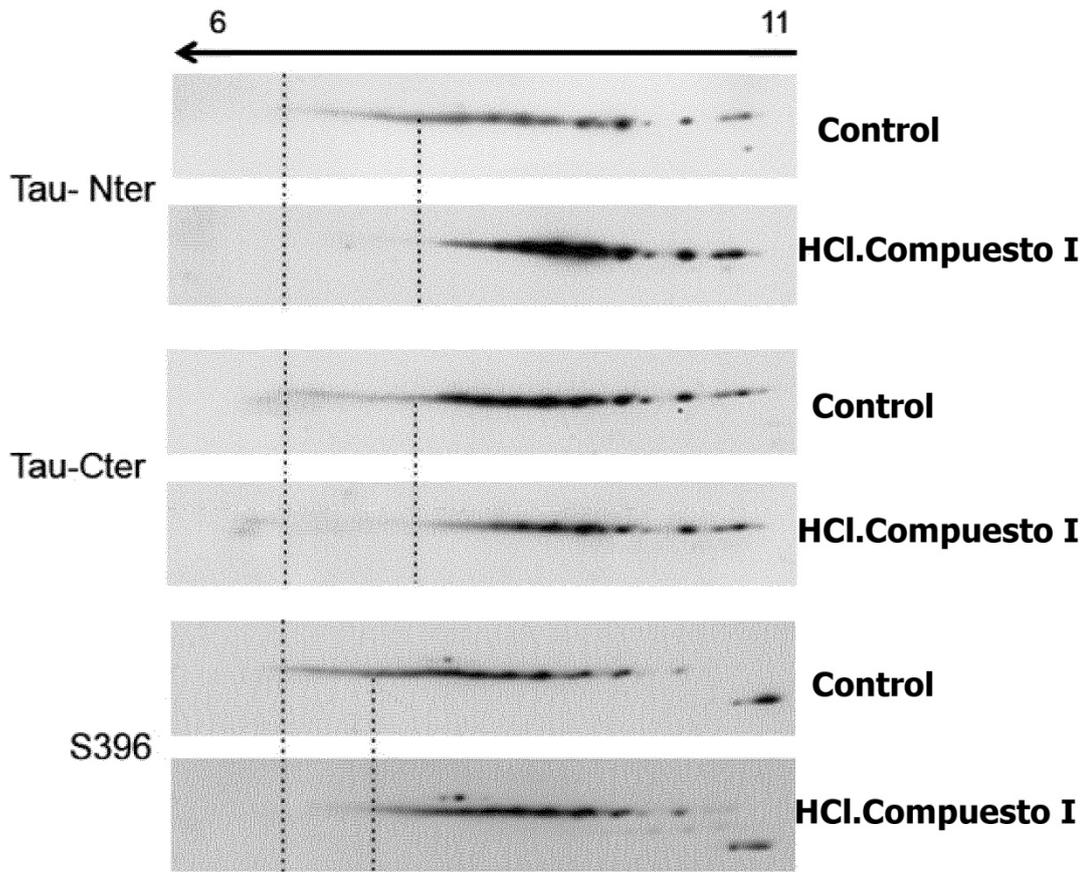


Fig. 2

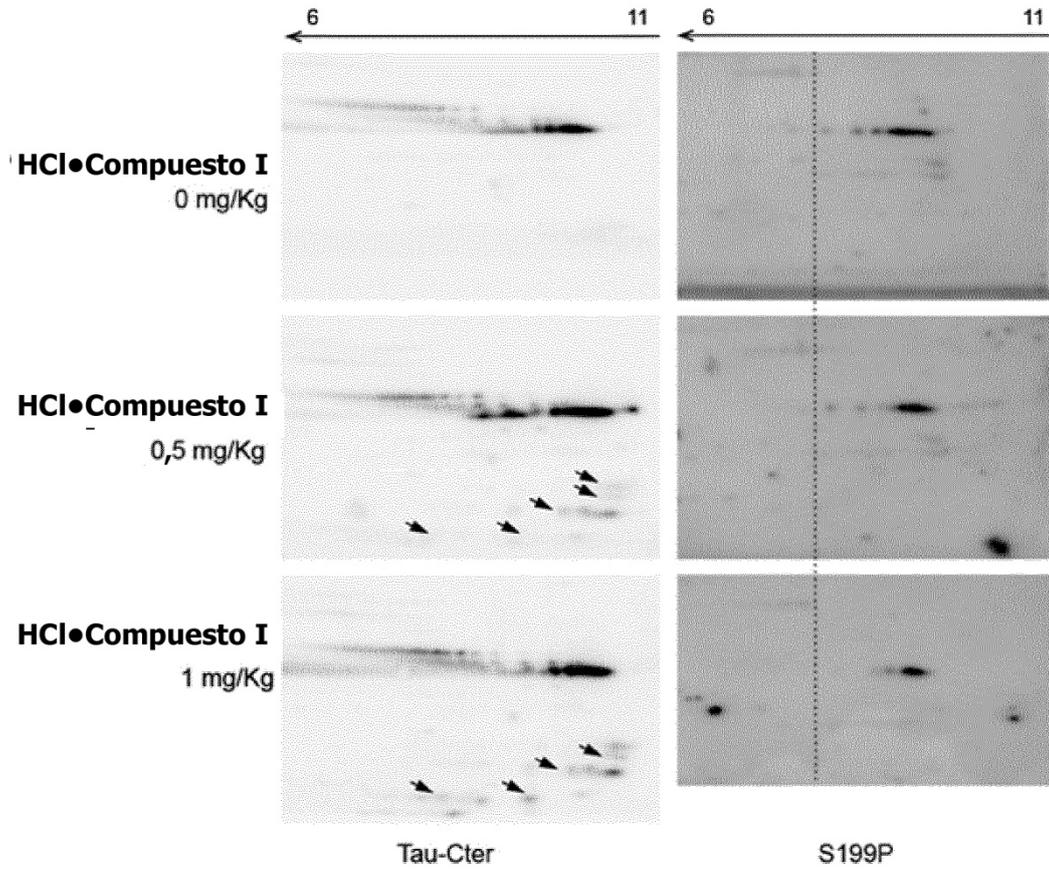


Fig. 3

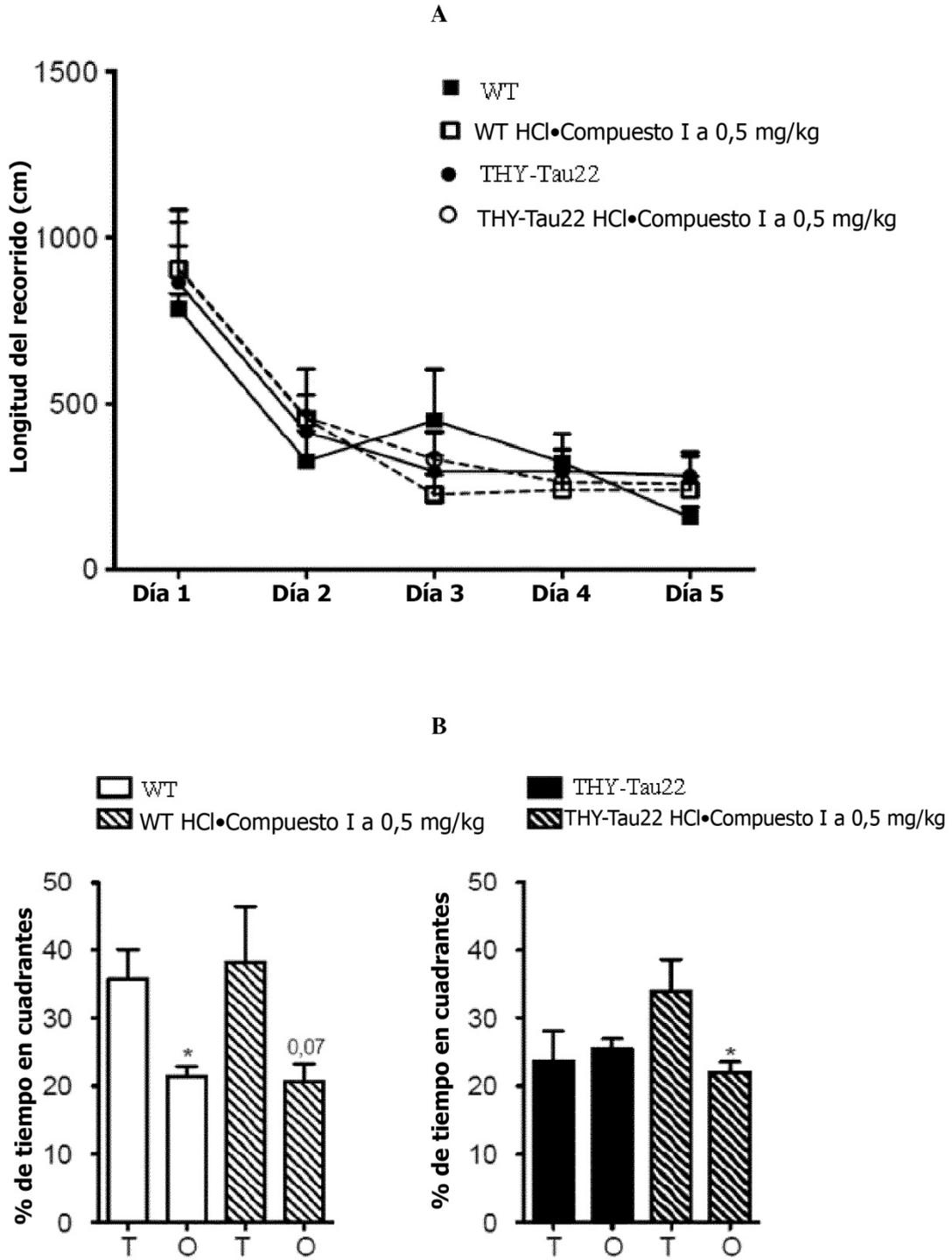


Fig. 4

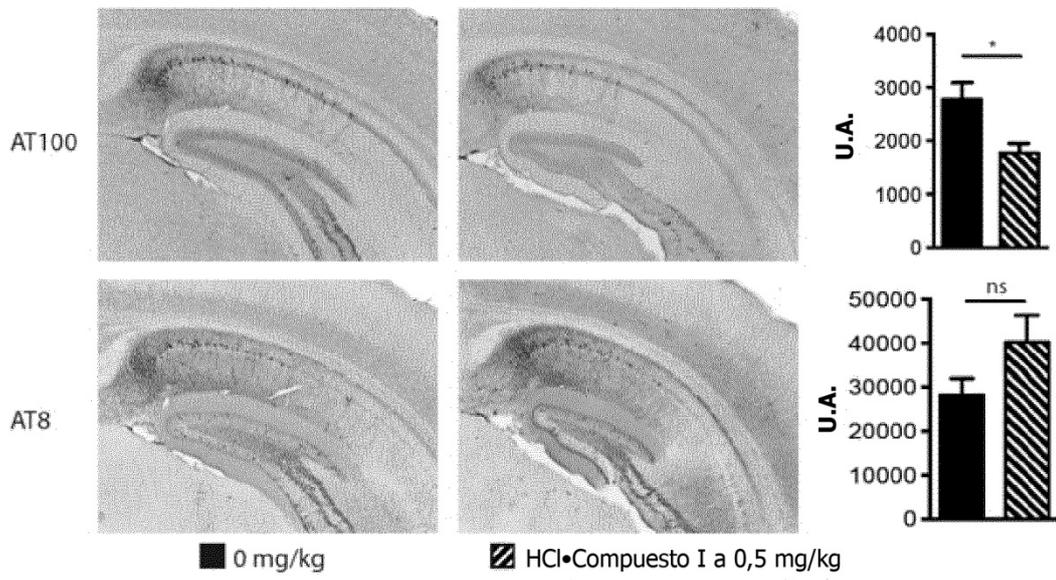


Fig.5

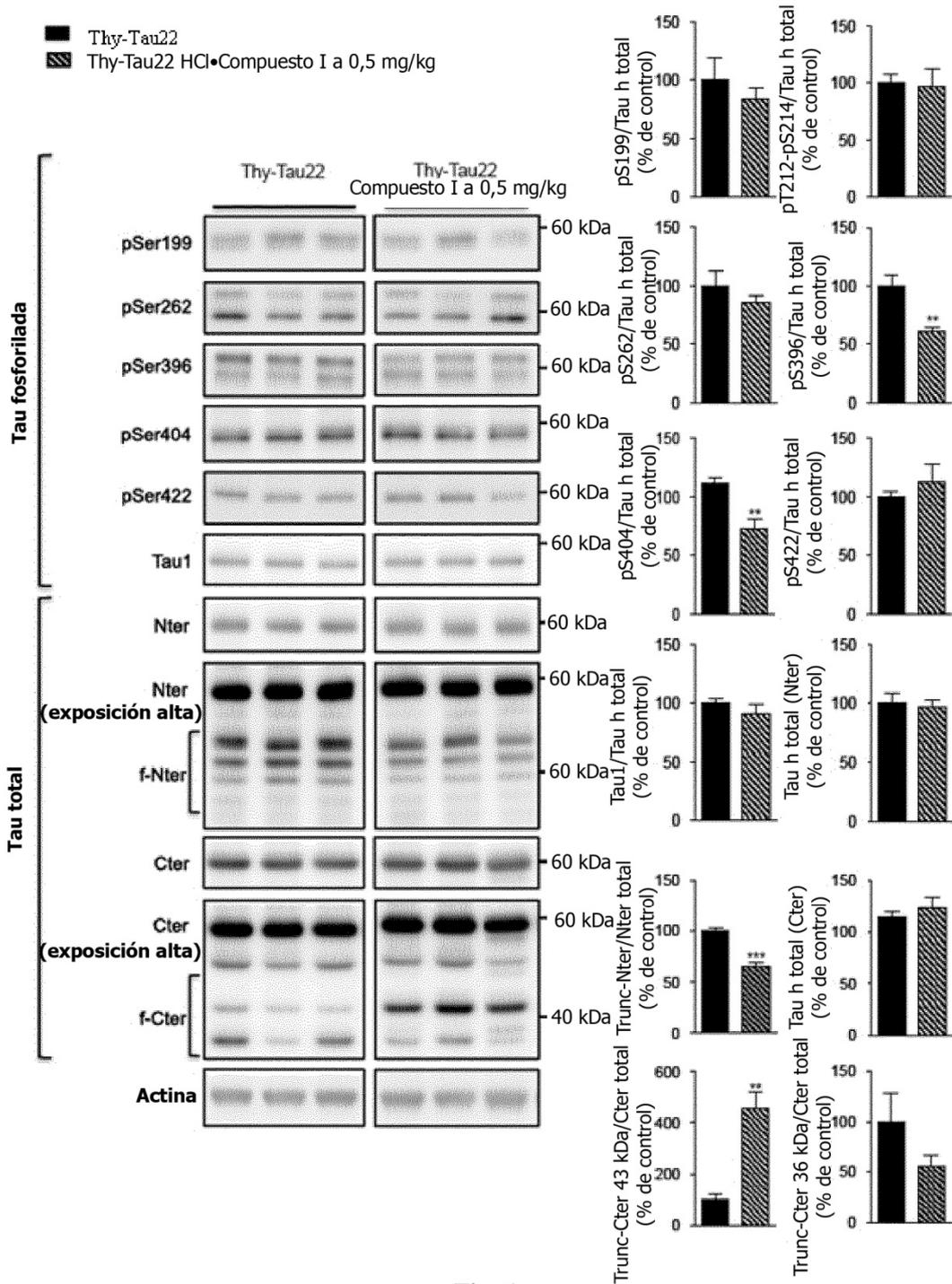


Fig. 6