

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 657**

51 Int. Cl.:

C07D 295/108 (2006.01)

C07C 281/18 (2006.01)

C07C 317/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/155 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2015 PCT/EP2015/065162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16001390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2015 E 15733468 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3164391**

54 Título: **Derivados de O-alkil-bencilidenguanidina y su uso terapéutico para el tratamiento de trastornos asociados a una acumulación de proteínas mal plegadas**

30 Prioridad:

02.07.2014 EP 14306076

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

23.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GUEDAT, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 749 657 T3

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

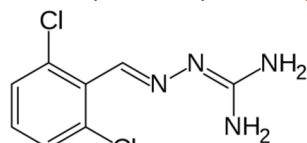
DESCRIPCIÓN

Derivados de O-alkil-bencilidenguanidina y su uso terapéutico para el tratamiento de trastornos asociados a una acumulación de proteínas mal plegadas

Esta invención se refiere a compuestos con posibles aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de trastornos asociados al estrés producido por mal plegamiento proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas. En particular, la invención proporciona compuestos que son capaces de mostrar un efecto protector contra el estrés citotóxico del retículo endoplásmico (RE).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El compuesto 2-(2,6-diclorobencilideno)hidrazinacarboximidamida, también denominado guanabenzol, es un agonista alfa de tipo alfa 2 que se emplea como fármaco antihipertensivo.



Guanabenzol

También se ha informado de varios derivados del guanabenzol. Por ejemplo, el documento US 3982020 (Sandoz, Inc.) describe las hidrazinas de bencilideno sustituidas y su empleo como agentes hipoglucémicos-antihiperoglucémicos, agentes antiobesidad y agentes antiinflamatorios. El documento US 2004/0068017 (Bausch & Lomb Inc.) describe hidrazinas de bencilideno sustituidas que son capaces de incrementar la actividad de la gelatinasa A en las células oculares. Las moléculas tienen aplicaciones en el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto. El documento WO 2008/061647 (Acure Pharma AB) describe el uso de N-(2-cloro-3,4,-dimetoxibencilidenoamino)guanidina como un inhibidor del VEGFR y sus aplicaciones asociadas al tratamiento o a la prevención de la formación no deseada de vasos sanguíneos durante el crecimiento de tumores o en condiciones inflamatorias. El documento WO2005/031000 (Acadia Pharmaceuticals, Inc.) describe las hidrazinas de bencilideno sustituidas y su uso en el tratamiento de dolor agudo y dolor neuropático crónico. Por último, el documento EP1908464 (CNRS) describe el guanabenzol y el cloroguanabenzol, y su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a la expansión de la poliglutamina, incluida la enfermedad de Huntington.

Más recientemente, se ha informado de que el guanabenzol posee potencial terapéutico en otros ámbitos. Recientemente se observó que el guanabenzol posee actividad antipirónica (Tribouillard-Tanvier *et al.*, 2008 PLoS One 3, e1981). Se ha informado de que su actividad protectora contra el mal plegamiento proteico es, sorprendentemente, más amplia e incluye la menor acumulación de la huntingtina mutante en ensayos celulares (WO2008/041133), y la protección frente a los efectos letales de la expresión de insulina Akita mutante propensa al mal plegamiento en el retículo endoplásmico (RE) de células beta pancreáticas Min6 e INS-1 (Tsaytler *et al.*, 2011 Science 332 págs. 91-94). WO2014/138298 and Way *et al.* El documento (2015 Nature Communications 6:6532 DOI: 10.1038/ncomms7532) describe el guanabenzol y su uso en el tratamiento de trastornos desmielinizantes, como la esclerosis múltiple.

También se ha demostrado que el guanabenzol promueve la supervivencia de las células HeLa expuestas de otra forma a estrés citotóxico RE inducido por la tunicamicina inhibidor de la N-glicosilación, en una forma dependiente de la dosis (Tsaytler, *et al.*, Science, 2011). La evaluación cuantitativa de la viabilidad celular reveló que el guanabenzol duplicó el número de células supervivientes al estrés RE con una concentración media efectiva de ~ 0,4 μ M. Ni la clonidina agonista de receptores α 2-adrenérgicos, ni el efaroxan antagonista de receptores α 2-adrenérgicos protegieron las células del estrés citotóxico RE, y el efaroxan no interfirió en el efecto protector del guanabenzol. (Tsaytler, *et al.*, Science, 2011). Estas observaciones demuestran que el guanabenzol rescata las células del estrés RE letal mediante un mecanismo independiente del receptor α 2-adrenérgico. El guanabenzol protege las células de la acumulación de otra forma letal de proteínas mal plegadas mediante la unión a una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1PPP1R15A (GADD34), alterando selectivamente la defosforilación inducida por el estrés de la subunidad α del factor de iniciación 2 de la traducción (eIF2 α). El guanabenzol fija los índices de traducción en las células estresadas a un nivel manejable por las chaperonas disponibles, restaurando, de este modo, la homeostasis proteica. Se informó de que el guanabenzol no se une al constitutivo PPP1R15B (CReP) y, por tanto, no inhibe la traducción en las células no estresadas (Tsaytler, *et al.*, Science, 2011).

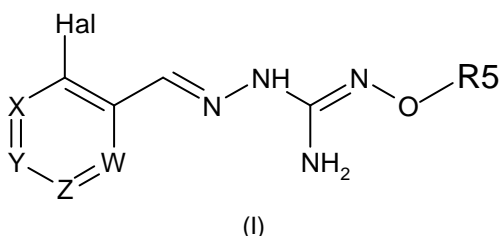
La falta de mantenimiento de la proteostasis en el RE mediante el ofrecimiento de una respuesta adecuada a las proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) está reconocido como un factor que contribuye a muchas patologías. De este modo, las moléculas aquí descritas, que inhiben la fosfatasa eIF2 α hasta ajustar la síntesis de las proteínas, pueden resultar beneficiosas en el ámbito terapéutico para un gran número de enfermedades causadas por el mal plegamiento proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas.

Tribouillard-Tanvier *et al.*, PLoS One 3, e1981 (2008) y P1908464A describieron derivados de bencilideno guanidina que contenían guanidina como grupo terminal. No obstante, el solicitante ha hallado que el grupo terminal es responsable de una metabolización que afecta a la biodisponibilidad de los compuestos. Además, estudios previos también han indicado que el grupo (hetero)arilo debe ser al menos dihalogenado para que los compuestos presenten actividad farmacológica útil (ver, por ejemplo, Tribouillard-Tanvier *et al.*, PLoS One 3, e1981 (2008) y EP1908464A, CNRS). No obstante, al contrario que en estudios anteriores, este solicitante ha hallado que, sorprendentemente, los derivados monohalogenados de (hetero)arilo que contienen un grupo terminal modificado también pueden ser activos. Por tanto, es deseable ofrecer una alternativa, con una mejor actividad o perfil de biodisponibilidad.

Esta invención busca proporcionar compuestos alternativos basados en una estructura central de guanabanzo que posean posibles aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de desórdenes asociados al estrés por el mal plegamiento proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas.

DECLARACIÓN DE INVENCION

Un primer aspecto de la invención hace referencia a un compuesto de fórmula (I) o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



donde:

Hal = F, Cl, Br, I

X es -CR1= o -N=,

Y es -CR2= o -N=,

Z es -CR3= o -N=,

W es -CR4= o -N=,

R1 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;

R2 se selecciona de entre H, Hal, alquilo, O-alquilo y C(O)R6;

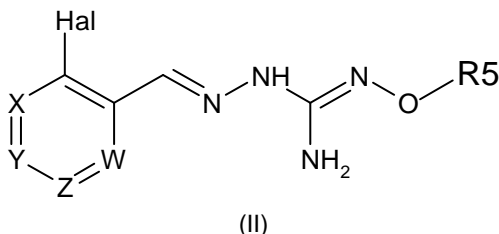
R3 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;

R4 es H, Cl, F, I o Br;

R5 es alquilo, cicloalquilo, aralquilo, alqueno, cicloalqueno, heterociclilo, arilo, C(O)-alquilo y C(O)-arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7;

R6 se selecciona de entre OH, O-alquilo, O-arilo, aralquilo, NH₂, NH-alkilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, CF₃, alquilo y alcoxi; cada R7 se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, CN, COO-alquilo, aralquilo, heterociclilo, S-alquilo, SO-alquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alkilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un compuesto de fórmula (II):



donde:

Hal = F, Cl, Br, I

X es -CR1= o -N=,

Y es -CR2= o -N=,

Z es -CR3= o -N=,

W es -CR4= o -N=,

R1 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;

R2 se selecciona de entre H, Hal, alquilo, O-alquilo y C(O)R6;

R3 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;

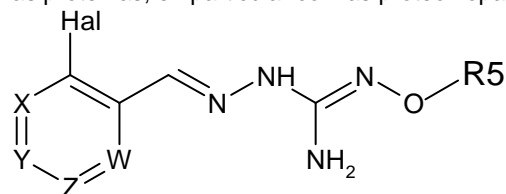
R4 es H, Cl, F, I o Br;

R5 es alquilo, cicloalquilo, aralquilo, alqueno, cicloalqueno, heterociclilo, arilo, C(O)-alquilo y C(O)-arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7;

R6 se selecciona de OH, O-alquilo, O-arilo, aralquilo, NH₂, NH-alkilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, CF₃, alquilo y alcoxi;

5 cada R7 se selecciona independientemente de halógeno, OH, CN, COO-alquilo, aralquilo, heterociclilo, Salquilo, SO-alquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alkilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi; con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (II), o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de trastornos asociados con el estrés producido por el mal plegamiento de las proteínas, en particular con las proteoinopatías:



(II)

(II)

donde:

Hal = F, Cl, Br, I

X es -CR1= o -N=,

Y es -CR2= o -N=,

Z es -CR3= o -N=,

W es -CR4= o -N=,

15 R1 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;

R2 se selecciona de entre H, Hal, alquilo, O-alquilo y C(O)R6;

R3 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;

R4 es H, Cl, F, I o Br;

20 R5 es alquilo, cicloalquilo, aralquilo, alqueno, cicloalqueno, heterociclilo, arilo, C(O)-alquilo y C(O)-arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7;

R6 se selecciona de OH, O-alquilo, O-arilo, aralquilo, NH₂, NH-alkilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, CF₃, alquilo y alcoxi;

25 cada R7 se selecciona independientemente de entre halógeno, OH, CN, COO-alquilo, aralquilo, heterociclilo, S-alquilo, SO-alquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alkilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi.

Y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30

la fórmula (I) es una realización especial de fórmula (II).

En una realización preferente, los compuestos de fórmula (I) o (II) anteriormente definidos favorablemente no muestran ninguna actividad con respecto al receptor adrenérgico α₂A con respecto a art compounds anteriores como guanabenz. Esta pérdida en la actividad adrenérgica alfa 2 hace que los compuestos resulten terapéuticamente útiles en el tratamiento de desórdenes asociados al estrés de mal plegamiento de proteínas y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas. La ausencia de actividad adrenérgica alfa 2 significa que los compuestos de (I) o (II) pueden administrarse a una dosis adecuada para tratar las enfermedades anteriormente mencionadas sin que tengan un efecto significativo en la presión sanguínea.

40

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal como se entiende en el presente documento, el término "alquilo" incluye la cadena lineal saturada y los grupos alquilos ramificados. Preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₂₀, más preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₁₅, más preferiblemente incluso un grupo alquilo C₁₋₁₂, más preferiblemente incluso un grupo alquilo C₁₋₆, más preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₃. Los grupos alquilos especialmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, tert-butilo, pentilo y hexilo.

45

Tal como se entiende en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo alquilo cíclico. Preferiblemente, el grupo cicloalquilo es un grupo cicloalquilo C₃₋₁₂.

50

Tal como se entiende en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un grupo que contiene uno o más enlace doble carbono-carbono, que pueden ser ramificados o no ramificados. Preferiblemente, el grupo alqueno es un grupo alqueno C₂₋₂₀, más preferiblemente un grupo alqueno C₂₋₁₅, más preferiblemente incluso un grupo alqueno C₂₋₁₂ o, preferiblemente, un grupo alqueno C₂₋₆, más preferiblemente un grupo alqueno C₂₋₃. El término "alqueno cíclico" se interpretará en consecuencia.

55

Tal como se entiende en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático C₆₋₁₂. Ejemplos típicos incluyen el fenilo, el naftilo, etc.

Tal como se entiende en el presente documento, el término "heterociclo" (también denominado en el presente como "heterocícilo" y "heterocíclico") hace referencia a un grupo cíclico de 4 a 12, preferiblemente de 4 a 6 elementos saturado, no saturado o parcialmente no saturado que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S, y que, opcionalmente, contiene además uno o más grupos CO. El término "heterociclo" comprende a los grupos heteroarilos y heterocicloalquilos como se definen a continuación.

Tal como se entiende en el presente documento, el término "heteroarilo" hace referencia a un aromático de 4 a 12 elementos que comprende uno o más heteroátomos. Preferiblemente, el grupo heteroarilo es un grupo aromático de 4 a 6 elementos que comprende uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S. Entre los grupos heteroarilos adecuados se encuentran pirrol, pirazol, pirimidina, pirazina, piridina, quinolina, tiofeno, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tiazol, oxazol, isotiazol, isooxazol, imidazol, furano y similares.

Tal como se entiende en el presente documento, el término "heterocicloalquilo" hace referencia a un grupo alifático cíclico de 3 a 12 elementos, preferiblemente de 4 a 6 que contiene uno o más heteroátomos seleccionados de N, O y S. Son preferibles los heterocicloalquilos que contienen N de 5 a 6 elementos. Entre los grupos heterocicloalquilos preferidos se incluyen piperidinil, pirrolidinil, piperazinil, tiomorfolinil y morfolinil. Más preferiblemente, el grupo heterocicloalquilo se selecciona de N-piperidinil, N-pirrolidinil, N-piperazinil, N-tiomorfolinil y N-morfolinil.

Tal como se entiende en el presente documento, el término "aralquilo" incluye, entre otros, un grupo que posee las funciones arilo y alquilo. A modo de ejemplo, el término incluye grupos en los cual uno de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo es reemplazado por un grupo arilo, p. ej. un grupo fenilo. Entre los grupos aralquilo típicos se incluyen bencilo, fenetilo y similares.

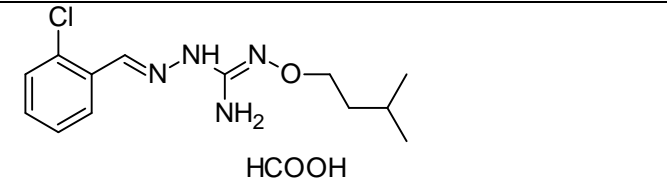
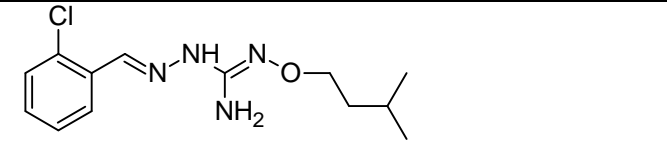
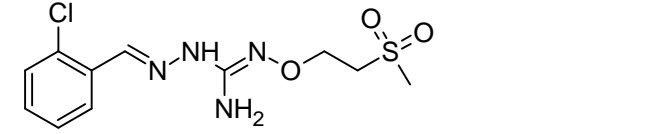
Los siguientes son materializaciones concretas de fórmula (I) o (II):

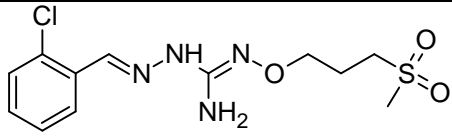
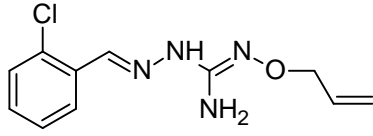
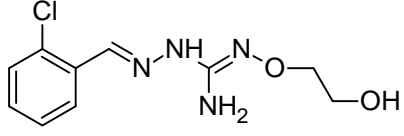
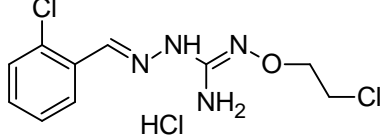
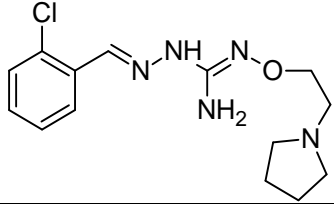
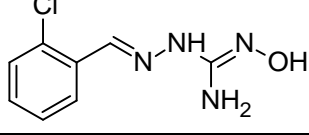
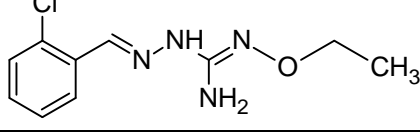
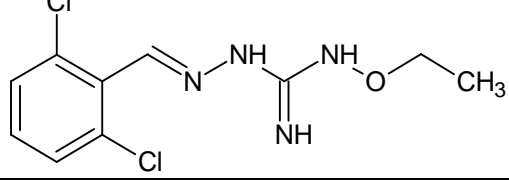
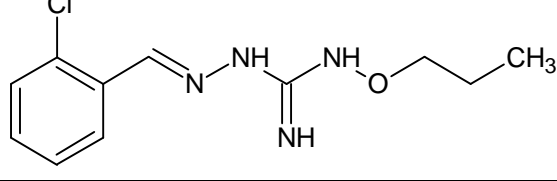
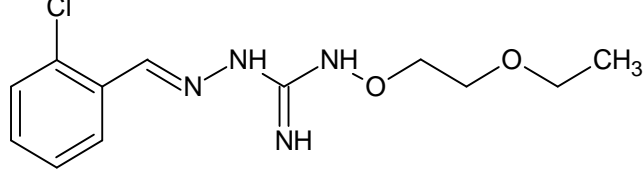
- En una materialización preferida, Hal es Cl.
- En una materialización preferida, X es -CR1=.
- En una materialización preferida, Y es -CR2=.
- En otra materialización preferida, Y es N.
- En una materialización preferida, Z= -CR3=.
- En una materialización preferida, W= -CR4=.
- En una materialización preferida, R1 es H o F, más preferiblemente H.
- En una materialización preferida, R2 es H o F, más preferiblemente H.
- En una materialización preferida, R3 es H o F más preferiblemente H.
- En una materialización preferida, R4 es H, Cl o F, más preferiblemente H o F, más preferiblemente H.
- En una materialización preferida, R3 y R4 son H.

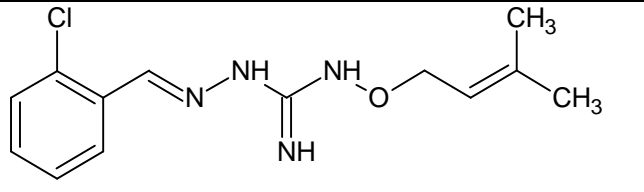
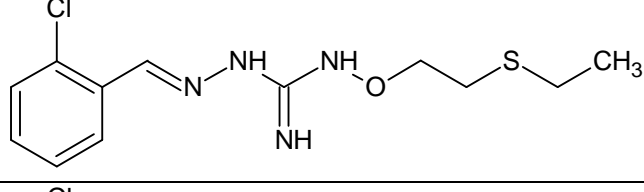
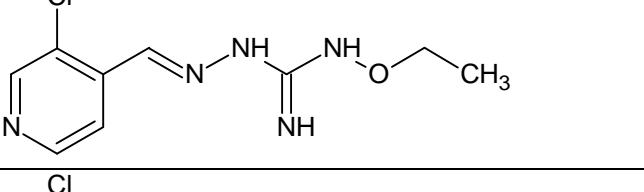
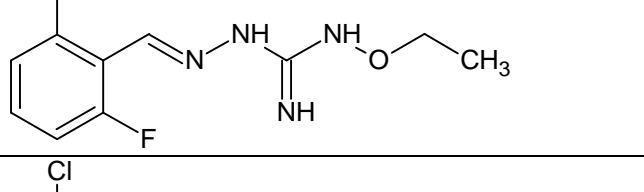
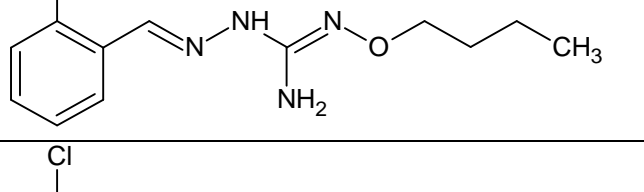
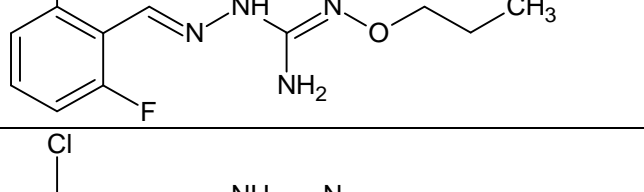
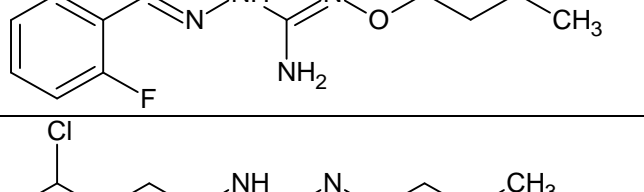
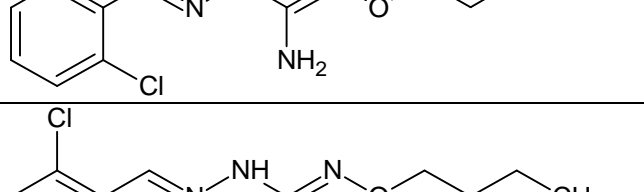
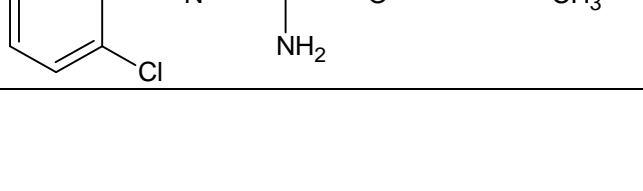
En una materialización, R5 es alquenilo o alquilo, cada alquenilo o alquilo se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7.

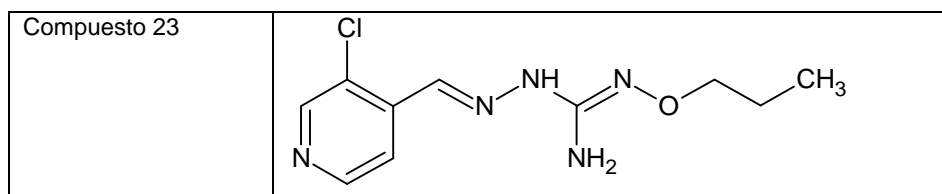
En una materialización, los grupos R/ se eligen entre, halógeno, OH, heterocícilo, SO-alquilo, SO₂-alquilo, Oalquilo.

En una materialización especialmente preferida, el compuesto de fórmula (I) o (II) se selecciona de entre los siguientes:

Compuesto 1	 <p>HCOOH</p>
Compuesto 2	
Compuesto 3	

Compuesto 4	
Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7	
Compuesto 8	
Compuesto 9	
Compuesto 10	
Compuesto 11	
Compuesto 12	
Compuesto 13	

Compuesto 14	
Compuesto 15	
Compuesto 16	
Compuesto 17	
Compuesto 18	
Compuesto 19	
Compuesto 20	
Compuesto 21	
Compuesto 22	



y sales farmacéuticas aceptables del mismo.

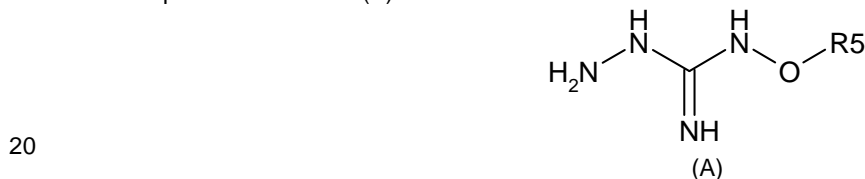
- 5 En una materialización preferida, el compuesto de fórmula (I) o (II) se selecciona de entre los compuestos 4, 6, 10, 11, 12, 14, 17, 18 como se indicó anteriormente, más preferiblemente de entre compuestos 4, 11, 17, 18 como se indicó anteriormente.

COMPUESTOS

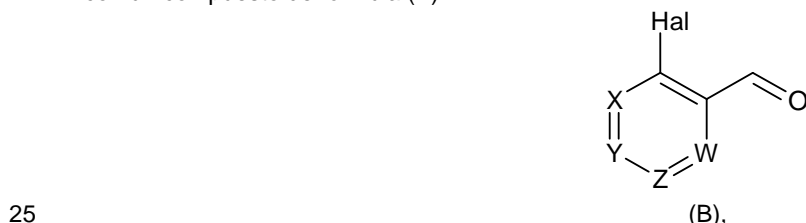
- 10 Un aspecto de la invención hace referencia a compuestos de las fórmulas (I), o de las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, como se definió anteriormente. Los aspectos preferidos de la invención se aplican *mutatis mutandis*. Los compuestos especialmente preferidos para este aspecto de la invención incluyen los compuestos 1, 2, 5 y 10 como se describen en el presente documento.

15 PROCESO DE PREPARACIÓN

Un aspecto adicional de la invención está relacionado con un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I) o (II), o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, como se indicó anteriormente, que incluye el paso de reaccionar un compuesto de fórmula (A) o una forma de tautómero del mismo:



en la que R5 es tal como se define anteriormente con un compuesto de fórmula (B):



donde X, Y, Z, W y Hal son tal como se define anteriormente,

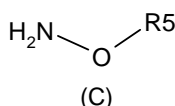
opcionalmente seguidos por un paso de modificar el grupo R5 del compuesto resultante de la reacción entre los compuestos de fórmulas (A) y (B) descritos anteriormente, en otro grupo R5.

- 30 Preferiblemente, el proceso también debe incluir un paso adicional de purificación del compuesto (I) o (II), obtenido anteriormente.

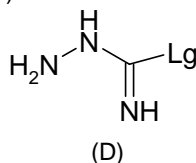
La reacción de acoplamiento entre los compuestos (A) y (B) puede realizarse en un disolvente orgánico, como un alcohol, p. ej. etanol. Puede realizarse a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de ebullición de la mezcla de reacción.

- 35 La reacción de modificación de los grupos R5 puede realizarse mediante aplicación o adaptación de los métodos conocidos. Por ejemplo, en el compuesto obtenido siguiendo el acoplamiento de (A) y (B), R5 puede ser un grupo sustituido por grupos R7: por tanto, sería deseable sustituir los grupos R7. Las reacciones de cada sustitución son ampliamente conocidas. Como ejemplos representativos, puede ser recomendable reemplazar R7=OH con R7=halógeno en un compuesto de fórmula (I) o (II). Esta reacción puede llevarse a cabo en presencia de un agente halogenante, como un agente clorante, p. ej. SOCl₂. Normalmente, esta reacción puede llevarse a cabo con un disolvente orgánico como el diclorometano. Otro ejemplo representativo es la sustitución de R7=halógeno con R7=heterociclo nitrogenado como la pirrolidina. Esta reacción debe ser conducida en la presencia de una base, como TEA. Normalmente, esta reacción puede llevarse a cabo en un disolvente orgánico, como THF.

- 45 Según una materialización, el proceso también pueden incluir el paso de preparar el compuesto de fórmula (A) anteriormente definido mediante la reacción de un compuesto de fórmula (C):



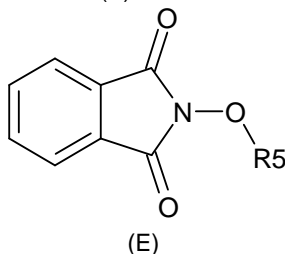
5 en la que R5 es tal como se define anteriormente con el S-metilisotiosemicarbazida hidroyoduro (D):



donde GS es un grupo saliente como -S-Alquilo, p. ej. -S-Metilo. o una de sus sales.

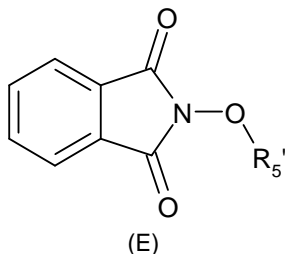
10 Normalmente, la reacción entre compuestos de fórmula (C) y (D) puede llevarse a cabo en una solución acuosa básica, por ejemplo en una solución acuosa que incluya hidróxido de sodio.

15 A la reacción de acoplamiento entre compuestos de fórmulas (C) y (D) puede seguirle un paso adicional de purificación. En una realización, el proceso puede incluir opcionalmente un paso adicional de preparación del compuesto de fórmula (C) mediante la reacción de un compuesto de fórmula (E):



20 con un compuesto derivado de la hidrazina, por ejemplo hidrato de hidrazina o metilhidrazina.

El proceso de la invención puede incluir opcionalmente un paso adicional de preparación del compuesto de fórmula (E) a partir de un compuesto de fórmula (E'):



25 Donde (R5') representa un grupo precursor de R5.

Esta reacción ser recomendable cuando (E) no está disponible comercialmente y no es posible prepara (E) a partir de (F) y (G) como se indica a continuación.

30 Por tanto, puede ser deseable utilizar un precursor (E') que se va a transformar en (E).

Un precursor es un grupo o un compuesto que puede modificarse para convertirse en el compuesto deseado mediante una reacción química de sustitución, eliminación o derivación.

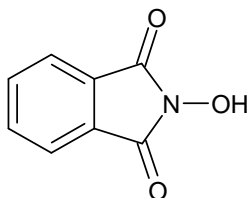
35 Como realización ilustrativa, la reacción de modificación de un grupo R5' en el grupo R5 deseado puede llevarse a cabo mediante la aplicación o adaptación de métodos conocidos. Por ejemplo, en (E), R5 puede ser un grupo alquilo sustituido por grupos R7 : así puede ser recomendable modificar los grupos R7' en (E') por el pretendido R7 en (E). Estas reacciones de modificación son ampliamente conocidas. Como ejemplo representativo, puede querer cambiarse el precursor R5' que incluye el grupo R7'=S(alquilo) con R7=SO₂(alquilo). Esta reacción puede llevarse a cabo en presencia de MCPBA. Normalmente, esta reacción puede llevarse a cabo con un disolvente orgánico como el diclorometano.

40

Este proceso de la invención puede incluir el paso de preparar (E) o (E') según proceda, mediante la reacción de un compuesto (F)



- 5 Donde R5'' representa R5 o R5' como se define a continuación, y Gs' representa un grupo saliente como un átomo de halógeno o un grupo hidroxilo (OH), con *N*-hidroxifitalimida (G):



(G)

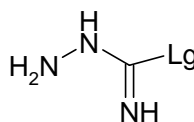
- 10 Normalmente, el acoplamiento de (F) y (G) puede llevarse a cabo según las condiciones de la síntesis de Gabriel.

Según una materialización, esta reacción también puede llevarse a cabo en presencia de una base como una base orgánica o mineral, normalmente TEA o K₂CO₃, o NaOAc, en particular donde Gs contiene halógeno(s).

- 15 Según otro supuesto ilustrativo, el primer paso puede realizarse en presencia de azodicarboxilato de diisopropilo y PPh₃, en particular donde Gs=OH.

Los compuestos (F), (G) y (B) se encuentran disponibles en el mercado.

- 20 Los compuestos de fórmula (D):



(D)

donde Gs es un -S-alquilo, p. ej. -S-metilo también forma parte de la invención.

- 25 Además del proceso indicado anteriormente, los compuestos y procesos de la presente invención pueden prepararse de diversos modos bien conocidos para los expertos en la materia. Los compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, aplicando o adaptando los métodos descritos a continuación, o variaciones de los mismos, según considere el experto. Las modificaciones y sustituciones pertinentes pueden resultar evidentes y bien conocidas se pueden obtener a partir de la literatura científica para aquellos expertos en la materia.

- 30 En particular, estos métodos pueden encontrarse en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH publishers, 1989

- 35 Como se puede apreciar, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos, y puede aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. De esta forma, se destinan todas las formas quirales, diastereoméricas y racémicas, y todas las formas isoméricas geométricas, a no ser que se indique específicamente la forma estereoquímica o isomérica. Es bien conocida la forma de preparar y aislar estas formas ópticamente activas. Por ejemplo, las mezclas de estereoisómeros pueden separarse mediante técnicas estándar entre las cuales se incluyen, entre otras, resolución de formas racémicas, cromatografía normal, de fase inversa y quiral, formación preferente de sales, recristalización y similares, o mediante síntesis deliberada de centros quirales diana.

- 40 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante diversas rutas sintéticas. Los reactivos y los materiales iniciales se encuentran disponibles en el mercado o ya se encuentran sintetizados por técnicas bien conocidas por alguien sin competencias especializadas en la materia. A no ser que se indique lo contrario, todos los sustituyentes son los previamente definidos.

- 45 En las reacciones aquí descritas, puede ser necesario proteger los grupos funcionales de reactivos, por ejemplo los grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxi, en aquellos casos en los que estos se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Los grupos protectores pueden utilizarse según la práctica estándar, por ejemplo, ver T.W. Greene and P. G. M. Wuts in *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1991; J. F. W. McOmie in *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

- 55 Algunas reacciones pueden llevarse a cabo en presencia de una base. No existen restricciones particulares sobre el tipo de base utilizada en esta reacción y cualquier base utilizada habitualmente en reacciones de este tipo también puede utilizarse aquí, siempre que no ejerza ningún efecto adverso en las otras partes de la molécula. Entre los

ejemplos de bases idóneas se encuentran: hidróxido de sodio, carbonato potásico, trietilamina, hidruros de metales alcalinos, como hidruro de sodio e hidruro de potasio; compuestos de alquilio, como metilio y butilio; y alcóxidos de metales alcalinos, como el metóxido de sodio y el etóxido de sodio.

5 Normalmente, las reacciones se realizan en un disolvente adecuado. Pueden utilizarse diferentes disolventes, siempre que no tengan un efecto adverso en la reacción ni en los reactivos implicados. Entre los disolventes adecuados se encuentran: los hidrocarburos, que pueden ser aromáticos, alifáticos o cicloalifáticos, como el hexano, el ciclohexano, el benceno, el tolueno y el xileno; las amidas, como la dimetilformamida; los alcoholes como el etanol y el metanol; y los éteres, como el éter etílico y el tetrahidrofurano.

10 Las reacciones pueden tener lugar en un amplio rango de temperaturas. Por lo general, consideramos conveniente realizar la reacción a una temperatura comprendida entre 0 y 150 °C (más preferiblemente entre aproximadamente temperatura ambiente y 100 °C). El tiempo necesario para la reacción también puede variar en gran medida, dependiendo de muchos factores, en particular la temperatura de la reacción y el tipo de reactivos. No obstante, siempre que la reacción se realice en las condiciones preferidas anteriormente descritas, normalmente bastará un
15 periodo de entre 3 y 20 horas.

El compuesto así preparado puede recuperarse a partir de la mezcla de la reacción por medios convencionales. Por ejemplo, los compuestos pueden recuperarse destilando el solvente a partir de la mezcla de la reacción o, en caso necesario, tras destilar el disolvente de la mezcla de la reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y destilando el disolvente del extracto. Además, es posible purificar más el producto, si se desea, mediante técnicas bien conocidas, como la recristalización, la reprecipitación o las distintas técnicas cromatográficas, en particular la cromatografía en columna o la cromatografía preparativa en capa fina.

25 El proceso de la invención también puede incluir un paso adicional de aislar el producto de fórmula (I) obtenido.

Los productos o reactivos iniciales pueden encontrarse a la venta o personal cualificado puede prepararlo fácilmente aplicando o adaptando los procedimientos indicados en la parte experimental siguiente.

30 APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Los compuestos de fórmula (I) o (II) tienen posibles aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de trastornos asociados con la acumulación de proteínas mal plegadas o proteínas desplegadas. En particular, los compuestos de fórmula (I) o (II) pueden tener un efecto protector contra el estrés citotóxico del retículo endoplasmático (RE) y trastornos asociados a la edad..

35 Aquí se describe el uso de un compuesto de fórmula (I) o (II) como se describe anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno asociado al estrés provocado por el mal plegamiento de proteínas y en particular, a una acumulación de proteínas mal plegadas.

40 Preferiblemente, se describe que el compuesto de fórmula (I) o (II) se utiliza para tratar enfermedades en las que la acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas está implicada en el modo de acción (Brown *et al*, 2012, *Frontiers in Physiology*, 3, Article 263).

45 Otro aspecto de la invención está relacionado con el uso de un compuesto de fórmula (I) o (II) como se describe anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar proteínopatías. Las proteínopatías hacen referencia a un tipo de enfermedades en las cuales ciertas proteínas resultan estructuralmente anormales y por tanto alteran el funcionamiento de las células, tejidos y órganos del cuerpo. A menudo, las proteínas no se pliegan según su conformación formal y, en este estado mal plegado o desplegado, las proteínas pueden resultar de cierta forma tóxicas (un aumento de la función tóxica), pueden perder su función normal o pueden ver reducida su actividad biológica.
50 Entre las as proteínopatías, trastornos de conformación proteica o enfermedades de mal plegamiento proteico, se incluyen muchas enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad priónica, la diabetes de tipo 2, la amiloidosis y una amplia gama de otros trastornos (ver algunos ejemplos a continuación).

55 Tal como se entiende en el presente documento, los términos "proteínopatías, trastornos de conformación proteica, enfermedades de mal plegamiento proteico, enfermedades asociadas al estrés por el mal plegamiento proteico, enfermedades asociadas a una acumulación de proteínas mal plegadas, enfermedades asociadas a un estrés citotóxico del RE, enfermedades relacionadas con UPR (respuesta a proteínas desplegadas) asociadas tienen el mismo significado y hacen referencia a enfermedades en las cuales determinadas proteínas resultan estructuralmente anormales y, por tanto, alteran la homeostasis celular.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "proteína mal plegada" y "proteína desplegada" tiene el mismo significado y hacen referencia a proteínas que no se pliegan en su conformación normal.

Tal como se utiliza en el presente documento, la frase "preparación de un medicamento" incluye la utilización de uno o más de los compuestos anteriormente descritos directamente como medicamento además de su uso en un programa de cribado para más principios activos o en cualquier etapa de la fabricación de un medicamento de este tipo.

5 También se describe un método de tratar la proteinopatía y/o un trastorno asociado al estrés por mal plegado proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas en un sujeto que las necesite. Dicho método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I) o (II) definido anteriormente para dicho sujeto.

10 El término "método" se refiere a las formas, los medios, las técnicas y los procedimientos para realizar una determinada tarea que incluye, entre otras cosas, las formas, medios, técnicas y procedimientos ya conocidos o desarrollados para el caso a partir de formas medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales del sector químico, farmacéutico, biológico, bioquímico y médico.

15 En el presente documento, el término "tratamiento" incluye abrogar, inhibir considerablemente, ralentizar o revertir el desarrollo de una enfermedad o trastorno, mejorar significativamente los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno.

20 Los términos "enfermedad", "trastorno" y "condiciones" tienen el mismo significado en el presente documento. La enfermedad está asociada a una actividad de respuesta al estrés del retículo endoplasmático y/o al estrés por mal plegado proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a esa cantidad del compuesto que, al administrarse, mitigan en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que se esté tratando.

25

En otra versión, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula (I) o (II) definido anteriormente para usar en el tratamiento de trastornos de la UPR. El término "respuesta a proteínas desplegadas" o UPR se refiere a un componente del sistema de defensa celular contra las proteínas mal plegadas que adapta el plegamiento en el retículo endoplasmático (RE) a las condiciones cambiantes. La UPR se activa en respuesta a una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplasmático. En este escenario, la UPR tiene dos objetivos principales: (i) restablecer la función normal de la célula frenando la traducción proteica y (ii) activar las vías de señalización que llevan al aumento de la producción de las chaperonas moleculares implicadas en el plegamiento proteico. Si estos objetivos no se logran en un cierto periodo de tiempo, o la disrupción se prolonga, la UPR se convertirá en apoptosis. Los componentes aguas arriba de la UPR son las proteínas transmembrana IRE1, ATF6 y PERK residentes en el retículo endoplasmático que detectan defectos de plegamiento para reprogramar la transcripción y la traducción de forma concertada y restaurar la proteostasis. IRE1 y ATF6 activadas aumentan la transcripción de genes implicados en el plegamiento del RE, tales como los que codifican las chaperonas Bip y GRP94. PERK activado atenúa la síntesis de proteínas global mediante la fosforilación de la subunidad del factor de iniciación 2 de la traducción (eIF2 α) en Ser51, mientras que promueve la traducción del factor de transcripción ATF4. Este último controla la expresión de CHOP, otro factor de transcripción, que a su vez promueve la expresión de la PPP1R15A/GADD34. La PPP1 R15A, un efector de un bucle de retroalimentación negativa que termina la señalización de la UPR, recluta a una subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1c) para defosforilar eIF2 α , lo que permite reanudar la síntesis de proteínas. Un fallo de la UPR contribuye a muchas condiciones patológicas que pueden ser corregidas mediante un estímulo adecuado de esta respuesta adaptativa. Los inhibidores selectivos de fosfatasa eIF2 α PPP1R15A inducida por el estrés retrasa la defosforilación de eIF2 α y, en consecuencia, la síntesis de proteínas selectivamente en células estresadas, sin afectar a la síntesis de proteínas en las células no estresadas que constitutivamente expresa la fosfatasa eIF2 α PPP1R15B-PP1. Esto prolonga los efectos favorables de la UPR. Una reducción transitoria de la síntesis de proteínas es favorable para las células estresadas porque la disminución del flujo de proteínas sintetizadas aumenta la disponibilidad de chaperonas y, por lo tanto, protege del estrés por mal plegamiento (Tsaytler *et al.*, 2011 Science, 332, 91-94). Los inhibidores no selectivos de las dos fosfatasas eIF2 α PPP1R15A-PP1 y PPP1R15B- podrían tener efectos indeseables, ya que la inhibición persistente de la traducción es perjudicial. De hecho, la ablación genética de la PPP1R15A y la PPP1R15B da como resultado la letalidad embrionaria temprana en ratones lo que indica que la inhibición de las dos fosfatasas eIF2 α PPP1R15A-PP1 y PPP1R15B-PP1 es perjudicial en un contexto orgánico. En cambio, la ablación genética de la PPP1R15A no tiene ninguna consecuencia perjudicial en ratones (Harding *et al.*, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 1832-1837). Además, se prevé que los inhibidores específicos de la PPP1 R15A sean inertes en las células no estresadas, ya que la PPP1 R15A no se expresa en ausencia de estrés. Por lo tanto, se prevé que los inhibidores selectivos de la PPP1R15A sean seguros. Los inhibidores no selectivos de las dos fosfatasas eIF2 α también pueden ser útiles para tratar enfermedades por mal plegamiento proteico, cuando se usan con dosis que dan como resultado solamente una inhibición parcial de las fosfatasas.

60

La citoprotección contra el estrés del RE se puede medir mediante un ensayo adecuado. Por ejemplo, la citoprotección se puede medir en células HeLa en las que el estrés del retículo endoplasmático se provoca por la adición de medios que contienen tunicamicina, una mezcla de antibióticos de nucleósidos homólogos que inhibe la familia de enzimas UDP-HexNAc: poliprenol- P HexNAc-1-P y se utiliza para inducir la respuesta a proteínas desplegadas. La viabilidad

65

celular puede detectarse en presencia y ausencia de compuestos inhibidores después de un período determinado de tiempo, midiendo la reducción de WST-8 en formazano usando un kit de viabilidad celular estándar (como el Kit-8 de recuento de la viabilidad celular de Dojindo). La citoprotección de estrés del retículo endoplasmático se mide en términos del aumento de porcentaje en las células viables (en relación con el control) posterior al estrés del retículo endoplasmático. En la sección de ejemplos adjunta se exponen más detalles de un ensayo adecuado.

En una versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es capaz de prolongar el efecto protector de la UPR en relación con el control (es decir, en ausencia del compuesto Inhibidor) en al menos un 10%, en al menos un 20 %, más preferentemente, al menos un 30%, incluso más preferentemente, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, y aún más preferentemente, al menos un 90%.

Los compuestos de la fórmula (I) o (II) son inhibidores de la interacción de la PPP1R15A-PP1 que provocan un efecto protector. Preferentemente, el compuesto presenta un efecto protector con EC_{50} de menos de aprox. 5 μ M, incluso más preferentemente, menos de aprox. 2 μ M, aún más preferentemente, menos de aproximadamente 1 μ M. El compuesto debe ser preferentemente desprovisto de actividad adrenérgica alfa2. Por lo tanto, en una versión preferente, el compuesto no presenta ninguna actividad en un ensayo adrenérgico alfa2 funcional.

Ciertos compuestos de la fórmula (I) o (II) inhiben selectivamente la PPP1R15A-PP1 y, por lo tanto, prolongan el efecto protector de la UPR, rescatando con ello a las células del estrés de las proteínas mal plegadas. Los inhibidores de la PPP1R15A-PP1 descritos en la presente invención, por lo tanto, tienen aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de una variedad de enfermedades relacionadas con el estrés por proteínas mal plegadas y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas, más específicamente en el tratamiento de

Como se ha mostrado, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es capaz de inhibir la PPP1R15A y la PPP1R15B. En una realización, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es capaz de inhibir selectivamente la PPP1R15A sobre la PPP1R15B.

También se muestra un compuesto de la fórmula (I) o (II) como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de un trastorno asociado a la vía de fosforilación de eIF2 α donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción. Preferiblemente, el trastorno es una enfermedad o trastorno relacionado con la PPP1R15A.

También se muestra un compuesto de la fórmula (I) o (II) como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de un trastorno causado por, asociado a o acompañado por la fosforilación de eIF2 α y/o la actividad de la PPP1R15A donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción.

En otra realización, la invención describe un compuesto de la fórmula (I) o (II) como se ha descrito anteriormente para usar en el tratamiento de trastornos de la UPR tales como, entre otros, el envejecimiento (Naidoo *et al.*, 2008, J Neurosci, 28, 6539-48).

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

También se describe un procedimiento para el tratamiento de un mamífero que tiene un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de la PP1R15A, donde la acumulación de proteínas mal plegadas está involucrada en el modo de acción, en el que el procedimiento comprende la administración a un mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula (I) o (II) tal como se define anteriormente.

También se describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de trastornos relacionados con el estrés por mal plegamiento proteico, y en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de la UPR, en el que dicho compuesto tiene actividad agonista adrenérgica alfa 2 nula o reducida en comparación con el guanabenz.

También se describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de trastornos relacionados con el estrés por mal plegamiento proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de la UPR, en el que dicho compuesto no inhibe la traducción de proteínas en células no estresadas que expresan la PPP1R15B.

También se describe un procedimiento para el tratamiento de un trastorno caracterizado por la actividad de respuesta al estrés del RE con una acumulación de proteínas mal plegadas, que comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto de la fórmula (I) o (II) en el que dicho compuesto modula la respuesta al estrés del RE.

También se describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de los trastornos relacionados con el estrés por mal plegamiento proteico y, en

particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de la UPR, en el que dicho compuesto tiene una selectividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1, pero que tiene una actividad nula o reducida hacia la holofosfatasa PPP1R15B-PP1, y en el que la proporción (actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1/actividad hacia la PPP1R15B-PP1) de dicho compuesto es al menos igual o superior a la proporción (actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1/actividad hacia la PPP1R15B-PP1) del guanabenz.

También se describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de trastornos relacionados con el estrés por mal plegamiento proteico y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas y/o trastornos de la UPR, en el que:

dicho compuesto tiene una actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1 pero actividad nula o reducida hacia la holofosfatasa PPP1R15B-PP1 y;

- en el que la proporción (actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1/actividad hacia la PPP1R15B-PP1) de dicho compuesto es al menos igual o superior a la proporción (actividad hacia la holofosfatasa PPP1R15A-PP1/actividad hacia la PPP1R15B-PP1) del guanabenz; y

en el que dicho compuesto tiene actividad agonista adrenérgica alfa 2 nula o reducida en comparación con el guanabenz.

También se describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad o condición caracterizada por al menos una de las tres siguientes opciones: (1) estrés del ER, (2) acumulación celular de proteínas desplegadas o mal plegadas y (3) una UPR.

En otra versión, la invención se refiere a un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto caracterizada por, o relacionada con, al menos una de las siguientes opciones: (1) estrés del retículo endoplasmático (RE), (2) una acumulación celular de proteínas desplegadas o mal plegadas y (3) respuesta a proteínas desplegadas.

La enfermedad está relacionada con una actividad de respuesta al estrés del ER y/o con el estrés a causa de proteínas mal desplegadas y, en particular, con una acumulación celular de proteínas desplegadas y/o mal plegadas; más específicamente la enfermedad es una proteinopatía. De acuerdo con esta invención, son ejemplos de enfermedad, entre otros, los siguientes:

- **Enfermedades neurodegenerativas** como las tauopatías (como la enfermedad de Alzheimer, entre otras), las sinucleinopatías (como la enfermedad de Parkinson, entre otras), la enfermedad de Huntington y las enfermedades relacionadas con la poliglutamina y la polialanina (como la distrofia muscular oculofaríngea), las enfermedades priónicas (también llamadas encefalopatías espongiiformes transmisibles), los trastornos desmielinizantes tales como las enfermedades de Charcot-Marie Tooth (también llamada neuropatía hereditaria motora y sensorial), las leucodistrofias, la esclerosis lateral amiotrófica (también llamada enfermedad de la motoneurona y enfermedad de Lou Gehrig) y la esclerosis múltiple.

Son ejemplos de **tauopatías**, entre otros, la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal y la degeneración lobar frontotemporal (enfermedad de Pick). La demencia frontotemporal (FTD, por sus siglas en inglés) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una pérdida neuronal progresiva que implica predominantemente los lóbulos frontal y/o temporal; con una prevalencia situada solo después de la enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés), la FTD representa el 20 % de los casos de demencia a una edad temprana. La implicación de la UPR en las tauopatías está bien documentada (véase Stoveken 2013, The Journal of Neuroscience 33(36):14285–14287). Sin ser obligado por una teoría, se prevé que los compuestos de la invención que son inhibidores de la PPP1R15A mitigarán las manifestaciones de las tauopatías. En una realización preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre la demencia frontotemporal (FTD), la parálisis supranuclear y la degeneración corticobasal, preferiblemente la FTD.

Son ejemplos de **sinucleinopatías**, entre otros, la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, el fallo autonómico puro y la atrofia sistémica múltiple. Recientemente, Colla *et al.* (J. of Neuroscience 2012 Vol. 32 N°10 pp3306-3320) ha demostrado que el Salubrinal, una pequeña molécula que aumenta la fosforilación de eIF2alpha inhibiendo la desforforilación mediada por la PPP1R15A de eIF2 alpha (Boyce *et al.* 2005 Science Vol. 307 pp935-939), atenúa significativamente las manifestaciones de enfermedades en dos modelos de alfasinucleinopatía en animales. Los compuestos de la invención que son inhibidores de la PPP1R15A mitigarán las manifestaciones de alfasinucleinopatías tales como la enfermedad de Parkinson. En una realización preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de alfasinucleinopatías tales como la enfermedad de Parkinson.

Son ejemplos de **enfermedades relacionadas con la poliglutamina**, entre otros, la atrofia muscular espinobulbar (o enfermedad de Kennedy) la enfermedad de Huntington, la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, la ataxia espinocerebelosa tipo 1, la ataxia espinocerebelosa tipo 2, la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (o enfermedad de

Machado-Joseph), la ataxia espinocerebelosa tipo 6, la ataxia espinocerebelosa tipo 7 la ataxia espinocerebelosa tipo 17. El guanabenz también reduce la acumulación de huntingtina mutante en los ensayos celulares (WO2008/041133). Este hallazgo es inesperado, ya que la huntingtina mutante o bien es citosólica o nuclear. Sin embargo, existen indicios de que el metabolismo de la huntingtina mutante ha estado previamente conectado a la respuesta al estrés del RE (Nishitoh *et al.*, 2002, *Genes Dev*, 16, 1345-55; Rousseau *et al.*, 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 9648-53; Duennwald and Lindquist, 2008, *Genes Dev*, 22, 3308-19). Los hallazgos de que el guanabenz protege a las células contra el estrés citotóxico del RE y reduce la acumulación de huntingtina mutante también sostienen la idea de que puede haber aspectos de la respuesta al estrés del RE que tienen un impacto sobre la acumulación de huntingtina mutante. No obstante, el guanabenz no es útil para el tratamiento de enfermedades humanas por mal plegamiento proteico debido a su actividad hipotensora. En cambio, los inhibidores de la PPP1R15A derivados del guanabenz desprovistos de la actividad adrenérgica alfa 2 de esta invención podrían ser útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la poliglutamina y, más concretamente, de la enfermedad de Huntington. En una realización preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Son ejemplos de **enfermedades relacionadas con la polialanina** la distrofia muscular oculofaríngea que está causada por el tramo de polialanina en la proteína nuclear 1 de unión a poli-A (PABPN1). Barbezier *et al.* (2011, *EMBO Vol. 3* pp35-49) demostró que el guanabenz reduce la agregación en la atrofia muscular oculofaríngea. En una realización preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la polialanina, más específicamente con la atrofia muscular oculofaríngea.

Son ejemplos de **enfermedades priónicas** de humanos, entre otras, la enfermedad clásica de Creutzfeldt-Jakob, la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, un trastorno humano relacionado con la encefalopatía espongiiforme bovina), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal y el kuru. El guanabenz reduce los síntomas de los ratones infectados con priones (D. Tribouillard-Tanvier *et al.*, 2008 *PLoS One* 3, e1981). No obstante, el guanabenz no es útil para el tratamiento de enfermedades humanas por mal plegamiento proteico debido a su actividad hipotensora. En cambio, los inhibidores de la PPP1R15A derivados del guanabenz desprovistos de la actividad adrenérgica alfa 2 de la invención podrían ser útiles para tratar las enfermedades priónicas. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal y el kuru.

Las enfermedades desmielinizantes se caracterizan por una pérdida de oligodendrocitos en el sistema nervioso central o de células de Schwann en el sistema nervioso periférico. El fenómeno asociado a una enfermedad desmielinizante se caracteriza por una disminución de los axones mielinizados en el sistema nervioso central o el sistema nervioso periférico. Los ejemplos no limitativos de proteínas mal plegadas de una célula mielinizante (incluido el oligodendrocito y la célula de Schwann) se seleccionan de entre el grupo de CC1, proteína básica de mielina básica (PBM), la ceramida galactosiltransferasa (CGT), glicoproteína asociada a mielina (MAG), glucoproteína del oligodendrocito asociada a la mielina (MOG), glicoproteína oligodendrocito-mielina (OMG), nucleótido cíclico fosfodiesterasa (CNP), proteína cero de la mielina (MPZ), proteína periférica de la mielina 22 (PMP22), conexina 32 (Cx32), proteína 2 (P2), galactocerebrósido (GalC), sulfátido y proteína proteolipídica (PLP). La MPZ, la PMP22, la Cx32 y la P2 son las proteínas mal plegadas preferentes para las células de Schwann. La PLP, la MBP y la MAG son las proteínas mal plegadas preferentes para los oligodendrocitos.

En determinadas versiones, el trastorno desmielinizante se selecciona de entre el grupo de **enfermedades de Charcot-Marie Tooth (CMT)**. Las CMT se refieren a un grupo de trastornos neuropáticos hereditarios que se caracterizan por una polineuropatía sensorial y motora crónica. Se han identificado distintos tipos de CMT, tales como la CMT1, la CMT2, la CMT4, la CMTX y el síndrome de Dejerine-Sottas. Los subtipos CMT pueden dividirse a su vez principalmente en hallazgos genéticos moleculares. Por ejemplo, la CMT1 se subdivide en CMT1A, 1B, 1C, 1D, 1e, 1F/2E y 1x. Más de 100 mutaciones en el gen que codifica la proteína cero de la mielina (P0), una proteína transmembrana de paso único, que es la proteína principal producida por las células de Schwann mielinizantes, provocan la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth (D'Antonio *et al.*, 2009, *J Neurosci Res*, 87, 3241-9). Las mutaciones son predominantemente heredadas y provocan la enfermedad mediante un aumento de la función tóxica (D'Antonio *et al.*, 2009, *J Neurosci Res*, 87, 3241-9). La eliminación de la serina 63 de la P0 (P0S63del) provoca la neuropatía 1B de Charcot-Marie-Tooth en humanos y una neuropatía desmielinizante similar en ratones transgénicos. La proteína mutante se acumula en el retículo endoplasmático da lugar a la UPR (D'Antonio *et al.*, 2009). Escisión genética del CHOP, un gen proapoptótico de UPR que redefine la función motora en los ratones Marie-Tooth (Pennuto *et al.*, 2008, *Neuron*, 57, 393-405). El hallazgo de que la inhibición de la PPP1R15A en las células anula prácticamente la expresión en células estresadas del retículo endoplasmático indica que la inhibición genética o farmacológica de la PPP1R15A debería reducir la disfunción motora en ratones Charcot-Marie-Tooth. Recientemente, D'Antonio *et al.* (2013 *J. Exp. Med* Vol. pp1-18) demostró que el ratón P0S63del tratado con salubrinal recuperó casi totalmente su capacidad motora normal en un análisis rotarod y estuvo acompañado por una recuperación de las anomalías morfológicas y electrofisiológicas. La acumulación del mutante ligado al CMT en las proteínas no exclusivo del P0S63del; se han

identificado al menos otros cinco mutantes P0 retenidos en el retículo endoplasmático ER que provocan una UPR (Pennuto *et al.*, 2008 ; Saporta *et al.*, 2012 Brain Vol.135 pp2032-2047). Además, el mal plegamiento proteico y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático estaban implicados en la patogénesis de otras neuropatías CMT como resultado de mutaciones en la PMP22 y la Cx32 (Colby *et al.*, 2000 Neurobiol.Disease Vol. 7 pp561-573; Kleopa *et al.*, 2002 J. Neurosci. Res. Vol.68 pp522-534; Yum *et al.*, 2002 Neurobiol. Dis. Vol. 11 pp43-52). No obstante, el salubrinal es tóxico y no puede usarse para tratar a pacientes humanos D'Antonio *et al.* (2013). En cambio, se prevé que los inhibidores de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) serán seguros y podrían ser útiles para el tratamiento de CMT, preferentemente de la CMT-1, y más preferentemente la CMT-1A, la CMT-1B, la CMT-1E y la CMT-1X. En una versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de las enfermedades de Charcot-Marie-Tooth, preferentemente la CMT-1, y más preferentemente la CMT-1A, la CMT-1B, la CMT-1E y la CMT-1X. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de las CMT, preferentemente la CMT-1 y el síndrome de Dejerine-Sottas. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de las CMT asociadas a una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la CMT-1A. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la CMT-1B. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la CMT-1E. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la CMT-1X.

En otra versión, el compuesto de fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de la CMT, preferentemente para usar en el tratamiento de la CMT-1, asociado a al menos un compuesto seleccionado de entre el grupo de Sorbitol-D, baclofen, pilocarpina, naltrexona, metimazol, mifepristona, ketoprofeno y sales de los mismos. Los compuestos se combinan para una administración conjunta o individual, en simultáneo o de forma consecutiva.

La invención describe la composición que comprende un inhibidor de la PPP1R15A seleccionado de entre el grupo del compuesto de la fórmula (I) o (II), el guanabenz y el salubrinal o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un compuesto y sales del mismo comercializado, para usar en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente CMT, más preferentemente CMT-1. La dosis de los compuestos en la composición deben situarse dentro del intervalo de dosis, no por encima de las dosis habitualmente prescritas para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o de las dosis que esté demostrado que son seguras en la el ensayo clínico de fase 3; la dosis preferente de los compuestos de la combinación corresponderá a unas cantidades de entre el 1 % y el 10 % de las que suelen prescribirse para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

Así, la invención describe la composición que comprende un inhibidor de la PPP1R15A seleccionado de entre el grupo del compuesto de la fórmula (I) o (II), el guanabenz y el salubrinal o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto que aumente la expresión de la proteína PMP22, seleccionado de entre el grupo de D-Sorbitol, baclofeno, pilocarpina, naltrexona, metimazol, mifepristona, ketoprofeno y sales de los mismos, para el tratamiento de la CMT, preferentemente la CMT-1, más preferentemente la CMT-1A y más preferentemente la CMT-1A, la CMT-1B, la CMT-1E y la CMT-1X.

En otras expresiones, la enfermedad desmielinizante se selecciona de entre el grupo del compuesto **deleucodistrofias**. Son ejemplos de leucodistrofias, entre otros, la adrenoleucodistrofia (ALD), la enfermedad de Alexander, la enfermedad de Canavan, la enfermedad de Krabbe, la leucodistrofia metacromática (MLD), la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMD), la ataxia infantil con hipomielinización del sistema nervioso central (también conocida como la enfermedad de sustancia blanca evanescente), el síndrome Camfak, la enfermedad de Refsum, el síndrome de Cockayne, el síndrome de Van der Knapp, el síndrome de Zellweger, el síndrome de Guillain-Barré (GBS), la polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica (CIDP), la neuropatía motora multifocal (MMN) y la parálisis supranuclear progresiva, la leucoencefalopatía progresiva multifocal (PML), la encefalomielitis, la mielinólisis pontina central (CPM) y la enfermedad anti-MAG, entre otros. Gow *et al.* (Neuron, 2002 Vol. 36, 585–596) demostró que la respuesta de la proteína mal plegada se activa en la PMD, y demostró que esta vía es la duplicación del gen PLP1. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de leucodistrofias, y preferentemente de la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMD).

A la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se la describe como una enfermedad neuronal motora y como la enfermedad de Lou Gehrig. Actualmente se sabe bien que el mal plegado proteico juega un papel fundamental en la ALS tanto familiar como esporádica (Matus *et al.* 2013 Int. J. Cell Biol. ID674751 <http://dx.doi.org/10.1155/2013/674751>). Saxena *et al.* (Nature Neuroscience 2009 Vol. 12 pp627-636) demostró que el salubrinal prolonga la esperanza media de vida de un ratón transgénico G93A-SOD1 con un modelo de la enfermedad neuronal motora. Más recientemente, Jiang *et al.* (Neuroscience 2014) demostró que Guanabenz retrasa la aparición de los síntomas de la enfermedad, aumenta la esperanza de vida, mejora el rendimiento motor y atenúa

la pérdida neuronal en el modelo de ratón SOD1 G93A de ALS. Sin limitarse a una teoría, se prevé que los compuestos de la invención que son inhibidores de la PPP1R15A derivados de guanabenz mitigarán las manifestaciones de la enfermedad de ALS sin la mutación G93A de SOD1. Por tanto, los compuestos de la fórmula (I) y (II) pueden utilizarse para tratar tanto las formas familiares como las esporádicas de ALS.

Son ejemplos de **seipinopatías**, sin limitarse a la enfermedad motora relacionada con el tipo 2 (BSCL2) de lipodistrofia congénita Berardinelli-Seip, la lipodistrofia generalizada congénita (CGL), el síndrome de Silver, neuropatía motora hereditaria distal de tipo V (dHMN-V). La expresión de formas mutantes de seipina en células cultivadas activa la vía de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y provoca la muerte de las células del retículo endoplasmático por estrés (Ito & Suzuki, 2009 Brain 132: 87-15). De acuerdo con la versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de la seipinopatía.

En otra versión, el trastorno desmielinizante indicado es la **esclerosis múltiple** y la enfermedad de Schilder relacionada. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de la seipinopatía.

- Fibrosis quística (CF)

Norez *et al.* (2008 Eur. J. Pharmacol. Vol. 592 pp33-40) demostró que Guanabenz activa las corrientes de cloruro dependiente de Ca²⁺ en las células epiteliales aéreas humanas de la fibrosis quística. Sin limitarse a una teoría, se anticipa que los compuestos de la invención que son inhibidores de la PPP1R15A derivados de guanabenz mitigarán las manifestaciones de la fibrosis quística. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de la fibrosis quística.

- Enfermedades retinales.

Recientemente, la literatura publicada ha aportado pruebas de que el UPR está implicado en el desarrollo de la degeneración retinal: la degeneración retinal heredada como la ciliopatía y la retinitis pigmentosa, la degeneración macular, a retinopatía de la prematuridad, la degeneración retinal provocada por la luz, el desprendimiento de retina, la retinopatía diabética y el glaucoma (para revisar Gorbatyuk et Gorbatyuk 2013 - Retinal degeneration: Focus on the unfolded protein response, Molecular Vision Vol. 19 pp1985-1998). Las nuevas evidencias apoyan una función del estrés del retículo endoplasmático role of ER en la apoptosis retinal y la muerte celular (Jing *et al.*, 2012, Exp Diabetes Res, 2012, 589589).

Las ciliopatías retinales son un grupo de trastornos genéticos que se originan debido a defectos en el cilio primario de fotorreceptores que provocan la retinitis pigmentosa. Se ha informado de que este defecto provoca un estrés en el retículo endoplasmático debido a la acumulación de proteínas en el segmento interno del fotorreceptor que, por su parte, provoca el UPR (WO2013/124484). La degeneración retinal es una característica común en las ciliopatías que puede observarse tanto en la retinitis pigmentosa aislada como en la amaurosis congénita de Leber o la retinitis pigmentosa ligada al X, o también en condiciones sindrómicas como el síndrome de Bardet-Biedl Syndrome (BBS), el síndrome de Alström (ALMS) o el síndrome de Usher. La ciliopatía retinal se selecciona del grupo que consisten en el síndrome de Bardet-Biedl, el síndrome de Senior-Loken, el síndrome de Joubert, el síndrome de Salidono-Mainzer, el síndrome de Sensenbrenner, el síndrome de Jeune, el síndrome de Meckel-Gruder, el síndrome de Alström, el síndrome de MORM, la amaurosis congénita de Leber causada por una mutación en el gen ciliar y la retinitis pigmentosa ligada al X provocada por una mutación en el gen RPGR.

Retinitis pigmentosa es una enfermedad ocular degenerativa heredada, una enfermedad ocular degenerativa que provoca un deterioro ocular grave y a menudo la ceguera. Es la causa más común de ceguera genéticamente determinada. Los afectados presentarán uno o más de los siguientes síntomas: ceguera nocturna; visión de túnel (sin visión periférica); visión periférica (sin visión central); visión empalizada; aversión al deslumbramiento; ajuste lento al pasar de un ambiente oscuro a uno luminoso y viceversa; visión borrosa; separación del color deficiente; cansancio extremo. La retinitis pigmentosa (RP) está causada por más de 100 mutaciones en el gen de la rodopsina (Dryja *et al.*, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 88, 9370-4). La rodopsina es un receptor acoplado a la proteína G que transduce la luz en los fotorreceptores del bastón y consiste en un complejo covalente entre la opsina de la proteína de la membrana de 348 aminoácidos, con enlaces de covalencia a 11-cis retinal (Palczewski, 2006, Annu Rev Biochem, 75, 743-67). Las mutaciones de rodopsinas que provocan RP son en su mayoría mutaciones missense distribuidas por la proteína (Dryja *et al.*, 1991), de forma similar a lo que ocurre con las mutaciones SOD1 que provocan ALS- (Valentine *et al.*, 2005, Annu Rev Biochem, 74, 563-93). Las mutaciones de rodopsina que provocan RP han sido estudiadas en varios sistemas y resultan de la expresión heteróloga de las proteínas en células de mamíferos, en ratones transgénicos y drosophila son constantes (Griciuc *et al.*, 2011, Trends Mol Med, 17, 442-51). Las mutaciones de rodopsina que provocan RP más prevalentes no se pliegan, no se ligan a 11-cis-retinal, no llegan a la superficie de la célula, sino que se quedan retenidas en el retículo endoplasmático (Griciuc *et al.*, 2011, Trends Mol Med, 17, 442-51). El mal plegado de la mutación de la rodopsina provoca estrés en el retículo endoplasmático y la muerte de las células bastones (Griciuc *et al.*, 2011). Esto indica claramente que los inhibidores de la PPP1R15A como Guanabenz

pero que no muestran de manera ventajosa ninguna actividad hacia el receptor adrenérgico alpha2A, como compuestos de la invención, mitigará la RP.

En una versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de enfermedades retinales, más preferiblemente, de la degeneración retinal heredada, como ciliopatías retinales, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de la prematuridad, degeneración retinal provocada por la luz, desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de la retinitis pigmentosa sindrómica y/o la retinitis pigmentosa no sindrómica. De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber. De acuerdo con otra versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento del síndrome de Bardet-Biedl. De acuerdo con otra versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento del síndrome de Alström. De acuerdo con otra versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento del síndrome de Usher.

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa principal de legal blindness entre las personas mayores de 65 años en los Estados Unidos. Shen *et al.* (2011 Effect of Guanabenz on Rat AMD Models and Rabbit Choroidal Blood – Vol. 5 pp27-31) demostró que Guanabenz protegía significativamente el epitelio pigmentario retinal (RPE) de la degeneración inducida por NaIO₃, inhibía el desarrollo de la neovascularización coroidea (CNV) en el modelo AMD inducido por láser en ratas y aumentaba el flujo sanguíneo coroidea de manera notable *in vivo*. Los compuestos derivados Guanabenz de la invención que son inhibidor de la PPP1R15A como Guanabenz pero que de manera ventajosa no muestran ninguna actividad hacia el receptor adrenérgico alpha2A serán útiles para tratar la degeneración retinal o macular.

En la versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) es para usar en el tratamiento de las enfermedades retinales, más preferiblemente para usar en el tratamiento de enfermedades seleccionadas en el grupo de degeneración retinal heredada como ciliopatías retinales, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de prematuridad, degeneración retinal provocada por la luz, desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma en asociación con un compuesto que aumenta la expresión y/o actividad de la proteína BIP, como el ácido valproico o un derivado del mismo, tricostatina A, litio, 1-(3,4-dihidroxifenil)-2-tiocianato-etanona y exendina-4. Por tanto, la invención describe el compuesto que incluye un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un compuesto que aumente la expresión y/o actividad de la proteína BIP, preferiblemente el ácido Valproic, para usar en el tratamiento de enfermedades seleccionadas del grupo de degeneración retinal heredada como ciliopatías retinales, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinopatía de prematuridad, degeneración retinal provocada por la luz, desprendimiento de retina, retinopatía diabética y glaucoma. En la versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de enfermedades retinales, preferentemente en el tratamiento de las enfermedades seleccionadas del grupo de la degeneración retinal heredada como las ciliopatías retinales, la retinosis pigmentaria, la degeneración macular, la retinopatía de la prematuridad, la degeneración retinal provocada por la luz, el desprendimiento de retina, la retinopatía diabética y el glaucoma asociadas con vectores de terapia génica; son ejemplos no limitativos de vectores de terapia génica el lentivirus, el adenovirus y los vectores adenoasociados (AAV); estos vectores son eficaces en el suministro de genes importantes a la retina y el epitelio pigmentario retinal para la terapia génica ocular. Se prevé que en una terapia génica ocular de degeneración retinal hereditaria asociada a una acumulación de proteínas mal plegadas, la acumulación de proteínas en el retículo endoplasmático seguirá estando presente mientras que una proteína normal se exprese a partir del vector de terapia génica. Sigue habiendo la necesidad de disminuir la acumulación/carga de proteínas en la célula, preferentemente en el retículo endoplasmático con los inhibidores de la PPP1R15A. La invención también describe la composición que incluye al inhibidor de la PPP1R15A seleccionado en el grupo del compuesto de la fórmula (I) o (II), guanabenz y salubrinal o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con la terapia génica ocular.

- Enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal;

Las enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal forman un grupo de aprox. 50 trastornos metabólicos hereditarios raros que resultan de fallos en la función lisosomal. La disfunción lisosomal suele ser una consecuencia de la deficiencia de una única enzima necesaria para el metabolismo de lípidos, glicoproteínas o los llamados mucopolisacáridos. Son ejemplos de enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal que se pueden tratar con los inhibidores de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) aquí descritos, entre otros, la deficiencia del activador/gangliosidosis GM2, la alfa-manosidosis, la aspartilglucosaminuria, la Enfermedad por almacenamiento de ésteres del colesterol, la cistinosis, la enfermedad de Danon, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Farber, la enfermedad de Niemann-Pick, la fucosidosis, la galactosialidosis, la enfermedad de Gaucher (tipos I, II, III), la gangliosidosis GM1 (infantil, infantil tardía/juvenil, adulto/crónica), la enfermedad de células I/ mucopolipidosis, la enfermedad por depósito de ácido siálico libre infantil/ISSD, la deficiencia de hexosaminidasa A juvenil, la enfermedad de Krabbe (aparición temprana o tardía), la deficiencia de lipasa ácida lisosomal (aparición temprana o tardía), la

leucodistrofia metacromática, los trastornos de las mucopolisacaridosis (como la polidistrofia de pseudo-Hurler/mucopolisacaridosis IIIA, la mucopolisacaridosis I (MPS I) síndrome de Hurler, síndrome de Scheie MPS I, síndrome de Hurler-Scheie MPS I, síndrome de Hunter MPS II, síndrome de Sanfilippo tipo A (MPS IIIA), síndrome de Sanfilippo tipo B (MPS IIIB), síndrome de Sanfilippo tipo C (MPS IIIC), síndrome de Sanfilippo tipo D (MPS IIID), Morquio tipo A/MPS IVA, Morquio tipo B/MPS IVB, deficiencia de hialuronidasa MPS IX, Maroteaux-Lamy MPS VI, síndrome de Sly MPS VII, mucopolisacaridosis I/sialidosis, mucopolisacaridosis IIIC, mucopolisacaridosis tipo IV (deficiencia múltiple de sulfatasa), enfermedad de Niemann-Pick (tipos A, B, C), enfermedad CLN6 (infantil tardía atípica, variante de aparición tardía, juvenil temprana), enfermedad de Batten-Spielmeyer-Vogt/Juvenile NCL/CLN3, enfermedad CLN5 infantil tardía variante finlandesa, enfermedad de Jansky-Bielschowsky/enfermedad CLN2/TPP1 infantil tardía, enfermedad de Kufs/NCL/CLN4 de aparición en edad adulta, epilepsia del Norte/CLN8 variante infantil tardía, enfermedad de Santavuori-Haltia/CLN1 infantil/PPT, beta-manosidosis, enfermedad de Pompe/enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, picnodisostosis, enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2 (aparición en la edad adulta, aparición infantil, aparición juvenil), enfermedad de Schindler, enfermedad de Sall/ enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, Tay-Sachs/gangliosidosis de GM2 y enfermedad de Wolman. De acuerdo con la versión preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o a un sal farmacéuticamente aceptable del mismo para usar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal derivadas de la deficiencia de, por lo menos, una única enzima necesaria para el metabolismo de lípidos, glicoproteínas o los llamados mucopolisacáridos y donde este enzima se pliega mal en el retículo endoplasmático (ER). De acuerdo con la versión preferente, la enfermedad de almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher.

- Enfermedades de amiloidosis:

La amiloidosis es un término específico que se refiere a distintas enfermedades llamadas por el mismo nombre. Las amiloidosis son proteínas cuya estructura secundaria cambia haciendo que las proteínas se plieguen de una forma característica, la hoja plegada β . Cuando las proteínas normalmente solubles se pliegan para convertirse en amiloides, se vuelven insolubles, depositándose y acumulándose en órganos o tejidos y perturbando su función normal. Los distintos tipos de amiloidosis tienen señales y síntomas diferentes dependiendo dónde y en qué órganos se concentran las proteínas amiloides. Son ejemplos de amiloidosis, entre otros, la amiloidosis AL, AH, ALH (amiloides de cadena ligera, cadena pesada, anticuerpos de cadena pesada y ligera, respectivamente), amiloidosis AA (amiloides derivadas de la proteína A sérica), amiloidosis ATTR (amiloides derivadas de transtiretina), amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar 1, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis relacionada con la hemodiálisis, polineuropatía amiloide familiar III, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, amiloidosis atrial, amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria, amiloidosis localizada por inyección y amiloidosis renal hereditaria y enfermedad de Alzheimer, entre otras.

De acuerdo con otra versión preferente, el amiloide es amiloide beta ($A\beta$ o Abeta) y la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo con otra versión preferente, el amiloide es HLA-B27 (Colbert et al. 2009 Prion Vol.3 (1) pp15-16) y la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de las espondiloartropatías, preferentemente las espondilitis anquilosante.

- Cánceres

Las células cancerígenas tienen elevada exigencia metabólica y su proliferación depende de la eficacia de la síntesis de proteínas. El inicio de la traducción desempeña un papel crucial en el control de la homeostasis proteica, la diferenciación, la proliferación y la transformación maligna. El aumento del inicio de la traducción contribuye al inicio del cáncer e, inversamente, reducir el inicio de la traducción puede reducir el desarrollo del tumor (Donze *et al.*, 1995, EMBO J, 14, 3828-34; Pervin et al., 2008, Cancer Res, 68, 4862-74; Chen et al., 2011, Nat Chem Biol, 7, 610-6). Sin deseos de que la teoría se imponga, se cree que la inhibición de la PPP1R15A podría reducir selectivamente la traducción en las células tumorales, reduciendo así el desarrollo del tumor. Son ejemplos de tipos de cáncer que pueden tratarse a través de inhibidores de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) aquí descritas, entre otros, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia. Son ejemplos más particulares de dichos cánceres el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, neuroblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de pecho, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, osteosarcoma, cáncer de estómago, melanoma, mieloma múltiple, carcinoma medular de tiroides y cabeza y cáncer de cuello.

- Inflamación

La PPP1R15A representa un objetivo prometedor para el control de la inflamación ya que bloquea la liberación de citocinas inflamatorias y otros mediadores moleculares segregados dando lugar a condiciones patológicas. Son

ejemplos de enfermedades o trastornos con inflamación asociada que pueden tratarse con los inhibidores de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) aquí descritos, entre otros, los trastornos inflamatorios de pulmón infecciosos o no infecciosos (es decir, la sepsis, las infecciones pulmonares, el síndrome de dificultad respiratoria, la displasia broncopulmonar, etc.); los trastornos inflamatorios infecciosos o no infecciosos en otros órganos como la colitis, la colitis ulcerosa, la enfermedad inflamatoria intestinal, la nefropatía diabética, el infarto hemorrágico, las espondiloartropatías, la pancreatitis; el cáncer inducido por la inflamación (es decir, la progresión del cáncer en pacientes con colitis o una enfermedad inflamatoria intestinal); y similares. Son ejemplos de dichos trastornos inflamatorios patogénicos las enfermedades autoinmunes, las enfermedades hereditarias, enfermedades crónicas e enfermedades infecciosas tales como la alergia, el asma, la hipercitoquinemia, incluida la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés), el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés), la sepsis, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, por sus siglas en inglés) (ver WO2011/061340). Preferiblemente, la enfermedad infecciosa se selecciona de la infección por el virus de la gripe, la infección por el virus de la viruela, la infección por el virus del herpes, el síndrome respiratorio agudo grave (SARS, por sus siglas en inglés), la infección por el virus chikunguña, la infección por el virus del Nilo Occidental, la infección por el virus del dengue, la infección por el virus de la encefalitis japonesa, la infección por el virus de la fiebre amarilla y la infección por el virus de la hepatitis C.

Preferiblemente, la enfermedad autoinmune se selecciona del síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico, la psoriasis, la dermatitis herpetiforme, el vitíligo, la micosis fungoide, la dermatitis alérgica de contacto, la dermatitis atópica, el liquen plano, la pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda (PLEVA, por sus siglas en inglés), la artritis, el síndrome antifosfolípido catastrófico.

De acuerdo con otra realización preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de trastornos de una enfermedad seleccionada entre el grupo de la colitis, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, pancreatitis, sepsis. De acuerdo con otra realización preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de da pancreatitis. De acuerdo con otra realización preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de da sepsis.

De acuerdo con otra realización preferente, la invención describe un inhibidor de la PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso en el tratamiento de espondiloartropatías, preferencialmente la espondilitis anquilosante.

- Trastornos metabólicos y/o cardiovasculares, tales como la adiposidad, la hiperlipidemia, hipercolesterolemia familiar, la obesidad, la aterosclerosis, la hipertensión, las enfermedades del corazón, la isquemia cardíaca, la apoplejía, el infarto de miocardio, la constricción transaórtica y la diabetes y los trastornos relacionados incluyen la hiperglicemia, la intolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia (prediabetes), la hipersensibilidad a la insulina de tipo I y la diabetes de tipo II, la diabetes, la resistencia a la insulina y el síndrome de Wolcott-Rallison, entre otros.

En una realización preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de la prediabetes o la diabetes, preferiblemente la prediabetes de tipo 2 o la diabetes de tipo 2. En otra versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) se utiliza para tratar una enfermedad seleccionada en el grupo de hiperglucemia, con intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia (prediabetes), hipersensibilidad a la insulina de tipo I y II, resistencia a la insulina y síndrome de Wolcott-Rallison. Por supuesto, las células β del páncreas que segregan insulina tienen una carga biosintética pesada y estrechamente regulada que consiste en la segregación de insulina. Por tanto, estas células tienen una importante necesidad de mantener la homeostasis del retículo endoplasmático (Back and Kaufman, 2012, Annu Rev Biochem, 81, 767-93). La diabetes de tipo 2 se manifiesta mediante un aumento de los niveles de glucosa en la sangre debido a una resistencia a la insulina en la adiposa, el músculo y el hígado y/o a un fallo en la secreción de insulina de las células β del páncreas. Como respuesta, se optimiza la masa de las células β y su función. Por último, la carga de las células β es demasiado elevada, dando lugar a su declive progresivo y posterior muerte. Existen cada vez más pruebas de que la muerte de las células β se debe al estrés en el retículo endoplasmático (Back and Kaufman, 2012, Annu Rev Biochem, 81, 767-93). Es importante el hecho de que la delección de CHOP mejora la función de las células β en diversos modelos de diabetes (Song *et al.*, 2008, J Clin Invest, 118, 3378-89). Sin deseos de que la teoría se imponga, se cree que los inhibidores de PPP1R15A-PP1 mejorarán la función de las células β en la diabetes de tipo 2 debido a que la inhibición de PPP1R15A-PP1 reduce los niveles de la proteína proapoptótica CHOP durante el estrés del retículo endoplasmático (Tsaytler *et al.*, 2011, Science).

En otra versión, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada en el grupo de hipertensión, enfermedades del corazón, isquemia cardíaca, apoplejía, infarto de miocardio, constricción transaórtica o accidente vascular. En otra versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de la isquemia cardíaca. En otra versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para usar en el tratamiento de la arteriosclerosis.

- Osteoporosis:

Yokota *et al.* (BMC Musculoskeletal disorders 2013, 14, 197) and He *et al.* (Cellular Signaling 2013, 25 552-560) demostró que el Salubrinal (Boyce *et al.* 2005) bloquea eficientemente la osteoporosis en el modelo de ratones y estimula la formación ósea. Sin embargo, el Salubrinal es tóxico y no puede utilizarse para tratar pacientes humanos. En cambio, se prevé que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) son seguros y podrían ser útiles para el tratamiento de la osteoporosis. El compuesto de la fórmula (I) o (II) es para utilizar en el tratamiento de la osteoporosis.

- Traumatismo en el sistema nervioso central

Ohri *et al.* (Neurobiology of disease, 2013 Vol. 58 pp29-37) demostró que el Salubrinal mejoraba significativamente la locomoción de las extremidades inferiores que se corresponde con una mejora del ahorro de materia blanca y una disminución de la apoptosis de los oligodendrocitos, mejorando así la recuperación funcional después de una lesión de la médula espinal. Por tanto, se prevé que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) de la invención son seguros y podrían ser útiles para reducir la pérdida de oligodendrocitos después de una lesión traumática de la médula espinal y para el tratamiento de una lesión de la médula espinal. En una versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la lesión de la médula espinal.

- Isquemia, isquemia cerebral, apnea del sueño

La presente invención ofrece métodos de uso de los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) de la invención para prevenir y/o tratar el daño tisular resultante del daño celular o la muerte debido a la necrosis o la apoptosis. Son ejemplos del daño tisular neuronal la lesión de isquemia y reperfusión, como un accidente cerebral isquémico y un traumatismo craneal. En una versión preferente, el compuesto de la fórmula (I) o (II) es para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la isquemia cerebral, como el accidente cerebral isquémico y el traumatismo craneal.

- Envejecimiento

El envejecimiento está asociado con la degeneración de las células, los tejidos y los órganos, dando lugar a enfermedades como el cáncer, la insuficiencia cardiovascular, la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2, hígado adiposo no debido al alcohol y enfermedades neurodegenerativas, así como el declive de la mayoría de las medidas de rendimiento psicológico.

En biología, la senescencia es el estado o proceso de envejecimiento. La senescencia celular es un fenómeno en el que células aisladas demuestran una habilidad limitada para dividirse en cultivos (el límite de Hayflick, descubierto por Leonard Hayflick en 1961), mientras que la senescencia orgánica es el envejecimiento de los organismos. La senescencia orgánica se caracteriza por el declive de la habilidad para responder al estrés, el aumento del desequilibrio homeostático y el aumento del riesgo de enfermedad; en particular, la UPR se deteriora con la edad (Naidoo *et al.*, 2008, J Neurosci, 28, 6539-48). Así, prolongando el efecto beneficioso de la UPR inhibiendo la fosfatasa eIF2 α podría mitigar los trastornos relacionados con la edad. Por tanto, se prevé que los inhibidores de PPP1R15A de la fórmula (I) o (II) de la invención son seguros y podrían ser útiles para prevenir y/o tratar enfermedades o trastornos relacionados con el periodo de vida o la capacidad de proliferación de las células, y las enfermedades o las condiciones de la enfermedad inducidas o exacerbadas por la senescencia celular en un animal, más específicamente, los humanos.

De acuerdo con una versión, la presente invención también está relacionado con compuestos de la fórmula (I) o (II) para utilizar en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado en el grupo de tauopatías elegido de la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la degeneración lobar frontotemporal o la demencia frontotemporal (FTD) (la enfermedad de Pick); sinucleinopatías elegidas de la enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, fallo autonómico puro y atrofia sistémica múltiple; las enfermedades relacionadas con la poliglutamina y la polialanina elegidas de la enfermedad de Huntington, la atrofia muscular espinobulbar (o la enfermedad de Kennedy), la atrofia dentatorubropálidoluisiana, la degeneración espinocerebelosa de tipo 1, la degeneración espinocerebelosa de tipo 2, la degeneración espinocerebelosa de tipo 3 (o enfermedad de Machado-Joseph), la degeneración espinocerebelosa de tipo 6, la degeneración espinocerebelosa de tipo 7 y la degeneración espinocerebelosa de tipo 17, la distrofia muscular oculofaríngea; los trastornos desmielinizantes como las leucodistrofias, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y la esclerosis múltiple, la fibrosis quística, las seipinopatías, los trastornos en el almacenamiento lisosomal, las amiloidosis, la inflamación, los trastornos metabólicos y los trastornos cardiovasculares elegidos de la adiposidad, la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia familiar, la obesidad, la aterosclerosis, la hipertensión, las enfermedades del corazón, la isquemia cardiaca, la apoplejía, el infarto de miocardio, la constricción transaórtica, el accidente vascular; la osteoporosis, el traumatismo en el sistema nervioso, la isquemia, la osteoporosis, las enfermedades retinales como la retinosis pigmentaria, las ciliopatías retinales, el glaucoma, la degeneración macular y el envejecimiento.

De acuerdo con una versión, el trastorno se selecciona más concretamente de la esclerosis múltiple; una leucodistrofia, preferiblemente la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher; un trastorno desmielinizante como Charcot-Marie-Tooth, preferiblemente CMT-1A; un trastorno cardiovascular como la hipertensión, las enfermedades del corazón, la isquemia cardiaca, la apoplejía, el infarto de miocardio, la constricción transaórtica; colitis, colitis ulcerosa, enfermedad intestinal

inflamatoria, pancreatitis, sepsis; una amiloidosis como el Alzheimer y la espondilitis anquilosante; prediabetes y diabetes, como la diabetes de tipo -2.

5 De acuerdo con otra versión, La presente invención también está relacionado con un compuesto de la fórmula (I) o (II) en colaboración con un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BIP, para usar en el tratamiento de enfermedades retinales seleccionadas en el grupo de degeneración retinal heredada como la ciliopatías retinales, la retinosis pigmentaria, la degeneración macular, retinopatía de la prematuridad, degeneración retinal provocada por la luz, el desprendimiento de retina, la retinopatía diabética y el glaucoma.

10 **COMPUESTOS FARMACÉUTICOS**

Para utilizar de acuerdo con La presente invención, los compuestos o sales fisiológicamente aceptables, ésteres u otros derivados fisiológicamente funcionales descritos aquí pueden presentarse como una formulación farmacéutica, incluidos los compuestos o sales fisiológicamente aceptables, ésteres u otros derivados fisiológicamente funcionales, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, por tanto, y de manera opcional, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. El (los) portador(es) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la fórmula y no nocivos para el recipiente de los mismos. Los compuestos farmacéuticos pueden ser para uso humano o animal en la medicina humana o veterinaria. Pueden encontrarse ejemplos de dichos excipientes adecuados para las distintas formas de compuestos farmacéuticos descritos aquí en "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller.

Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Ejemplos de portadores adecuados son, entre otros, la lactosa, el almidón, la glucosa, la metilcelulosa, el estearato de magnesio, el manitol, el sorbitol y similares. Ejemplos de diluyentes adecuados son, entre otros, el etanol, el glicerol y el agua. El portador farmacéutico, excipiente o diluyente, puede seleccionarse en relación con la vía de administración prevista y las prácticas farmacéuticas estándar. Los compuestos farmacéuticos pueden incluir como, o además de, el portador, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante, tamponador, agente aromatizante, agente tensioactivo, aglutinante, conservante (incluidos los antioxidantes) y similares que sean adecuado, así como sustancias incluidas para hacer que la fórmula sea isotónica con la sangre del recipiente previsto.

Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen el almidón, la gelatina, los azúcares naturales, tales como la glucosa, la lactosa anhidra, la lactosa de flujo libre, la beta-lactosa, los edulcorantes de maíz, las gomas naturales y sintéticas, como la arábica, el tragacanto o el alginato de sodio, la carboximetilcelulosa y el polietilenglicol.

Ejemplos de lubricantes adecuados son el oleato de sodio, el estearato de sodio, el estearato de magnesio, el benzoato de sodio, el acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

40 En el compuesto farmacéutico pueden suministrarse conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agente aromatizantes. Ejemplos de conservantes son el benzoato de sodio, el ácido sórbico y los ésteres de p--hidroxibenzoico. También pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las idóneas para administración oral, tópica (incluida la administración dérmica, bucal, ocular y sublingual), rectal o parenteral (incluida la administración subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), nasal, intraocular y pulmonar, p. ej., mediante la inhalación. La formulación puede, cuando proceda, presentarse cómodamente en discretas dosis unitarias y puede prepararse siguiendo cualquier otro de los métodos conocidos en las prácticas farmacéuticas habituales. Todos los métodos incluyen el paso de asociar un compuesto activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si fuera necesario, dar forma al producto según la fórmula deseada.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral donde el portador es un sólido se presentan preferiblemente como formulaciones en dosis unitarias tales como bolos, cápsulas o comprimidos que contienen cada uno una cantidad determinada del compuesto activo. Un comprimido puede hacerse por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Las grageas comprimidas pueden prepararse por compresión en una máquina adecuada, un compuesto activo en forma no aglomerada como polvo o gránulos mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, agente lubricante, agente tensoactivo o agente de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando un compuesto activo con un diluyente líquido inerte. Las grageas pueden recubrirse (opcional) y, si no se cubren, puede hacerse una incisión sobre las mismas (opcional). Las cápsulas pueden prepararse llenando las cápsulas vacías con un compuesto activo, solo o mezclado con uno o más ingredientes secundarios, y luego sellándolas de la forma habitual. Las obleas son are parecidas a las cápsulas en las que un compuesto activo junto con cualquier ingrediente secundario se sella en una envoltura de papel de arroz. Un compuesto activo también puede formularse como gránulos dispersables, que pueden por ejemplo suspenderse en agua antes de la administración, o espolvorearse sobre la comida. Los gránulos pueden envasarse por ejemplo en un sobrecito. Las formulaciones aptas para la administración oral en las que el portador es un líquido

pueden presentarse como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua.

5 Las formulaciones para la administración oral incluyen formas de dosificación de liberación controlada, p. ej., los comprimidos en los que un compuesto activo se formula en una liberación adecuada —matriz controladora—, o están recubiertos con una liberación adecuada —película controladora. Dichas formulaciones pueden ser particularmente idóneas para el uso profiláctico.

10 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en las que el portador es un sólido se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitarias. Los portadores adecuados incluyen la manteca de cacao y otros materiales que se utilizan habitualmente en las prácticas farmacéuticas. Los supositorios pueden formarse cómodamente mezclando un compuesto activo con el portador ablandado o derretido, y enfriándola después y dándole forma en los moldes.

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

20 Las formulaciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración oftalmológica, en particular para la intraocular, ocular tópica o periocular, más preferiblemente para la administración tópica ocular o periocular.

25 Los preparados inyectables pueden adaptarse como inyección de bolos o infusión continua. Dichos preparados se presentan cómodamente en dosis unitarias o contenedores multidosis que se sellan tras haber introducido la formulación hasta que sea necesario usarlos. Como alternativa, un compuesto activo puede tener forma de polvo, lo que se constituye con un vehículo adecuado, como el agua estéril, agua sin pirógeno, antes de usarlo.

30 Un compuesto activo también puede formularse como un preparado de depósito de acción prolongada, que puede administrarse por inyección intramuscular o implantación, p. ej., subcutánea o intramuscular. Los preparados de depósito incluyen, p. ej., materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados o resinas de intercambio iónicos. Dichas formulaciones de acción prolongada son particularmente cómodas para uso profiláctico.

35 Las formulaciones adecuadas para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal se presentan de forma que las partículas que contienen un compuesto activo y con un diámetro preferible de entre 0,5 y 7 micrones se emiten en el árbol bronquial del receptor. Como posibilidad, dichas formulaciones están en forma de polvo finamente triturado que puede presentarse cómodamente en una cápsula puncionable de, por ejemplo, gelatina, para usar en un dispositivo de inhalación, o, como alternativa, como una formulación autoimpulsada que contiene un compuesto activo, un cómodo propulsor de líquido o gas y, opcionalmente, otros ingredientes tales como un surfactante y/o un diluyente sólido. Los propulsores líquidos incluyen propano y los clorofluorocarbonos, y los propulsores de gas adecuados incluyen dióxido de carbono. Las formulaciones autoimpulsadas también pueden emplearse cuando un compuesto activo se dispense en forma de gotas de una solución o suspensión.

40 Dichas formulaciones autoimpulsadas son similares a las ya conocidas en las prácticas habituales y pueden prepararse siguiendo procedimientos ya establecidos. Convenientemente, se presentan en un contenedor que incluye una válvula manual o automática con las características de pulverización deseadas; resulta ventajoso que la válvula es de las de medición, liberando un volumen fijo de, por ejemplo, 25 a 100 microlitros, en cada operación de la misma.

45 Además existe la posibilidad de que un compuesto activo pueda estar en forma de solución o suspensión para usar en un atomizador o nebulizador donde se emplea una corriente de aire acelerado o una agitación ultrasónica para producir una fina bruma para inhalar.

50 Las formulaciones adecuadas para la administración nasal incluyen preparados generalmente similares a los descritos anteriormente para la administración pulmonar. Al dispensarse, dichas formulaciones deberían preferiblemente tener un diámetro de partículas de entre 10 y 200 micrones para permitir la retención en la cavidad nasal; esto puede lograrse usando debidamente un polvo de partículas de un tamaño adecuado o eligiendo la válvula apropiada. Otras formulaciones adecuadas incluyen polvos gruesos con partículas con un diámetro de entre 20 y 500 micrones, para administrar por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un contenedor colocado cerca de la nariz, y gotas nasales que incluyen entre 0,2 y el 5 % de peso/volumen de un compuesto activo en una suspensión o solución acuosa u oleosa.

60 Los que conocen bien las prácticas farmacéuticas saben cuáles son los portadores farmacéuticamente aceptables, lo cuales incluyen, entre otros, 0,1 M y preferiblemente 0,05 M de tampón fosfato o 0,8% de suero. Además, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser emulsiones, suspensiones y soluciones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, los aceites vegetales tales como el aceite de oliva y los ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato etílico. Los portadores acuosos incluyen el agua, as soluciones alcohólicas y acuosas, las emulsiones o suspensiones, incluido el suero y los medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen la solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa aceites de lactato fijos o

65

de Ringer. Los conservantes y otros aditivos también pueden presentarse, por ejemplo como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

5 Las formulaciones adecuadas para la formulación tópica pueden suministrarse, por ejemplo, como geles, cremas o pomadas. Dichos preparados pueden aplicarse p. ej. A una herida o úlcera extendiéndolos directamente sobre la superficie de la herida o úlcera o sobre un soporte adecuado como una venda, gasa, malla o similar que pueda aplicarse sobre el área que hay que tratar.

10 También pueden suministrarse formulaciones líquidas y en polvo para pulverizar o rociar directamente sobre la zona que hay que tratar, p. ej., una herida o úlcera. Como alternativa, se puede pulverizar o rociar con la formulación un portador tal como una venda, gasa, malla o similar y luego aplicarse sobre la zona que hay que tratar.

15 Según otro aspecto de la invención, se indica un proceso para preparar el compuesto farmacéutico o veterinario como se ha descrito anteriormente, el proceso que incluye asociar el (los) compuesto(s) activo(s) con el portador, por ejemplo haciendo una mezcla.

20 En general, las formulaciones se preparan asociando muy bien y de manera uniforme el agente activo con portadores líquidos o portadores sólidos divididos finamente, o ambos, y luego, si fuera necesario, dando forma al producto. La invención se extiende a métodos para preparar un compuesto farmacéutico que incluye unir un compuesto de la fórmula general (I) en conjunto o asociación con un portador o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

SALES

25 Los compuestos de la invención pueden estar presentes como sales, en particular sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario.

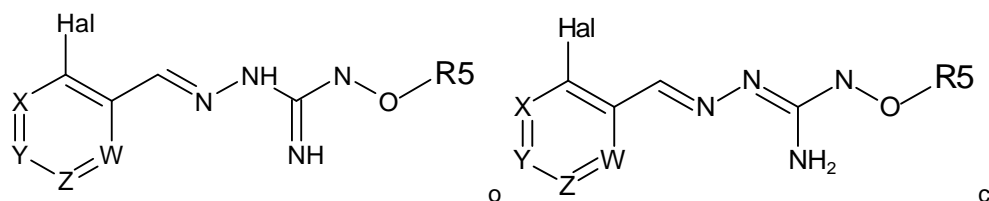
30 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención incluyen la adición adecuada de ácidos o las sales de base de los mismos. Puede encontrar una revisión de las sales farmacéuticas adecuadas en Berge *et al*, J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo, los ácidos hidrogenados tales como el clorhidrato, el bromhidrato y el hidroyoduro, el ácido sulfúrico, el sulfato de ácido fosfórico, el bisulfato, el hemisulfato, el tiocianato, el persulfato y los ácidos sulfónicos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como los ácidos alcanecarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que son sustituidos o no sustituidos (p. ej., por halógeno), como el ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o 35 insaturados, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxycarboxílicos, por ejemplo, ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, como los ácidos (C₁-C₄)-alquil- o aril sulfónicos que son sustituidos o no sustituidos (por ejemplo, por un halógeno) como el ácido metanosulfónico o el p-toluenosulfónico. Las sales que no son aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario pueden no obstante ser valiosas como intermediarios.

40 Las sales preferidas incluyen, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, lactato, gluconato, citrato, tartrato, maleato, malato, pantotenato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, digluconato, ciclopentanato, glucoheptonato, glicerofosfato, oxalato, heptanoato, hexanoato, fumarato, nicotinato, palmoato, pectinato, 3-fenilpropionato, picrato, 45 pivalato, propionato, tartrato, lactobionato, pivolato, alcanforato, undecanoato and succinato, ácidos sulfónicos orgánicos tales como metansulfonato, etansulfonato, sulfonato de 2-hidroxietano, alcanforsulfonato, 2-naftalensulfonato, bencenosulfonato, p-clorobencensulfonato y p-toluenosulfonato; y ácidos inorgánicos tales como el clorhidrato, bromhidrato, hidroyoduro, sulfato, bisulfato, hemisulfato, tiocianato, persulfato y los ácidos fosfórico y sulfónico. De acuerdo con una versión preferente la sal es acetato.

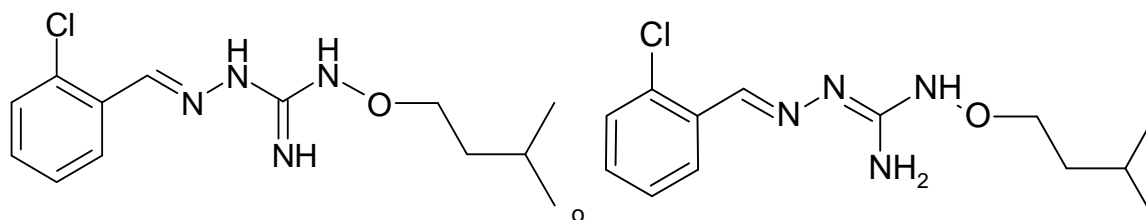
ENANTIÓMEROS/AUTÓMEROS

50 En todos los aspectos de la presente invención antes discutidos, la invención incluye, cuando proceda, todos los enantiómeros, diastereoisómeros y tautómeros de los compuestos de la invención. La persona con las competencias de las prácticas farmacéuticas reconocerá los compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quiral) y/o características tautoméricas. Los enantiómeros correspondientes y/o tautómeros pueden aislarse/prepararse con métodos conocidos en las prácticas farmacéuticas. Los enantiómeros se caracterizan por la configuración absoluta de los centros quirales y se describen mediante las normas de secuenciación R- y S-de Cahn, Ingold y Prelog. Dichos convenios son muy conocidos en las prácticas mencionadas (p. ej., véase 'Advanced Organic Chemistry', 3rd edition, ed. March, J., John Wiley and Sons, New York, 1985).

60 Por tanto, los compuestos de la fórmula (I) o (II) también incluyen las formas tautoméricas de la fórmula:



Como ejemplo ilustrativo, una forma tautomérica del compuesto 2 es:

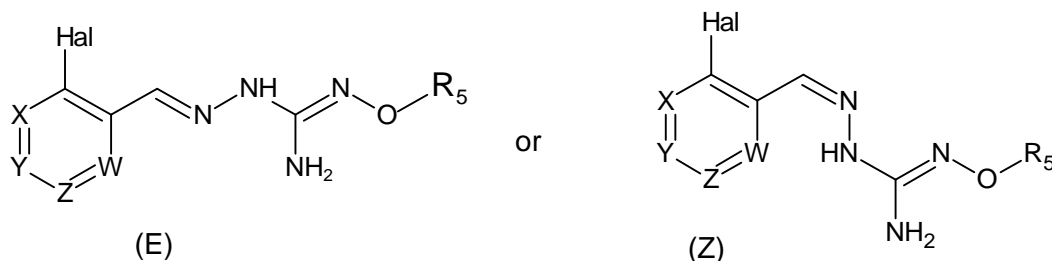


Los compuestos de la invención que contengan un centro quiral pueden utilizarse como mezcla racémica, una mezcla enantioméricamente enriquecida, o la mezcla racémica pueden separarse con técnicas conocidas y un enantiómero puede utilizarse individualmente.

ESTEREOISÓMEROS E ISÓMEROS GEOMÉTRICOS

Algunos de los compuestos de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, p. ej., pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o centros geométricos y por tanto pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o formas geométricas como isómeros E/Z (Entgegen/Zusammen). La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales y de dichos agentes inhibidores, y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas retengan la actividad funcional adecuada (no necesariamente al mismo nivel).

Por tanto, los compuestos de la fórmula (I) o (II) también incluyen las formas de isómeros E y/o Z de la fórmula:



La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se define como aquella en la que al menos un átomo se sustituye por un átomo con el mismo número atómico pero con una masa atómica distinta de la masa atómica que suele encontrarse en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en el agente y son sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen los isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, sulfuro, fluorina y cloro como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radioactivo como el ^3H o ^{14}C , son útiles en los estudios de distribución del tejido del sustrato y/o el fármaco. Los isótopos tritiados, p. ej., ^3H , y carbón-14, p. ej., ^{14}C , son especialmente preferibles por lo fáciles que son de preparar y detectar. Además, la sustitución con isótopos tales como el deuterio, p. ej., ^2H , pueden permitir ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, el aumento de la vida media *in vivo* o la reducción de los requisitos de dosificación y, por tanto, ser preferibles en algunas circunstancias. Por ejemplo, la invención incluye compuestos de la fórmula general (I) donde cualquier átomo de hidrógeno ha sido sustituido por un átomo de deuterio. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas de esta invención pueden prepararse por lo general siguiendo procedimientos convencionales utilizando las variaciones isotópicas adecuadas de reactivos adecuados.

PROFÁRMACOS

Como se ha mostrado aquí, los compuestos pueden tener forma de profármaco, p. ej., compuestos de enlace covalente que liberan el fármaco original activo de acuerdo con la fórmula general (I) *in vivo*. Dichos profármacos suelen ser compuestos en los que se han modificado uno o más grupos de tal forma que dicha modificación puede haber revertido tras la administración a un sujeto humano o mamífero. La reversión suele realizarla una enzima presente de forma natural en dicho sujeto, aunque es posible administrar un segundo agente junto con dicho profármaco con el fin de que tenga lugar la reversión *in vivo*. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen el éster (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente), donde la reversión puede ser realizada por una esterasa, etc. Las personas con competencias farmacéuticas conocerán otros sistemas de este tipo.

10 SOLVATOS

La presente invención también incluye formas de solvato de los compuestos de la presente invención. Los términos utilizados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

15 POLIMORFOS

La invención describe además los compuestos de la presente invención en sus distintas formas cristalinas, polimórficas, anhidras e hidratadas. En la industria farmacéutica es bien sabido que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de esas formas variando ligeramente el método de purificación y/o forma de aislamiento de los solventes utilizados en el preparado sintético de dichos compuestos.

ADMINISTRACIÓN

Los compuestos farmacéuticos de la presente invención pueden adaptarse para la administración por vía rectal, nasal, intrabronquial, tópica (incluida la bucal, sublingual y oftálmica, en particular para administración intraocular, in, intravítrea, ocular tópica o periocular), vaginal o parenteral (incluida la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial e intradérmica), intraperitoneal o intratecal. Preferiblemente, la formulación es para administrar por vía oral. Las formulaciones pueden presentarse cómodamente en dosis unitarias, p. ej., en forma de porciones discretas que contengan una dosis unitaria, o en una subunidad o unidad múltiple de una dosis unitaria. Como ejemplo, las formulaciones pueden ser en forma de comprimidos y cápsulas de liberación sostenida, y pueden prepararse siguiendo cualquier método conocido en las prácticas farmacéuticas habituales.

Las formulaciones para la administración oral de la presente invención pueden presentarse como: unidades discretas como cápsulas, gotas, obleas, píldoras o comprimidos que contienen cada uno una cantidad determinada de agente activo; en polvo o gránulos; como solución, emulsión o suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o en una emulsión líquida de agua en aceite; o como un bolo, etc. Preferiblemente, estos compuestos contienen de 1 a 250 mg y más preferiblemente de 10 a 100 mg, e incluso más preferiblemente de 1 100 mg, de ingrediente activo por dosis.

En el caso de los compuestos para administración oral (p. ej., los comprimidos y las cápsulas), el término "portador aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, p. ej., agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; material de relleno and portadores, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, cloruro sódico y ácido algínico; y lubricantes tales como el estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, ceras de talco, aceites y sílice coloidal. También puede utilizarse agentes aromatizantes tales como la menta, el aceite de gaulteria, aromatizante de cereza y similares. Podría ser deseable añadir un agente colorante para facilitar la identificación inmediata de la dosis. Los comprimidos también pueden recubrirse con métodos conocidos en la industria farmacéutica.

Un comprimido puede hacerse por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes secundarios. Las grageas comprimidas pueden prepararse comprimiendo en la máquina adecuada el agente activo en forma no aglomerada como polvo o gránulos mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensoactivo o agente de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Las grageas pueden recubrirse (opcional), puede hacerse una incisión sobre las mismas (opcional) y pueden formularse de forma que se el agente activo se libere lentamente o de forma controlada.

Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen pastillas para chupar que incluyen el agente activo en una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que incluyen el agente activo en una base inerte como la gelatina y la glicerina, o sacarosa y goma arábica; and enjuagues bucales que incluyen el agente activo en un líquido portador adecuado.

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

- 5 Los compuestos farmacéuticos de la presente invención también pueden estar en forma de supositorio, pesario, suspensión, emulsión, loción, pomada, crema, gel, spray, solución o polvo para espolvorear.

10 Un medio alternativo de administración transdérmica es mediante el uso de un parche para la piel. Por ejemplo, el ingrediente activo puede incorporarse en una crema consistente en una emulsión acuosa de glicoles de polietileno o parafina líquida. El ingrediente activo también puede incorporarse, en una concentración de entre el 1 y el 10 % del peso, en un ungüento consistente en una base de cera o parafina suave blanca junto con los estabilizadores y conservantes necesarios mencionados.

15 DOSIFICACIÓN

Una persona con unas competencias normales en las prácticas farmacéuticas puede determinar fácilmente la dosis adecuada de uno de los compuestos instantáneos que hay que administrar a un sujeto sin una experimentación excesiva. Habitualmente, un médico determinará la dosis real más adecuada para un paciente y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso, estado general de salud, sexo, dieta, modo y hora de administración, ritmo de excreción, combinación de fármacos, gravedad de su estado en particular y terapia individual a la que se está sometiendo. Las dosis que se muestran aquí son a título de ejemplo para un caso medio. Por supuesto, puede haber casos individuales que merezcan rangos de dosis más altos o bajos, los cuales se encuentran dentro del ámbito de esta invención.

25 De acuerdo con esta invención, puede administrarse una cantidad efectiva de un compuesto de la fórmula general (I) teniendo como objetivo unas condiciones o una enfermedad particulares. Por supuesto, esta cantidad de dosis se modificará después de acuerdo con el tipo de administración del compuesto. Por ejemplo, para lograr una "cantidad efectiva" para un tratamiento agudo, es preferible la administración parenteral de un compuesto de la fórmula general (I). Una infusión intravenosa del compuesto en un 5 % de dextrosa en agua o solución salina normal, o una fórmula similar con los excipientes adecuados, es más efectiva, aunque la inyección intramuscular de un bolo también sea útil. Habitualmente, la dosis parental será de aprox. 0,01 a aprox. 100 mg/kg; preferiblemente entre 0,1 y 20 mg/kg, a fin de mantener la concentración del fármaco en el plasma a una concentración efectiva. Los compuestos pueden administrarse de una a cuatro veces al día a un nivel que alcance la dosis diaria total de aprox. 0,4 a aprox. 30 400 mg/kg/día. La cantidad exacta de un compuesto inventado que sea terapéuticamente efectivo, y la vía por la que administrar mejor dicho compuesto, puede determinarlos fácilmente una persona con competencias normales en las prácticas farmacéuticas comparando el nivel en sangre del agente a la concentración necesaria para que tenga un efecto terapéutico.

40 Los compuestos de esta invención también pueden administrarse al paciente por vía oral, de forma que la concentración del fármaco es suficiente para lograr una o más de las indicaciones terapéuticas que se muestran aquí. Habitualmente, un compuesto farmacéutico que contenga el compuesto se administra por vía oral en una dosis de entre aprox. 0,1 y aprox. 50 mg/kg en función del estado en que se encuentra el paciente. Preferiblemente, la dosis oral sería de aprox. 0,1 a aprox. 20 mg/kg.

45 No se prevé ningún efecto toxicológico inaceptable cuando los compuestos de la presente invención se administran de acuerdo con la presente invención. Los compuestos de esta invención, que pueden tener una buena biodisponibilidad, pueden ser testados en uno o varios ensayos biológicos para determinar la conce3ntración de un compuesto que necesite tener un efecto farmacológico determinado.

50 COMBINACIONES

En una versión particularmente preferente, el (los) compuesto(s) de la invención se administran en combinación con un(os) agente(s) activo(s), por ejemplo, fármacos existentes disponibles en el mercado. En tales casos, los compuestos de la invención pueden administrarse consecutivamente, simultáneamente o secuencialmente con el (los) 55 otro(s) agente(s) activo(s).

Los fármacos en general son más efectivos cuando se usan combinados. En particular, la terapia combinada es deseable para evitar un traslapo de toxicidades importantes, un mecanismo de acción y mecanismo(s) de resistencia. Además, también es deseable administrar la mayoría de los fármacos en sus dosis máximas tolerables con unos intervalos de tiempo mínimos entre las mismas. Las mayores ventajas de combinar fármacos son que puede promover los efectos aditivos o sinérgicos a través de interacciones bioquímicas y disminuir la aparición de resistencia.

Se pueden sugerir combinaciones beneficiosas estudiando la actividad inhibidora de los compuestos de prueba con los agentes que se sepa o sospeche que pueden ser valiosos para el tratamiento de una determinada enfermedad. Este procedimiento también puede utilizarse para determinar el orden de administración de los agentes, es decir, 65

antes, simultáneamente o después de la liberación. Dicho plan puede ser una característica de todos los agentes activos identificados aquí.

5 De acuerdo con la versión preferente, la invención describe un compuesto farmacéutico que incluye un inhibidor PPP1R15A de la fórmula (I) o (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un compuesto que aumente la expresión y/o la actividad de la proteína BiP y un portador farmacéuticamente aceptable del mismo y/o excipiente (véase WO2013/124484). Preferiblemente, el compuesto que aumenta la expresión y/o actividad de la proteína BiP se selecciona de entre el grupo del ácido valproico o un derivado del mismo, tricostatina A, litio, l-(3,4-dihidroxifenil)-2-tiocianato-etanona y exendina-4. De acuerdo con una versión preferente, la proteína BiP es un ácido valproico o un derivado del mismo como el ácido 2-ene-valproico.

15 De acuerdo con una versión preferente, la invención describe un compuesto farmacéutico que incluye un inhibidor PPP1R15A de la fórmula (I) o (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo del mismo, y un compuesto que aumenta la expresión y/o la actividad de la proteína BiP y un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable del mismo del mismo, para tratar un desorden asociado con la vía PPP1R15A y asociado con el estrés a causa de proteínas mal plegadas y, en particular, con la acumulación de proteínas mal plegadas. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona del grupo de la fibrosis quística, trastorno en el almacenamiento lisosomal, amiloidosis, cáncer, inflamación, trastornos metabólicos, trastornos cardiovasculares, osteoporosis, traumatismo en el sistema nervioso central, isquemia, enfermedades retinales, seipinopatías, tauopatías, sinucleinopatías, enfermedades relacionadas con la poliglutamina y la polialanina, enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Charcot Marie Tooth, las leucodistrofias y la esclerosis múltiple.

25 ENSAYO

Otro aspecto de la invención describe el uso de un compuesto descrito anteriormente en un ensayo para identificar otros compuestos candidatos capaces de inhibir el PPP1R15A-PP1. Preferiblemente, el ensayo es un ensayo de unión competitiva.

30 Más preferiblemente, el ensayo de unión competitiva incluye el contacto de un compuesto de la invención con el PPP1R15A-PP1 y un compuesto candidato y la detección de cualquier cambio en la interacción entre el compuesto de acuerdo con la invención y el PPP1R15A-PP1.

35 Preferiblemente, el compuesto candidato se genera mediante una modificación SAR convencional de un compuesto de la invención. Aquí, el término "modificación SAR convencional" se refiere a métodos estándar conocidos en las prácticas farmacéuticas habituales por variar un compuesto determinado mediante la derivatización química.

40 Por tanto, en un aspecto, el compuesto identificado puede actuar como modelo (por ejemplo, un patrón) para el desarrollo de otros compuestos. Los compuestos empleados en dicho test pueden estar libres en una solución, adheridos a un soporte sólido, llevado en la superficie de una célula o colocado intracelularmente. Se puede medir la abolición de la actividad o formación de los complejos de unión entre el compuesto y el agente que se está testando.

45 El ensayo de la presente invención puede ser un cribado, a través del cual testar un número de agentes. En un aspecto, el método de ensayo de la presente invención es un cribado de alto rendimiento.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unir un compuesto específicamente compiten con un compuesto de prueba para unirse a un compuesto.

50 Otra técnica para el cribado contempla el cribado de alta resolución (HTS) de agentes con una afinidad de unión a las sustancias adecuada y se basa en el método descrito detalladamente en WO 84/03564.

Se espera que los métodos de ensayo de la presente invención sean adecuados para los cribados a pequeña y a gran escala de los compuestos de prueba así como en los ensayos cualitativos.

55 Preferiblemente, el ensayo de enlaces competitivos incluye el contacto con un compuesto de la invención con la PPP1R15A-PP1 en presencia de un sustrato conocido como la PPP1R15A-PP1 y la detección de cualquier cambio en la interacción entre dicha PPP1R15A-PP1 y dicho sustrato conocido.

60 Otro aspecto de la invención proporciona un método para detectar el aglutinante de un ligando a la PPP1R15A-PP1; ese método incluye las etapas:

- (i) contactar con un ligando con la PPP1R15A-PP1 en presencia de un sustrato conocido
- (ii) detectar cualquier alteración en la interacción entre la PPP1R15A-PP1 y dicho sustrato conocido; y cuando ese ligando sea un compuesto de la invención.

Un factor de la invención describe un proceso que incluye las etapas:

- 5 (a) seguir un método de ensayo descrito anteriormente;
 (b) identificar uno o más ligandos capaces de aglutinarse a un dominio de aglutinación del ligando; y
 (c) preparar una cantidad de ése o más

Otro aspecto de la invención proporciona el proceso que incluye las etapas:

- (b) 10 (a) seguir un método de ensayo descrito anteriormente;
 (b) identificar uno o más ligandos capaces de aglutinarse a un dominio de aglutinación del ligando; y
 (c) preparar una composición farmacéutica que incluye dicho o más

Otro aspecto de la invención proporciona el proceso que incluye las etapas:

- (c) 15 (a) seguir un método de ensayo descrito anteriormente;
 (b) identificar uno o más ligandos capaces de aglutinarse a un dominio de aglutinación del ligando;
 (c) modificar dicho o más ligandos capaces de aglutinarse con un dominio de aglutinación del ligando;
 (d) seguir el método de ensayo descrito anteriormente;
 (e) opcionalmente, preparar una composición farmacéutica que incluya dicho o más

20 La invención también describe un ligando identificado a través del método descrito anteriormente. Otro factor de la invención describe una composición farmacéutica que incluye un ligando identificado a través del método descrito anteriormente. Otro aspecto de la invención describe el uso de un ligando identificado a través del método descrito anteriormente en la preparación de una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un trastorno relacionado con la acumulación de proteínas mal plegadas y/o desplegadas como se ha definido anteriormente.

25 Los métodos descritos pueden usarse para cribar un ligando útil como un inhibidor de la PPP1R15A-PP1.

30 Los compuestos de la fórmula general (I) son útiles como herramientas de laboratorio y como agentes terapéuticos. En el laboratorio, algunos de los compuestos de la invención son útiles para establecer si una diana conocida o recién descubierta contribuye a una función bioquímica esencial o por lo menos significativa durante el establecimiento o la evolución de un estado de enfermedad, un proceso comúnmente llamado "validación de dianas".

La presente invención se describe con más detalle en relación con las siguientes figuras:

35 **La figura 1** muestra una protección dependiente de la dosis de células Hela por el compuesto 12 de la invención del estrés en el retículo endoplasmático inducido por una exposición de 6 horas a la tunicamicina.

La figura 2 muestra la protección dependiente de la dosis de oligodendrocitos de rata lesionada por interferón gamma por el compuesto 11, el compuesto 12 y el compuesto 17 de la invención.

40 **La figura 3** muestra la protección dependiente de la dosis de neuronas de ratas mesencefálicas primarias lesionadas por rotenona por el compuesto 5, el compuesto 12 y el compuesto 17 de la invención.

45 **La figura 4** muestra la protección dependiente de la dosis de neuronas corticales primarias de rata lesionada por beta amiloide 1-42 por el compuesto 12 de la invención.

La figura 5 muestra la capacidad del compuesto 12 y el compuesto 17 a 5 microM y 10 microM respectivamente para prevenir la acumulación de proteína DM20 con mutación T181P en la célula humana 293T.

50 **La figura 6** muestra la capacidad de los compuestos 16 para prevenir la muerte celular asociada a la acumulación de insulina con tendencia al mal plegamiento en Akita expresada en células Min6.

La figura 7 muestra la capacidad del compuesto 12, el compuesto 16 y el compuesto 17 a distintas concentraciones para prevenir la muerte celular de insulinoma Min6 asociada a la acumulación de proteínas mal plegadas inducidas por una exposición de 6 horas a la tunicamicina.

55 **La figura 8** muestra la capacidad del compuesto 11, el compuesto 12, el compuesto 16 y el compuesto 17 a distintas concentraciones para prevenir la muerte celular de insulinoma INS1 asociada a la acumulación de proteínas mal plegadas inducidas por una exposición de 6 horas a la tunicamicina.

60 **La figura 9** muestra la capacidad de los compuestos 6, 10, 11, 12, 15, 16 y 17 (a 25 microM) para prevenir la producción de interferón de tipo I por fibroblastos embrionarios de ratón lipofectados con poli I:C.

La figura 10 muestra la capacidad del compuesto 10 para proteger los cardiomiocitos de rata neonatal contra la apoptosis inducida por hipoxia. El gráfico indica el porcentaje de células apoptóticas medido mediante un análisis

FACS. Los cardiomiocitos fueron expuestos a hipoxia (0,3 % O₂) durante 36 horas en ausencia (0 μM) o presencia de las concentraciones indicadas del compuesto 2 (n=3).

La presente invención se describe con más detalle en relación con los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

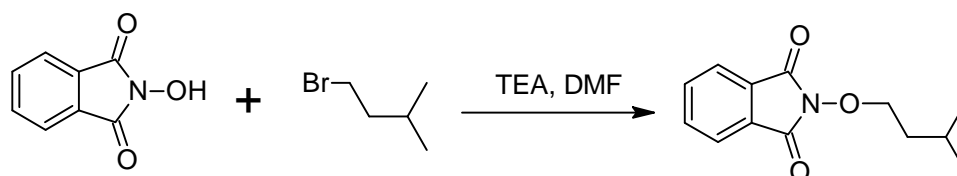
1. MÉTODOS Y MATERIALES

1.1 Preparación de los compuestos según la presente invención

Los compuestos reactivos y comerciales se adquirieron a través de Acros Organics, Sigma-Aldrich. Según la presente invención, los compuestos pueden prepararse siguiendo el procedimiento general:

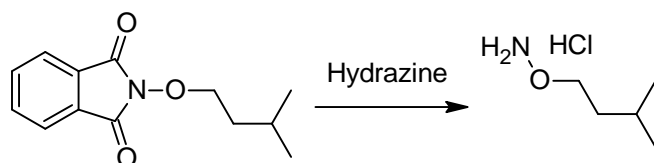
Compuestos 1 y 2: preparación de sal de formiato 2-(2-clorobencil)-N'-(3-metilbutil)hidracinacarboximidamida (compuesto 1) y 2-(2-clorobencil)-N'-(3-metilbutil)hidracinacarboximidamida (compuesto 2)

2-(3-metilbutil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (I-1)



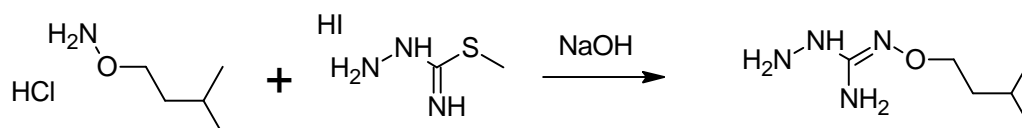
Se añadió trietilamina (49,58 g) gota a gota en una solución agitada de N-Hidroxifalimida (40 g) y 1-bromo-3-metilbutano (37,4 g) en DMF (600 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a 70 °C durante 18 horas. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido de este modo se suspendió en agua fría (1000 ml). La suspensión resultante se agitó bien durante un tiempo y el sólido se filtró bajo presión reducida. El sólido se lavó más en agua desmineralizada (200 ml) y hexano (100 ml). El sólido resultante se secó bajo presión reducida para obtener un material bruto que se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice. El producto deseado se eluyó a aprox. el 2 % de metanol en diclorometano. La evaporación de fracciones de producto puro dio 50 g de 2-(3-metilbutil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (rendimiento: 87,4 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 0,93 (d, 6H), 1,57 (q, 2H), 1,82 (m, 1H), 4,16 (t, 2H), 7,86 (s, 4H); LC-MS: m/z= 234,25 (M+H).

1-(aminooxi)-3-metilbutano clorhidrato (I-2)



Se añadió hidrato de hidracina (12,8 g) gota a gota a una solución agitada de 2-(3-metilbutil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (45 g) en metanol (600 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a la misma temperatura durante 24 horas. La mezcla de la reacción se filtró para retirar el subproducto insoluble y el filtrado resultante se concentró bajo presión reducida para obtener un material bruto que se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice. El producto deseado se eluyó a aprox. el 1 % de metanol en diclorometano. La evaporación de fracciones de producto puro dio el intermediario deseado como base libre que se convirtió como sal de clorhidrato utilizando 4M HCl en 1,4-dioxano, lo que dio 3,3 g de 1-(aminooxi)-3-metilbutano clorhidrato. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 0,89 (d, 6H), 1,46 (q, 2H), 1,65 (m, 1H), 4,01 (t, 2H), 10,84 (s, 3H).

N-(3-metilbutil)hidracinacarboximidamida (I-3)

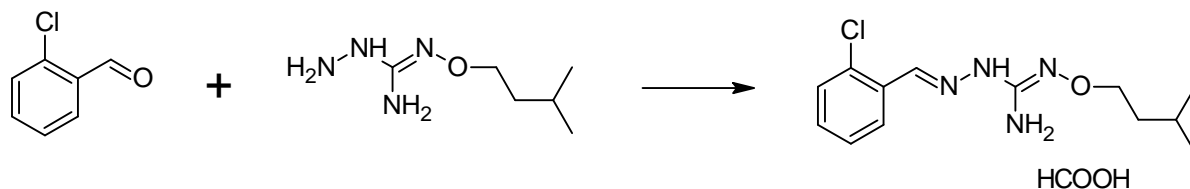


Se añadió una solución de 2N NaOH (3,6 ml) gota a gota a una solución agitada de 1-(aminooxi)-3-metilbutano clorhidrato (1,2 g) e hidroyoduro de s-metilisotiosemicarbazida (2,02 g) en agua (3,6 ml) a temperatura ambiente y se

agitó durante 48 horas. Luego, las mezclas de la reacción se concentraron bajo presión reducida y con el residuo se formó un azeótropo de metanol (5 ml). El residuo resultante se suspendió en etanol (10 ml) y las sales inorgánicas insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se usó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. *N*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida se confirmó mediante el análisis LCMS. LC-MS: $m/z=161.5$ (M+H).

5

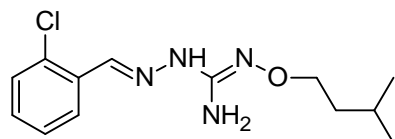
Sal de formiato de 2-(2-clorobencil)-*N'*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida (compuesto 1)



Se añadió el 2-clorobenzaldeido (1,81 g) gota a gota al filtrado que contenía la *N*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó más con Prep HPLC utilizando un 0,1 % de HCOOH/agua/MeCN, y dio 0,27 g de 2-(2-clorobencil)-*N'*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida como sal de formiato (rendimiento: 13,1 %). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 0.88 (d, 6H), 1.48 (q, 2H), 1.68 (m, 1H), 3.75 (t, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 8,10 (m, 1H), 8.14 (m, 1H), 8.25 (m, 1H), 11.80 (s broad, 2H). LC-MS: $m/z=282.88$ (M+H).

15

2-(2-clorobencil)-*N'*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida (compuesto 2)



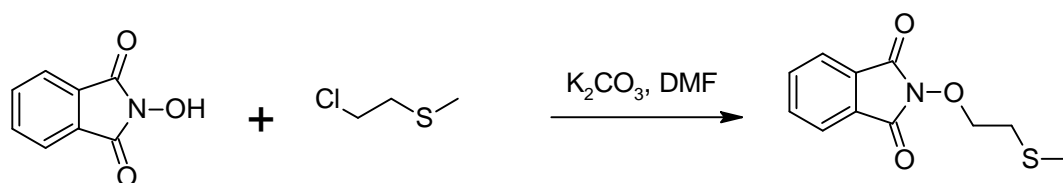
El formiato de sodio 2-(2-clorobencil)-*N'*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida (220 mg) se disolvió en agua y se basificó mediante una solución acuosa saturada de NaHCO_3 . La solución acuosa básica se extrajo con diclorometano y la capa orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio y se evaporó bajo presión reducida y dio 180 mg de 2-(2-clorobencil)-*N'*-(3-metilbutoxi)hidracinacarboximidamida como base libre (rendimiento: 95 %). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 0,89 (d, 6H), 1,49 (q, 2H), 1,69 (m, 1H), 3,75 (t, 2H), 5,73 (s broad, 2H), 7,30 (m, 2H), 7,44 (m, 1H), 8,11 (m, 1H), 8,15 (m, 1H), 10,48 (s broad, 1H). LC-MS: $m/z=282.82$ (M+H).

25

Compuesto 3: Preparación de 2-(2-clorobencilideno)-*N'*-[2-(metilsulfonil)etoxi]hidracinacarboximidamida

2-[2-(metilsulfonil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (I-4)

30

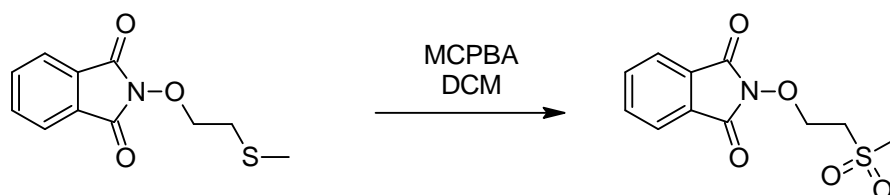


Se añadió sulfuro de 2-cloroetil metilo (10,1 g) gota a gota a una solución agitada de *N*-Hidroxifitalimida (12,5 g), potasio (2,5 g) y carbonato potásico (21,1 g) en DMF (150 ml) a temperatura ambiente y se agitó a 80°C durante 18 horas. La mezcla de la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en 500 ml de agua fría. A continuación, el sólido obtenido se filtró bajo presión reducida. El sólido resultante se secó bajo presión reducida, y dio 9,7 g de 2-[2-(metilsulfonil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (rendimiento: 52,8 %) y se utilizó para la siguiente fase sin más procesamiento. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 2,16 (s, 3H), 2,84 (t, 2H), 4,29 (t, 2H), 7,87 (s, 4H). LC-MS: $m/z=238.4$ (M+H).

35

40

La 2-[2-(metilsulfonil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (I-5)



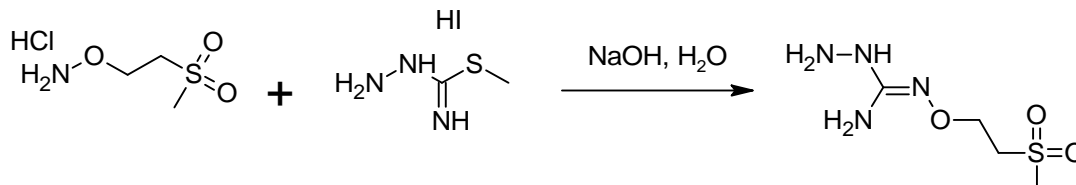
m-CPBA (11 g) se añadió porción a porción a una solución agitada de 2-[2-(metilsulfanil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (9,6 g) en diclorometano (100 ml) a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. El material bruto se concentró bajo presión reducida y el residuo resultante se suspendió en una solución saturada de NaHCO₃ (100 ml) y se agitó durante 30 minutos. El sólido resultante se filtró bajo presión reducida, se lavó con agua (50 ml), se secó bajo presión reducida y dio 9 g de 2-[2-(metilsulfonil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (rendimiento: 82,6 %) y se utilizó para la siguiente fase sin más procesamiento. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,15 (s, 3H), 3,66 (t, 2H), 4,54 (t, 2H), 7,88 (s, 4H). LC-MS: m/z= 270.3 (M+H).

10 Clorhidrato de 1-(aminoxi)-2-(metilsulfonil)etano (I-6)



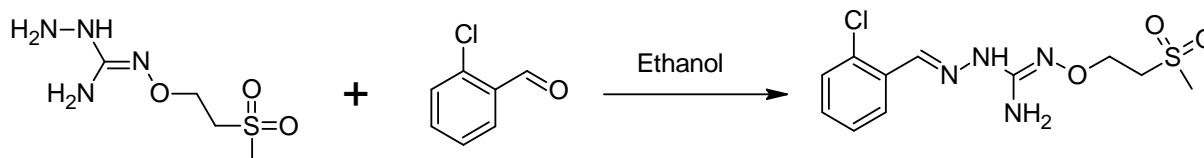
Se añadió el 85 % del metilhidracina (2 g) gota a gota a una suspensión agitada de 2-[2-(metilsulfonil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (9 g) en diclorometano (100 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 6 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se filtró bajo presión reducida para retirar el subproducto insoluble. El filtrado resultante se concentró bajo presión reducida a una temperatura más baja. El residuo se suspendió en 1N HCl (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 ml). La solución acuosa resultante que contiene el producto deseado se concentró bajo presión reducida y dio un sólido blanco que se trituró todavía más con éter dietílico y se secó bajo presión reducida, lo que dio 4 g de clorhidrato de 1-(aminoxi)-2-(metilsulfonil)etano (rendimiento: 68,3 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,04 (s, 3H), 3,60 (t, 2H), 4,38 (t, 2H), 10,09 (s broad, 2H). LC-MS: m/z= 270.3 (M+H).

N-[2-(metilsulfonil)etoxi]hidracinacarboximidamida (I-7)



Se añadió la solución 2N NaOH (4,28 ml) gota a gota a una solución agitada de clorhidrato de 1-(aminoxi)-2-(metilsulfonil)etano (1,5 g) e hidroyoduro de s-metilisotiosemicarbazida (1,99 g) en agua (4,5 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y con el residuo se formó un azeótropo de metanol (5 ml). El material resultante se suspendió en etanol (10 ml) y las sales inorgánicas insolubles se retiraron por filtración. El filtrado resultante que contiene *N*-[2-(metilsulfonil)etoxi]hidracinacarboximidamida se usó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento.

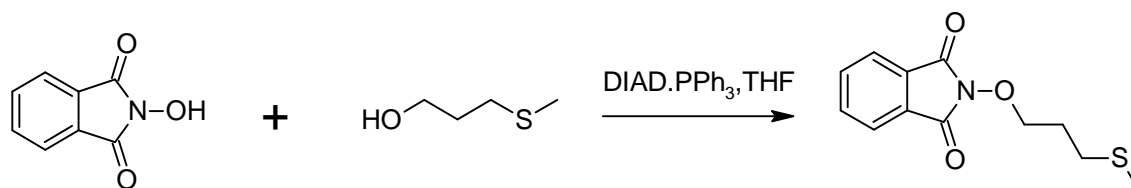
2-(2-clorobencilideno)-*N*-[2-(metilsulfonil)etoxi]hidracinacarboximidamida (compuesto 3)



Se añadió 2-clorobenzaldeido (1,32 g) gota a gota al filtrado que contiene *N*-[2-(metilsulfonil)etoxi]hidracinacarboximidamida a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó todavía más con Prep HPLC utilizando un 0,1 % de NH₃/agua/MeCN, lo que dio 20 mg de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-[2-(metilsulfonil)etoxi]hidracinacarboximidamida (rendimiento: 0,7% para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,03 (s, 3H), 3,45 (m, 2H), 4,12 (m, 2H), 6,11 (s broad, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,44 (m, 1H), 8,15 (m, 1H), 8,26 (s broad, 1H), 10,48 (s, 1H). LC-MS: m/z= 318.83 (M+H).

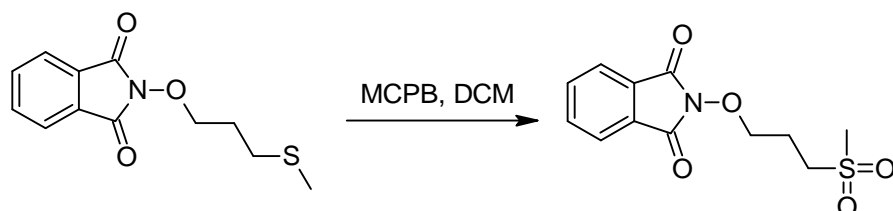
Compuesto 4: 2-(2-clorobencilideno)-*N*'-[3-(metilsulfonil)propoxi]hidracinacarboximidamida

2-[3-(metilsulfanil)propoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (I-8)



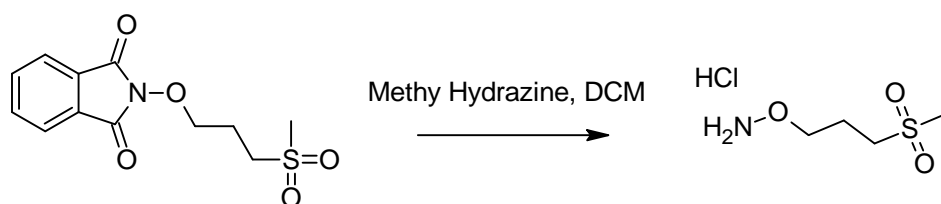
5 Se añadió diisopropil azodicarboxilato (77,92 ml) gota a gota a una solución agitada de N-Hidroxifitalimida (36,8 g), 3-(metilsulfanil)-1-propanol (30 g) y trifetilfosfina (37,1 g) en THF anhidro (600 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0°C. La mezcla de la reacción se agitó a 0°C durante 30 minutos y, a continuación, se dejó calentar hasta llegar a temperatura ambiente y se agitó durante 18 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida para obtener un material bruto que se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice. El producto deseado se eluyó a aprox. el 4% de acetato de etilo en hexano. La evaporación de las fracciones de producto puro dio 30 g de 2-[3-(metilsulfanil)propoxi]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (rendimiento: 42,2 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,94 (q, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,67 (t, 2H), 4,23 (t, 2H), 7,87 (s, 4H). LC-MS: m/z= 252.4 (M+H).

Se añadió 2-[3-(metilsulfonil)propoxi]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (I-9)



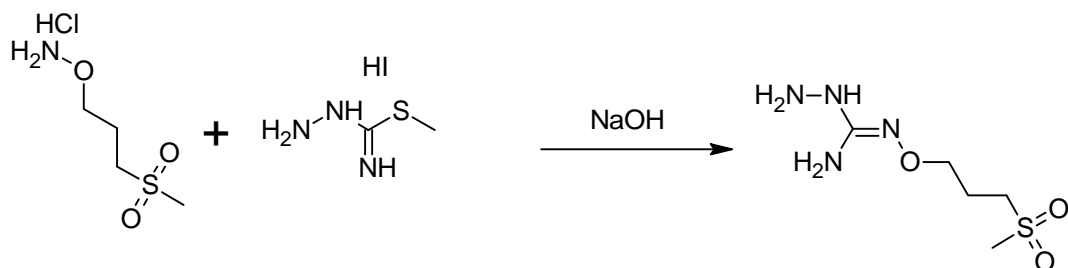
15 m-CPBA (61,89 g) porción a porción a una solución agitada de 2-[3-(metilsulfanil)propoxi]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (30 g) en diclorometano (550 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, las mezclas de la reacción se concentraron bajo presión reducida para obtener un material bruto que se suspendió en una solución saturada de NaHCO₃ (250 ml) y se agitó bien durante 30 minutos. El sólido resultante se filtró bajo presión reducida y se lavó con agua (100 ml). El sólido se secó bajo presión reducida para dar 22 g de 2-[3-(metilsulfonil)propoxi]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (rendimiento: 65 %). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 2,32 (m, 2H), 3,00 (s, 3H), 3,50 (t, 2H), 4,39 (t, 2H), 7,83 (m, 4H). LC-MS: m/z= 283.9 (M+H).

25 Clorhidrato de 1-(aminoxi)-3-(metilsulfonil)propano (I-10)



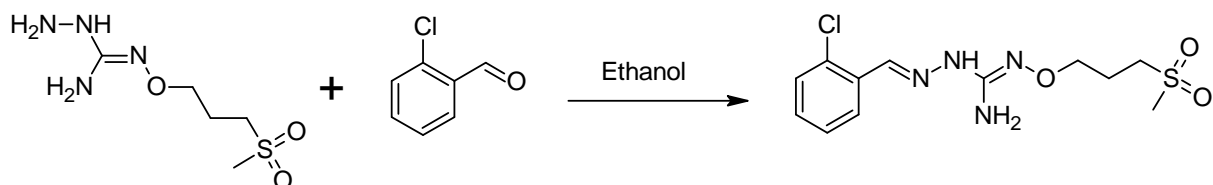
30 Se añadió un 85 % de metilhidracina (4,2 g) gota a gota a una solución agitada de 2-[3-(metilsulfonil)propoxi]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (20 g) en diclorometano (300 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 6 horas. A continuación, la solución se filtró bajo presión reducida para retirar el subproducto insoluble. El filtrado resultante se concentró bajo presión reducida a baja temperatura. El residuo se suspendió en 1N HCl (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml) para retirar las impurezas indeseadas. La solución acuosa resultante se concentró bajo presión reducida para dar un sólido blanco que se trituro todavía más con dietiléter y se secó bajo presión reducida para dar 8 g de clorhidrato 1-(aminoxi)-3-(metilsulfonil)propano (rendimiento: 59,8 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 2,04 (m, 2H), 3,02 (s, 3H), 3,19 (t, 2H), 4,12 (t, 2H), 11,06 (s broad, 3H).

N-[3-(metilsulfonil)propoxi]hidracinacarboximidamida (I-11)



Se añadió una solución de 2N NaOH (5,28 ml) gota a gota a una solución agitada de clorhidrato de 1-(aminoxi)-3-(metilsulfonil)propano (2 g) e hidroyoduro de s-metilisotiosemicarbazida (2,46 g) en agua (6 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La formación de *N*-[3-(metilsulfonil)propoxi]hidracinacarboximidamida se confirmó mediante un análisis LCMS. A continuación, la mezcla se concentró bajo presión reducida y con el residuo se formó un azeótropo de metanol (15 ml). El material resultante se suspendió en etanol (15 ml) y las sales inorgánicas insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se usó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. LC-MS: $m/z = 210.8$ (M+H).

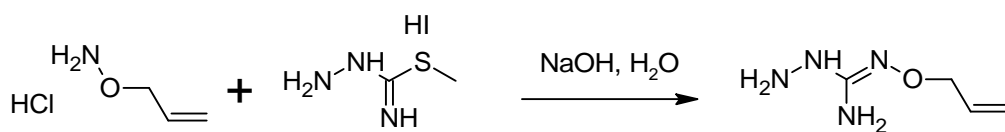
2-(2-clorobenzilideno)-*N*-[3-(metilsulfonil)propoxi]hidracinacarboximidamida (compuesto 4)



Se añadió 2-clorobenzaldeído (1,62 g) gota a gota al filtrado que contiene *N*-[3-(metilsulfonil)propoxi]hidracinacarboximidamida a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción resultante se agitó a la misma temperatura durante 2 horas. El material bruto se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido así se purificó todavía más mediante Prep HPLC utilizando un 0,1 % de NH_3 /agua/MeCN. Tras la purificación, el material se agitó en una solución saturada de NaHCO_3 y el sólido resultante se filtró bajo presión reducida, se lavó con agua y se secó para dar 0,14 g de puro 2-(2-clorobenzilideno)-*N*-[3-(metilsulfonil)propoxi]hidracinacarboximidamida (rendimiento: 4 % para 2 fases). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 2,01 (m, 2H), 2,98 (s, 3H), 3,24 (t, 2H), 3,82 (t, 2H), 5,90 (s, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,43 (d, 1H), 8,13 (m, 2H), 10,48 (s, 1H). LC-MS: $m/z = 333.5$ (M+H).

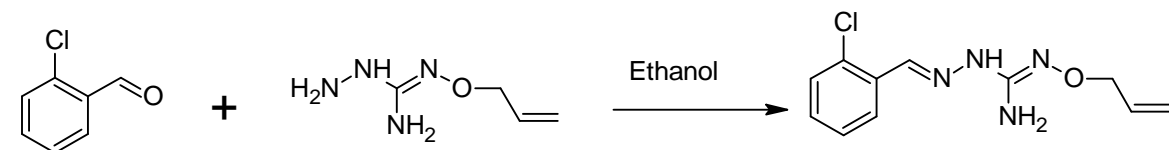
Compuesto 5: 2-(2-clorobenzilideno)-*N*'-(prop-2-en-1-yloxy) hidracina carboximidamida

N'-(prop-2-en-1-iloxi)hidracinacarboximidamida (I-12)



Se añadió una solución de 2N NaOH (6,8 ml) gota a gota a una solución agitada de clorhidrato de O-Alilhidroxilamina (1,5 g) e hidroyoduro de s- metilisotiosemicarbazida (3,22 g) en agua (4,2 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La formación de I-12 *N*'-(prop-2-en-1-iloxi)hidracinacarboximidamida intermedia se confirmó mediante análisis LCMS. A continuación, la mezcla se concentró bajo presión reducida y con el residuo se formó un azeótropo de metanol (5 ml). El material resultante se suspendió en etanol (10 ml) y las sales inorgánicas insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se usó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. LC-MS: $m/z = 130.6$ (M+H).

2-(2-clorobenzilideno)-*N*'-(prop-2-en-1-iloxi)hidracinacarboximidamida (compuesto 5)



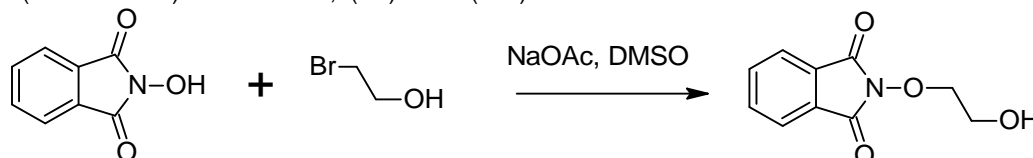
Se añadió 2-clorobenzaldeído (1,9 g) gota a gota al filtrado que contenía *N*'-(prop-2-en-1-iloxi)hidracinacarboximidamida a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La mezcla de la reacción se

concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido así se purificó todavía más mediante Prep HPLC utilizando un 0,1 % de HCOOH/agua/MeCN, o que dio 0,25 g de 2-(2-clorobencilideno)-*N'*-(prop-2-en-1-iloxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 6,1 % para 2 fases. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,17 (s, 1H), 4,23 (m, 2H), 5,82 (s broad, 2H), 5,98 (m, 1H), 7,37 (m, 2H), 8,15 (m, 3H). LC-MS: m/z= 252.8 (M+H).

5

Compuesto 6: 2-(2-clorobencilideno)-*N'*-(2-hidroxi-etoxi) hidracina carboximidamida

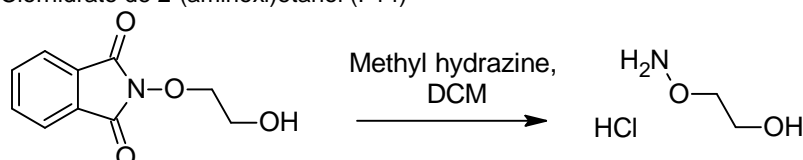
2-(2-hidroxi-etoxi)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (I-13)



10 Se añadió 2-Bromotanol (13.26 ml) gota a gota a una solución agitada de *N*-Hidroxitfitalimida (10 g) y acetato de sodio (25,14 g) en DMF (50 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción resultante se agitó a 80°C durante 1,5 horas. La mezcla de la reacción se dejó enfriar hasta ponerse a temperatura ambiente y se vertió en 500 ml de agua fría y el producto se extrajo con acetato de etilo (2 x 400 ml). La capa orgánica resultante se combinó y se destiló al vacío. El residuo se agitó en agua fría y el sólido resultante se filtró al vacío. El sólido se secó bajo presión reducida para dar 6 g de 2-(2-hidroxi-etoxi)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (rendimiento: 47.3 %) que se utilizó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,70 (q, 2H), 4,18 (t, 2H), 4,83 (t, 1H), 7,87 (s, 4H). LC-MS: m/z= 208.34 (M+H).

15

Clorhidrato de 2-(aminoxi)etanol (I-14)



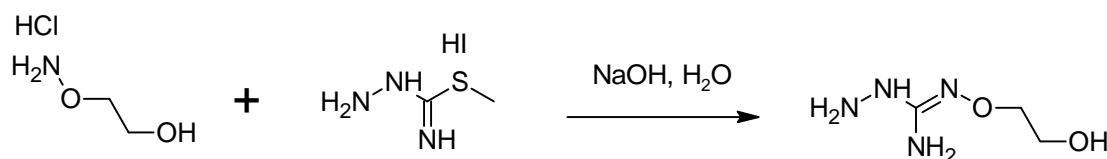
20

Se añadió un 85 % de metilhidrazina (1,25 g) gota a gota a una suspensión agitada de 2-(2-hidroxi-etoxi)-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (6 g) en diclorometano (25 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se filtró bajo presión reducida para retirar el subproducto insoluble. El filtrado se concentró bajo presión reducida a temperatura más baja. El residuo se suspendió en HCl 2N en acetato de etilo (20 ml) y se concentró bajo presión reducida a temperatura más baja. El sólido resultante se trituró con diclorometano (2 x 15 ml) y se secó bajo presión reducida para dar 2,8 g de clorhidrato de 2-(aminoxi)etanol (rendimiento: 85,5 % como monoclóridato de sal). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,61 (m, 2H), 4,04 (t, 2H), 4,73 (m, 1H), 11,02 (s broad, 2H).

25

N-(2-hidroxi-etoxi)hidracinacarboximidamida (I-15)

30

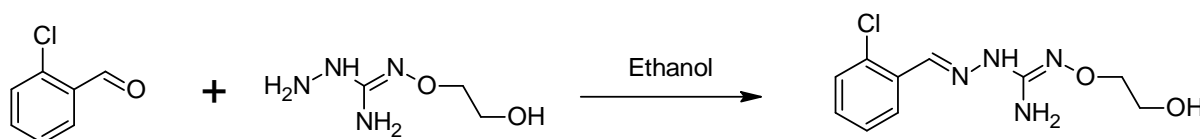


Se añadió la solución 2N NaOH (10,6 ml) gota a gota a una solución agitada de sal de hidrócloruro de 2-(aminoxi)etanol (2,4 g) y yodhidrato de *s*-metil isotiosemicarbazida (4,98 g) en agua (8,4 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. La formación de *N*-(2-hidroxi-etoxi)hidracinacarboximidamida se confirmó mediante el análisis LCMS. Las mezclas se concentraron bajo presión reducida y el residuo resultante con el residuo se formó un azeótropo con metanol (15 ml). El material resultante se suspendió en etanol (10 ml) y las sales inorgánicas insolubles se retiraron por filtración. El filtrado que contenía *N*-(2-hidroxi-etoxi)hidracinacarboximidamida se utilizó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. LC-MS: m/z= 134,6 (M+H)

35

40

2-(2-clorobencilideno)-*N'*-(2-hidroxi-etoxi)hidracinacarboximidamida (compuesto 6)



Se añadió 2-clorobenzaldeído (3,28 g) gota a gota al filtrado que contenía *N*-(2-hidroxi-etoxi)hidracinacarboximidamida a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido así se purificó todavía más mediante Prep HPLC utilizando 0,1 % de NH₃/agua/MeCN, lo que dio

45

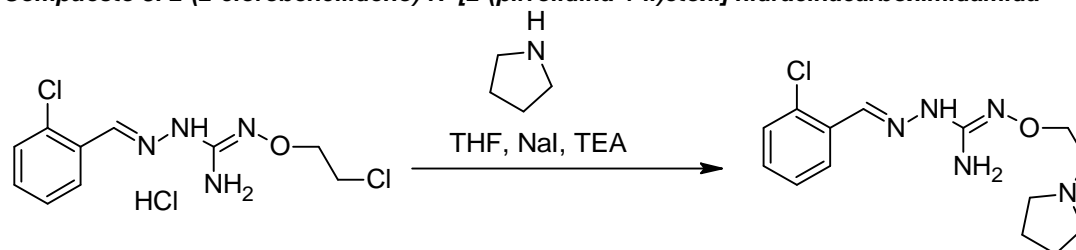
0,24 g de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-hidroxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 4,4 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 3,68 (m, 2H), 3,97 (m, 2H), 5,82 (s broad, 2H), 5,07 (m, 1H), 7,50 (m, 2H), 7,55 (m, 1H), 8,34 (m, 1H) 8,47 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 11,78 (m, 1H), 12,09 (m, 1H). LC-MS: m/z= 256.73 (M+H).

5 **Compuesto 7: Clorhidrato de 2-(2-clorobencilideno)-*N*'-(2-cloroetoxi)hidracinacarboximidamida**



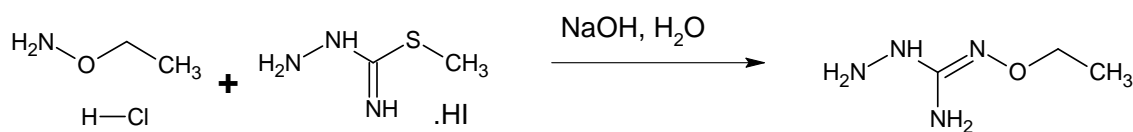
10 Se añadió SOCl_2 (0,26 ml) gota a gota a una solución agitada de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-hidroxi)hidracinacarboximidamida (0,22 g) en diclorometano (10 ml) a 0°C. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, las mezclas de la reacción se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se trituró con *n*-pentano (2 x 5 ml) y se secó bajo presión reducida para dar 0,26 g de clorhidrato 2-(2-clorobencilideno)-*N*'-(2-cloroetoxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 99,5%). LC-MS: m/z= 274.8 (M+H).

15 **Compuesto 8: 2-(2-clorobencilideno)-*N*'-[2-(pirrolidina-1-il)etoxi] hidracinacarboximidamida**



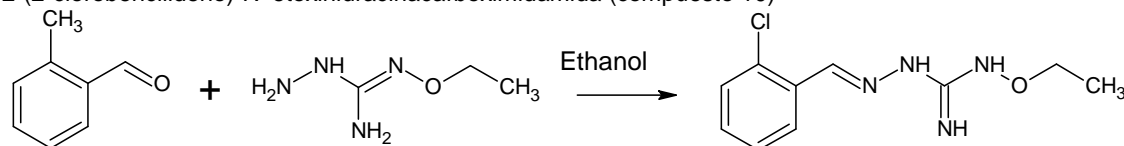
20 Se añadió pirrolidina (0,23 g) a una solución agitada de clorhidrato de 2-(2-clorobencilideno)-*N*'-(2-cloroetoxi)hidracinacarboximidamida (0,27 g), trietilamina (0,35 g) y yoduro sódico (0,04 g) en THF (10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a 50°C durante 24 horas. A continuación, se dejó que las mezclas de la reacción se enfriaran hasta ponerse a temperatura ambiente y el material bruto se vertió en 50 ml de agua fría. El producto se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). A continuación, la capa orgánica se combinó y destiló al vacío, el residuo obtenido así se purificó más mediante Prep HPLC utilizando el 0,1 % de NH_3 /agua/MeCN, lo que dio 14 mg de 2-(2-clorobencilideno)-*N*'-[2-(pirrolidina-1-il)etoxi]hidracinacarboximidamida (rendimiento: 5,3 %). ¹H-NMR (MeOD): δ (ppm) 1,91 (m, 4H), 2,75 (m, 4H), 2,88 (t, 2H), 3,97 (t, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 8,07 (m, 1H), 8,32 (s, 1H). LC-MS: m/z= 310.33 (M+H).

Compuesto 10: 2-(2-clorobencilideno)-*N*-etoxihidracinacarboximidamida
N-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida (I-16)



30 Se añadió una solución de 1N NaOH (5,12 ml) gota a gota a una solución agitada de sal de hidrocloreto de etoxiamina (0,5 g) e hidroyoduro de *s*-metilisotiosemicarbazida (1,19 g) en agua (5 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. La formación de *N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida se confirmó mediante un análisis LCMS. Las mezclas se concentraron bajo presión reducida y el residuo resultante se disolvió en etanol (15 ml). Los sólidos insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se concentró y la *N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida se usó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. LC-MS: m/z= 118.8 (M+H).

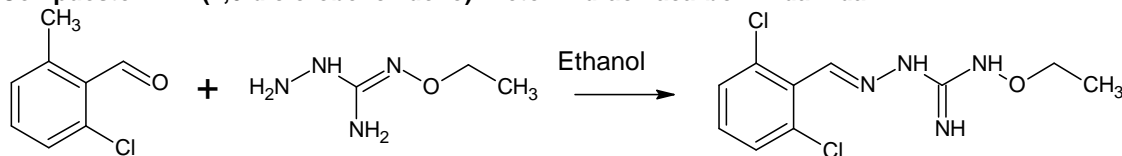
2-(2-clorobencilideno)-*N*-etoxihidracinacarboximidamida (compuesto 10)



40 Se añadió 2-clorobenzaldeído (0,717 g) gota a gota a *N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida en una solución en etanol (10 ml) y acetato de sodio (0,42 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a 90 °C. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó todavía más mediante una cromatografía, lo que

dio 21,4 mg de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 1,7 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,18 (t, 3H), 3,77 (q, 2H), 5,77 (s broad, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,43 (m, 1H), 8,11 (m, 1H), 8,15 (s, 1H), 10,45 (s broad, 1H). LC-MS: m/z= 240.9 (M+H).

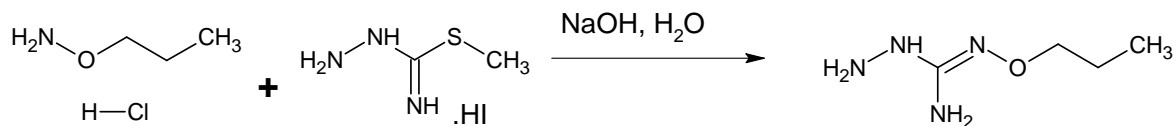
5 **Compuesto 11: 2-(2,6-diclorobencilideno)-*N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida**



Se añadió 2,6-clorobenzaldeído (0,896 g) gota a gota a un equivalente de *N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida (I-16) en una solución en etanol (10 ml) y acetato de sodio (0,42 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a 90 °C. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó todavía más mediante una cromatografía, lo que dio 57 mg de 2-(2,6-diclorobencilideno)-*N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 4,1 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,77 (t, 3H), 3,78 (q, 2H), 5,48 (s broad, 2H), 7,33 (t, 1H), 7,52 (m, 2H), 8,04 (s, 1H), 8,16 (m, 1H). LC-MS: m/z= 277.1 (M+H).

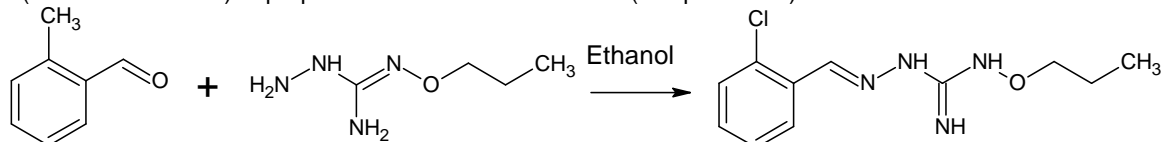
15 **Compuesto 12: 2-(2-clorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida**

N-propoxihidracinacarboximidamida (I-17)



Se añadió 2N NaOH (1,23 ml) gota a gota a una solución agitada de sal de hidrocloreuro O-propil hidroxilamina (0,28 g) e hidroyoduro de s- metilisotiosemicarbacida (0,58 g) en agua (2 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. La formación de *N*-(propoxi)hidracinacarboximidamida se confirmó mediante un análisis LCMS. Las mezclas se concentraron bajo presión reducida y el residuo resultante se disolvió en etanol (15 ml). Los sólidos insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se concentró y el *N*-(propoxi)hidracinacarboximidamida se utilizó directamente en la siguiente fase sin más procesamiento. LC-MS: m/z= 132,9 (M+H)

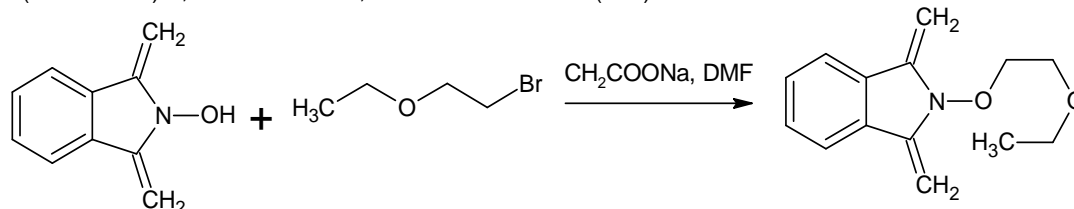
25 **2-(2-clorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida (compuesto 12)**



Se añadió 2-clorobenzaldeído (0,35 g) gota a gota a *N*-(2-propoxi)hidracinacarboximidamida en solución en etanol (10 ml) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se concentró con presión reducida y el residuo obtenido así se purificó mediante una cromatografía, lo que dio 25 mg de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-propoxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 3,9 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 0,88 (t, 3H), 1,58 (m, 2H), 3,66 (t, 2H), 5,75 (s broad, 1H), 7,29 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 8,10 (m, 2H), 10,45 (s broad, 2H). LC-MS: m/z= 255.1 (M+H).

35 **Compuesto 13: 2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-etoxietoxi) hidracinacarboximidamida**

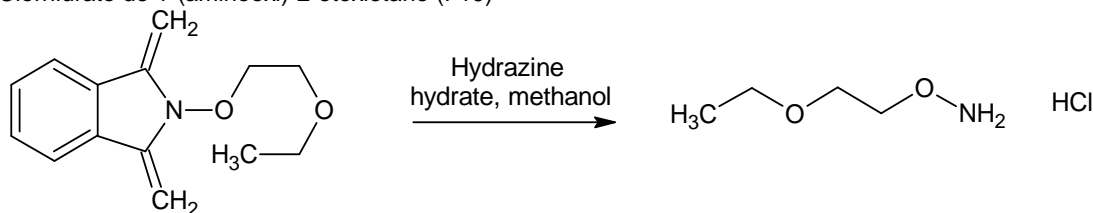
2-(2-etoxietoxi)-1,3-dimetilideno-2,3-dihidro-1*H*-isoindol (I-18)



Se disolvió O-*N*-hidroxifitalimida (4 g) y 1-bromo-2-etoxietano (11,25 g) en DMF (40 ml) y se añadió CH₃COONa (10 g) a la solución a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a 70 °C durante 12 horas. La mezcla de la reacción se dejó enfriar hasta ponerse a temperatura ambiente, se vertió en agua y luego se extrajo dos veces mediante acetato de etilo. La capa orgánica se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía de columna utilizando gel de sílice. El producto deseado se eluyó con 0-30 % de acetato de etilo en hexano. La evaporación de fracciones del producto puro dio 4,8 g de 2-(2-etoxietoxi)-1,3-dimetilideno-2,3-dihidro-1*H*-isoindol (I-

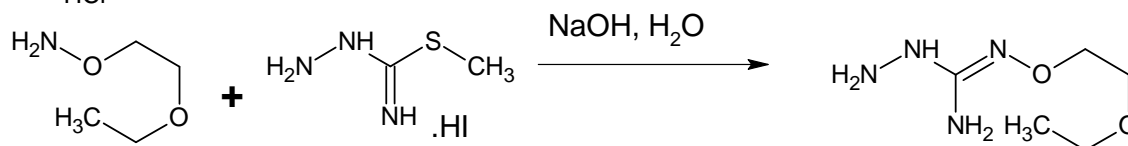
18) (rendimiento: 83,3 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 0,98 (t, 3H), 3,39 (q, 2H), 3,73 (t, 2H), 4,27 (t, 2H), 7,87 (s, 4H). LC-MS: m/z= 236.2 (M+H).

Clorhidrato de 1-(aminooxi)-2-etoxietano (I-19)



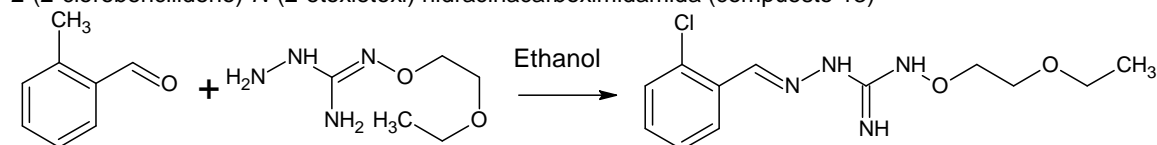
Se añadió hidrato de hidracina (1,32 g) gota a gota a una solución agitada de 2-(2-etoxyetoxi)-1,3-dimetilideno-2,3-dihidro-1H-isoindol (4,8 g) en metanol (10 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. A continuación, la mezcla de la reacción se filtró bajo presión reducida para retirar el subproducto insoluble. El filtrado se concentró bajo presión reducida a baja temperatura y se retiró el éter triturado e insoluble por filtración. Después se le añadió al filtrado 4N HCl en dioxano (10,2 ml) gota a gota y la sal precipitada se recogió por filtración y se secó a 2 g de clorhidrato de 1-(aminooxi)-2-etoxietano (rendimiento: 69,4 % como monoclóhidrato de sal). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,11 (t, 3H), 3,44 (q, 2H), 3,59 (m, 2H), 4,14 (m, 2H), 11,02 (s broad, 2H). LC-MS: m/z= 106.1 (M+H).

15 *N*-(2-etoxyetoxi)hidracinacarboximidamida (I-20)
HCl



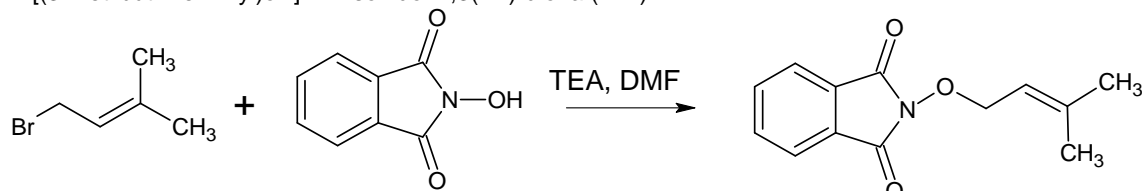
Se añadió 1 N NaOH (4,23 ml) gota a gota a una solución agitada de sal de hidrócloruro de 1-(aminooxi)-2-etoxietano (0,6 g) e hidroyoduro de s-metilisotiosemicarbada (0,99 g) en agua (2,1 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. La formación de *N*-(2-etoxyetoxi)hidracinacarboximidamida se confirmó mediante un análisis LCMS. Las mezclas se concentraron bajo presión reducida y el residuo resultante se disolvió en etanol (10 ml). Los sólidos insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se concentró y el *N*-(2-etoxyetoxi)hidracinacarboximidamida se utilizó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. LC-MS: m/z= 163.0 (M+H).

2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-etoxyetoxi) hidracinacarboximidamida (compuesto 13)



Se añadió 2-clorobenzaldeído (0,59 g) gota a gota a *N*-(2-2-etoxyetoxi)hidracinacarboximidamida en solución en etanol (5 ml) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se concentró con presión reducida y el residuo obtenido así se purificó mediante una cromatografía, lo que dio 19 mg de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-(2-propoxi)hidracinacarboximidamida (rendimiento: 1,8 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,24 (t, 3H), 3,48 (q, 2H), 3,56 (m, 2H), 3,83 (m, 2H), 5,80 (s broad, 1H), 7,43 (m, 1H), 8,12 (m, 1H), 8,17 (s, 1H), 10,50 (s broad, 2H). LC-MS: m/z= 285.0 (M+H).

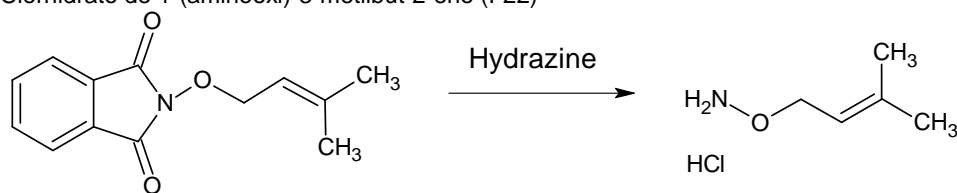
Compuesto 14: 2-(2-clorobencilideno)-*N*-[(3-metilbut-2-en-1-yl)oxi]hidracinacarboximidamida
2-[(3-metilbut-2-en-1-yl)oxi]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (I-21)



Se añadió trietilamina (12,13 g) gota a gota a una solución agitada de *N*-hidroxifitalimida (9,85 g) y 1-bromo-3-metilbuteno (9 g) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a 70 °C durante 2 horas. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se suspendió en agua fría. La suspensión resultante se agitó bien durante un tiempo y el sólido se filtró bajo presión reducida. El sólido se lavó más en agua desmineralizada (200 ml) y hexano (100 ml). El sólido resultante se secó bajo presión reducida para obtener un material crudo que se purificó mediante una cromatografía de columna

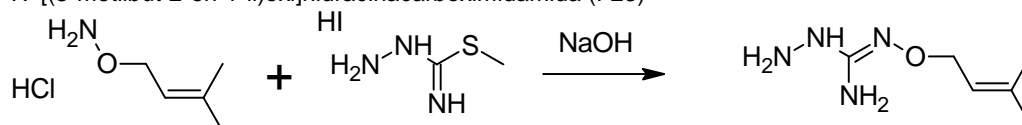
utilizando gel de sílice para producir 9 g de [(3-metilbut-2-en-1-il)oxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (rendimiento: 64,5 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,70 (d, 6H), 4,63 (m, 2H), 5,45 (m, 1H), 7,87 (s, 4H). LC-MS: m/z= 232.1 (M+H).

Clorhidrato de 1-(aminooxi)-3-metilbut-2-eno (I-22)



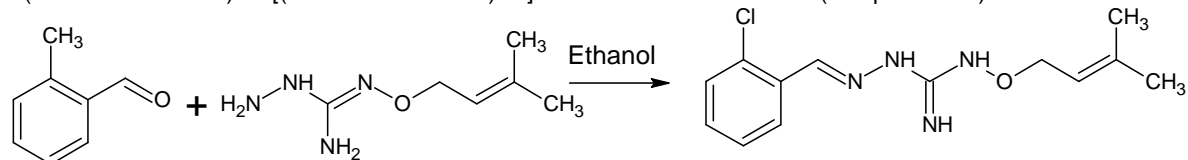
Se añadió hidrato de hidracina (2,52 g) gota a gota a una solución agitada de 2-[(3-metilbut-2-en-1-yl)oxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (9 g) en metanol (120 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 min. La mezcla de la reacción se filtró fuera para retirar el subproducto insoluble y el filtrado resultante se concentró bajo presión reducida para obtener un material bruto que se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice. El material bruto se triturado con éter e a masa insoluble se removida por filtración. El filtrado se trató con 4 M HCl en dioxano (19 ml) gota a gota y el precipitado se filtró, se recogió y se secó al vacío, lo que dio 2,9 g de Clorhidrato 1-(aminooxi)-3-metilbut-2-eno (rendimiento: 73,6 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,70 (s, 3H), 1,75 (s, 3H), 1,65 (m, 1H), 4,50 (d, 2H), 5,30 (t, 1H), 10,89 (s, 3H).

N-[(3-metilbut-2-en-1-il)oxi]hidracinacarboximidamida (I-23)



La solución 1N NaOH (3,63 ml) se añadió gota a gota a una solución agitada de clorhidrato de 1-(aminooxi)-3-metilbut-2-eno (0,5 g) y yodhidrato de s-metilisotiosemicarbazida (0,85 g) en agua (3 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. A continuación, las mezclas de la reacción se concentraron bajo presión reducida. El residuo resultante se suspendió en etanol (15 ml) y las sales inorgánicas insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se concentró y se usó directamente para la siguiente fase sin más procesamiento. *N*-[(3-metilbut-2-en-1-il)oxi]hidracinacarboximidamida se confirmó mediante un análisis LCMS. LC-MS: m/z= 159.15 (M+H).

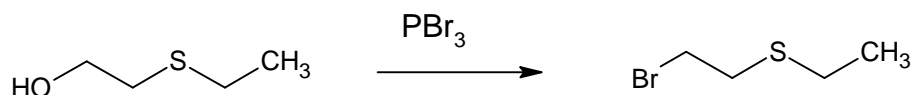
2-(2-clorobencilideno)-*N*-[(3-metilbut-2-en-1-il)oxi]hidracinacarboximidamida (compuesto 14)



Se añadió 2-clorobenzaldeído (0,5 g) gota a gota a *N*-[(3-metilbut-2-en-1-yl)oxi]hidracinacarboximidamida en solución en etanol (3 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a 90 °C. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido así se purificó más por cromatografía, lo que dio 139 mg de 2-(2-clorobencilideno)-*N*-[(3-metilbut-2-en-1-il)oxi]hidracinacarboximidamida (rendimiento: 13,5 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,64 (s, 3H), 1,71 (s, 3H), 3,17 (s, 1H), 4,25 (d, 2H), 5,39 (t, 1H), 5,75 (s broad, 2H), 7,32 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 8,10 (m, 1H), 8,15 (m, 1H), 8,17 (s broad, 1H). LC-MS: m/z= 281.2 (M+H).

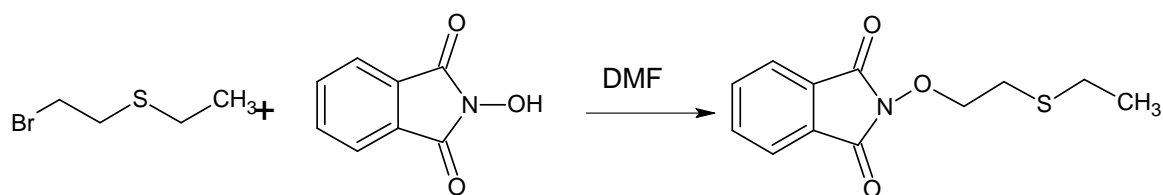
Compuesto 15: 2-(2-clorobencilideno)-*N*-[2-(etilsulfanil) etoxi]hidracinacarboximidamida

Sulfuro de 2-bromoetil-etilo (I-24)



Se añadió PBr₃ (10 ml) gota a gota a 2-(etilsulfanil)etanol en solución en diclorometano (100 ml) a 0 °C y se agitó durante 2 horas. A continuación, la mezcla de la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. La mezcla de la reacción se enfrió a 0 °C y se añadieron 10 ml de agua. A continuación, la mezcla de la reacción se neutralizó con una solución saturada de Na₂CO₃ (~hasta Ph 7) y se extrajo con diclorometano (3 X 250 ml). Las capas orgánicas se separaron, se combinaron y se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron para proporcionar 13 g de sulfuro de 2-bromoetil-etilo (rendimiento: 72,7 %). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (ppm) 1,30 (t, 3H), 2,62 (q, 2H), 2,97 (m, 2H), 3,50 (m, 2H).

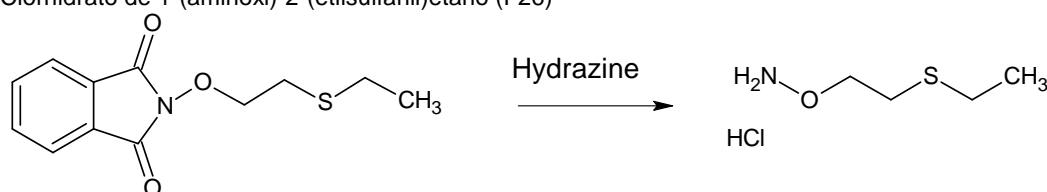
2-[2-(etilsulfanil)etoxi]-1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-diona (I-25)



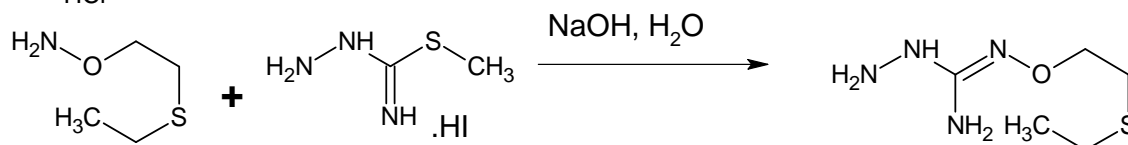
LaN-

hidroxitallimida (3,9 g) y 6 el sulfuro de 2-bromoetil-etilo (12,1 g) se disolvieron en DMF (40 ml) y se añadió CH_3COONa (9,7 g) porción a porción a la solución a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a 70°C durante 2 horas. De dejó enfriar la mezcla de la reacción a temperatura ambiente y se vertió en agua fría y, a continuación, se extrajo dos veces con acetato de etilo. La capa orgánica se concentró bajo presión reducida y se purificó mediante cromatografía de columna utilizando gel de sílice. Esto dio 6 g de 2-[2-(etilsulfanil)etoxi]-1*H*-isindol-1,3(2*H*)-diona (I-25) (rendimiento: 98 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 1,29 (t, 3H), 2,63 (q, 2H), 2,94 (t, 2H), 4,36 (t, 2H), 7,77 (m, 2H), 7,86 (m, 2H).

10 Clorhidrato de 1-(aminoxi)-2-(etilsulfanil)etano (I-26)

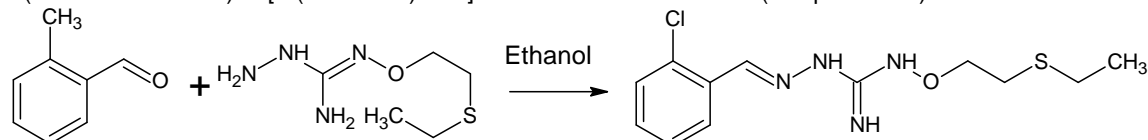


Se añadió hidrato de hidracina (0,25 g) gota a gota a una solución agitada de 2-[2-(etilsulfanil)etoxi]-1*H*-isindol-1,3(2*H*)-diona (1 g) en metanol (10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó a la misma temperatura durante 30 min. La mezcla de la reacción se filtró para retirar el subproducto insoluble y el filtrado resultante se concentró bajo presión reducida, luego se disolvió en DCM y la masa insoluble se retiró por filtración. El filtrado se concentró bajo presión reducida y, a continuación, el material bruto se trituró con éter y la masa insoluble se retiró por filtración. El filtrado se trató con 4 M HCl en dioxano (2 ml) gota a gota. A continuación, el solvente se retiró por evaporación y el residuo se trituró con dietiléter para proporcionar 454 mg de clorhidrato de 1-(aminoxi)-2-(etilsulfanil)etano (rendimiento: 72,5 %). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ (ppm) 1,18 (s, 3H), 2,53 (m, 2H), 2,79 (t, 2H), 4,16 (t, 2H), 11,14 (s broad, 3H).

N-[2-(etilsulfanil)etoxi]hidracinacarboximidamida (I-27)
HCl

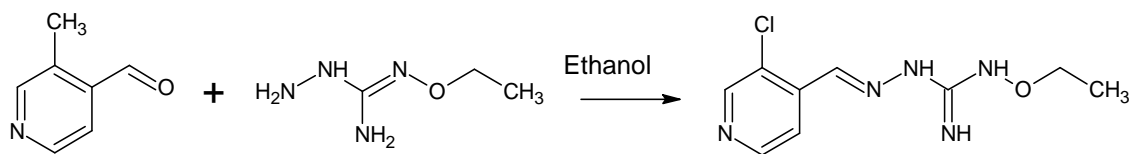
Se añadió una solución de 1N NaOH (2,88 ml) gota a gota a una solución agitada de clorhidrato de 1-(aminoxi)-2-(etilsulfanil)etano (0,5 g) e hidroyoduro de s-metilisotiosemicarbazida (0,7 g) en agua (5 ml) a temperatura ambiente y se agitó durante 48 horas. Las mezclas se concentraron bajo presión reducida y el residuo resultante se disolvió en etanol (15 ml). Los sólidos insolubles se retiraron por filtración. El filtrado se concentró y se usó directamente N-[2-(etilsulfanil)etoxi]hidracinacarboximidamida para la siguiente fase sin más procesamiento.

30 2-(2-clorobencilideno)-N-[2-(etilsulfanil)etoxi]hidracinacarboximidamida (compuesto 15)



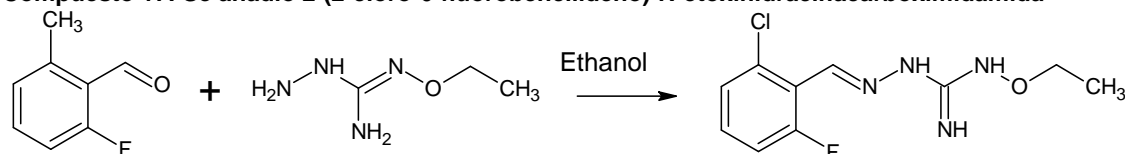
Se añadió 2-clorobenzaldeído (0,4 g) gota a gota a N-[2-(etilsulfanil)etoxi]hidracinacarboximidamida en solución en etanol (5 ml) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó más mediante una cromatografía que dio 15 mg de 2-(2-clorobencilideno)-N-[2-(etilsulfanil)etoxi]hidracinacarboximidamida (Rendimiento: 1,5 % para 2 fases). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ (ppm) 1,90 (t, 3H), 2,54 (q, 2H), 2,75 (t, 2H), 3,85 (t, 2H), 5,84 (s broad, 2H), 7,30 (m, 2H), 7,44 (m, 1H), 8,12 (m, 1H), 8,16 (s, 1H), 10,50 (s broad, 1H). LC-MS: $m/z = 301.9$ (M+H).

Compuesto 16: 2-[(3-cloropiridina-4-yl)metilideno]-N-etoxihidracinacarboximidamida



Se añadió 3-cloroisonicotinaldeído (0,72 g) gota a gota a 1 equivalente de *N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida (I-16) en una solución en etanol (5 ml) y acetato de sodio (0,42 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a 80 °C. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó más mediante una cromatografía que dio 184 mg de 2-[(3-cloropiridina-4-yl)metilideno]-*N*-etoxihidracinacarboximidamida (rendimiento: 15 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,19 (t, 3H), 3,79 (q, 2H), 5,96 (s broad, 2H), 8,05 (s, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,41 (s, 1H), 10,89 (s broad, 1H). LC-MS: m/z= 242.0 (M+H).

10 **Compuesto 17: Se añadió 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-etoxihidracinacarboximidamida**

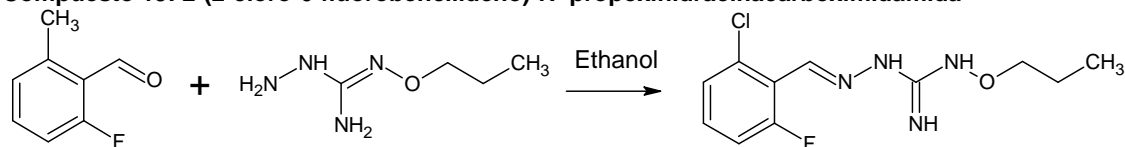


2-cloro-6-fluorobenzaldeído (0,81 g) gota a gota a 1 equivalente de *N*-(2-etoxi)hidracinacarboximidamida (I-16) en una solución de etanol (5 ml) y acetato de sodio (0,42 g) a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas a 80 °C. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo obtenido se purificó más mediante una cromatografía que dio 215 mg de 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-etoxihidracinacarboximidamida (rendimiento: 17,2 % para 2 fases). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 1,17 (m, 3H), 3,78 (q, 2H), 5,48 (s broad, 2H), 7,30 (m, 3H), 8,01 (s, 1H), 10,54 (s broad, 1H). LC-MS: m/z= 258.9 (M+H).

20 **Compuesto 18: *N*-butoxi-2-(2-clorobencilideno)hidracinacarboximidamida**

El compuesto 18 se prepara siguiendo el mismo procedimiento del compuesto 12 de 2-clorobenzaldeído y *N*-(2-butoxi)hidracinacarboximidamida.

25 **Compuesto 19: 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida**

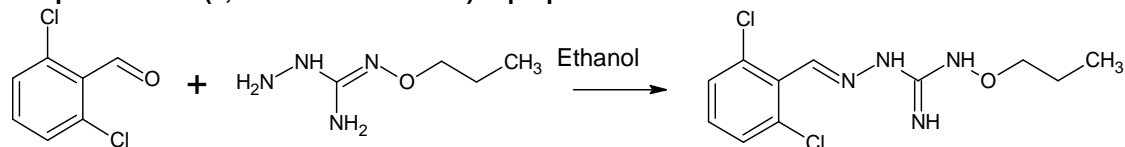


El compuesto 19 se prepara siguiendo el mismo procedimiento del compuesto 17 de 2-cloro-6-fluorobenzaldeído y *N*-(2-propoxi)hidracinacarboximidamida (I-17), lo que dio 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida LC-MS: m/z= 273.0 (M+H).

30 **Compuesto 20: 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-butoxihidracinacarboximidamida**

El compuesto 20 se prepara siguiendo el mismo procedimiento del compuesto 17 de 2-cloro-6-fluorobenzaldeído y *N*-(2-butoxi)hidracinacarboximidamida.

35 **Compuesto 21: 2-(2,6-diclorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida**

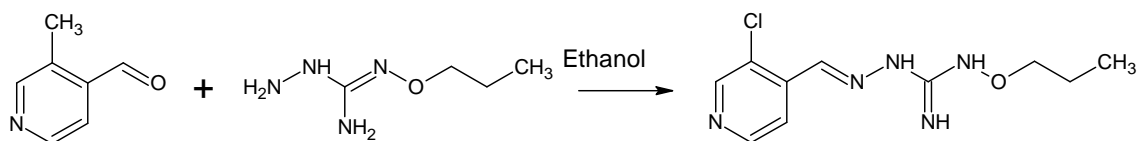


El compuesto 21 se prepara siguiendo el mismo procedimiento del compuesto 11 de 2,6-diclorobenzaldeído y *N*-(2-propoxi)hidracinacarboximidamida (I-17), lo que da 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida LC-MS: m/z= 290,9 (M+H).

40 **Compuesto 22: 2-(2,6-diclorobencilideno)-*N*-butoxihidracinacarboximidamida**

El compuesto 22 se prepara siguiendo el mismo procedimiento del compuesto 17 de 2,6-diclorobenzaldeído y *N*-(2-butoxi)hidracinacarboximidamida.

Compuesto 23: 2-[(3-cloropiridina-4-il)metilideno]-*N*-propoxihidracinacarboximidamida

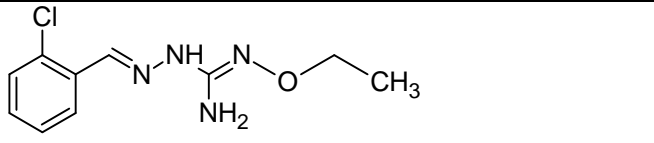
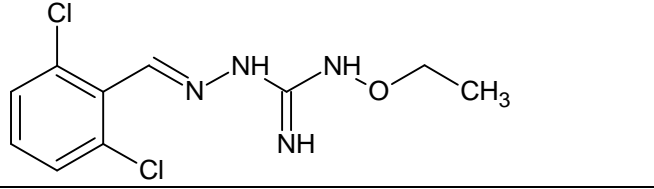
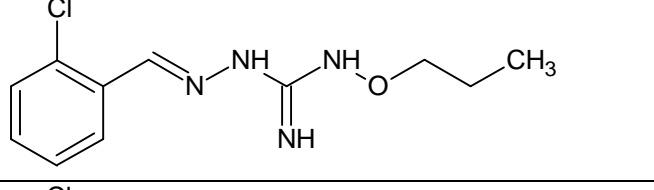
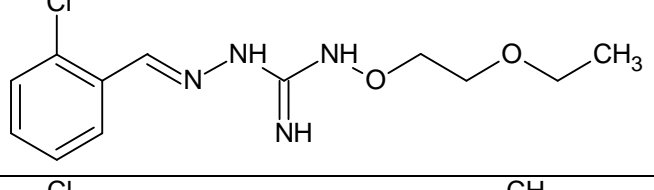
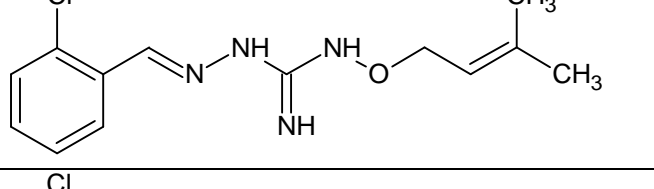
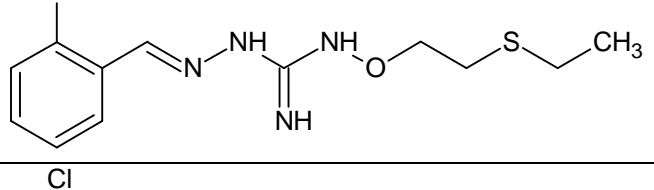
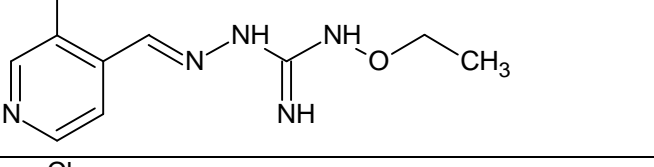
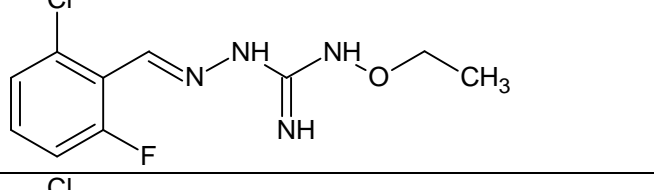
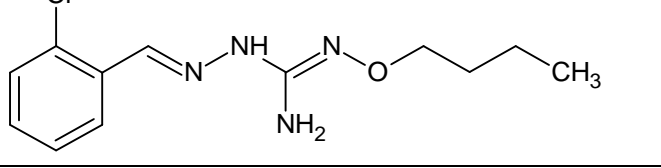


El compuesto 23 se prepara siguiendo el mismo procedimiento del compuesto 16 de 3-cloroisonicotinaldeido y *N*-(2-propoxi)hidracinacarboximidamida (I-17), lo que da 2-(2-cloro-6-fluorobencilideno)-*N*-propoxihidracinacarboximidamida LC-MS: $m/z = 255,9$ (M+H).

5

Los compuestos seleccionados de acuerdo con la invención se exponen en la siguiente tabla:

Compuesto 1	<p>HCOOH</p>
Compuesto 2	
Compuesto 3	
Compuesto 4	
Compuesto 5	
Compuesto 6	
Compuesto 7	<p>HCl</p>
Compuesto 8	
Compuesto 9	

Compuesto 10	
Compuesto 11	
Compuesto 12	
Compuesto 13	
Compuesto 14	
Compuesto 15	
Compuesto 16	
Compuesto 17	
Compuesto 18	

Compuesto 19	
Compuesto 20	
Compuesto 21	
Compuesto 22	
Compuesto 23	

En algunos de los siguientes experimentos se puede usar la sal de estos compuestos.

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

Las células HeLa se cultivaron en el medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomina (Lonza) que contiene un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Biowest). Las células 293T se cultivaron en un medio esencial de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado con penicilina, estreptomina, glutamina (Lonza) y un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Biowest). Las células Min6 se cultivaron en DMEM suplementado con penicilina, estreptomina, glutamina, piruvato de sodio, 50 μ M β -mercaptoetanol y un 15 % de suero bovino fetal (FBS) (Biowest).

Las células INS1 se cultivaron en RPMI suplementado con penicilina, estreptomina, glutamina, piruvato de sodio (Lonza), 50 μ M β -mercaptoetanol y un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Biowest). Cada línea de célula se mantuvo a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂.

Las secuencias humanas de marco de lectura abierta (ORF) para PLP1, DM20 e insulina se obtuvieron de Life Technologies (Invitrogen) (IOH41689, IOH5252 y IOH7334, respectivamente). La construcción de la clonación para plásmido de expresión pDEST26 (Invitrogen) se realizó con Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix (Invitrogen). Las mutaciones del ORF se realizaron utilizando el kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) (mutación T181P para PLP1 y DM20 ORFs, Akita (C96Y) para ORF de insulina).

La expresión génica en células de mamíferos se realizó por nucleofección, utilizando el sistema Amaxa[™] 4D-Nucleofector[™] (Lonza) o por transfección utilizando Lipofectamine (Life technologies).

1.3- Citoprotección del estrés del retículo endoplasmático

Este ensayo se describe en Tsaytler *et al.* (Science 2011). Las células HeLa se cultivaron en el medio mínimo esencial de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés) complementado con glutamina, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomina con un 10 % de suero fetal bovino, a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de

CO₂. Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una densidad de 17 000 células/mL el día previo al tratamiento. El estrés del retículo endoplasmático (RE) se obtuvo mediante la adición de 5 µg/mL de tunicamicina (Sigma-Aldrich) junto con inhibidores de la PPP1R15A (0,5-10 µM). Los medios se cambiaron 6 horas más tarde y la citoprotección se mantuvo añadiendo inhibidores de la PPP1R15A (0,5-10 µM). La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción de WST-8 en formazano usando el Kit-8 de recuento celular (Sigma) siguiendo la recomendación del proveedor, 48 o 72 horas después del tratamiento de tunicamicina. La citoprotección del estrés del retículo endoplasmático se mide en función del efecto de la potencia citoprotectora en comparación con el compuesto de referencia guanabenz (Tsaytler *et al.*, Science 2011) después del estrés del retículo endoplasmático:

- '-' ningún efecto citoprotector;
- 10- '+' menor efecto citoprotector en comparación con el guanabenz;
- '++' efecto citoprotector similar en comparación con el guanabenz;
- '+++' mayor efecto citoprotector en comparación con el guanabenz.

La tabla 1 resume los resultados del efecto citoprotector de distintos compuestos de la invención, en comparación con el guanabenz, tras el estrés inducido por una exposición de tunicamicina de 6 horas.

1.4 Evaluación de los índices de conversión en las células no estresadas

Las células HeLa (100 000 células/ml) se distribuyeron en placas de 6 pocillos 24 horas antes de cada experimento y se dejaron sin tratar o se trataron con compuestos (50 µM) durante 2,5, 5 y 9 horas. El medio de cultivo se sustituyó por un medio DMEM sin metionina (Invitrogen) 30 min antes de añadir los compuestos. Una hora antes de cada fase, se añadieron 50 µM de AHA (L-azidohomoalanina) Click-iT® (Invitrogen) al medio de cultivo para etiquetar proteínas recién sintetizadas. Al final de cada intervalo de tiempo las células se lavaron con PBS helado y se recolectaron por disociación de tripsina (Lonza), luego se disolvieron en un tampón de 50 mM de Tris-HCl que contenía un 1 % de SDS (Sigma) e inhibidores de proteasa y fosfatasa (Sigma). Las muestras de proteína se acoplaron asociadas a biotina de alquino (Invitrogen) usando el kit de tampón de reacción de proteínas (Invitrogen) Click-iT®. Las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 10 min, se resolvieron en geles prefundidos ECL 4-20 % (GE Healthcare) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). La biotina de alquino acoplada al AHA de Click-iT® incorporada en las proteínas recién sintetizadas se detectó utilizando estreptavidina-HRP (Gentex). El descubrimiento se efectuó incubando ECL Prime (GE Healthcare) y se leyó mediante quimioluminiscencia utilizando Fusion Solo 3S (Vilber Lourmat).

1.5 Evaluación de los índices de conversión en las células estresadas

Se realizaron tratamientos para la traducción de la medición en células no estresadas, excepto en el caso de la tunicamicina (5 µg/ml), que se añadió junto con los compuestos.

1.6 Ensayo funcional GPCR para el receptor adrenérgico α2A (método de detección de CellKey)

La actividad agonista de los compuestos se evaluó en células CHO de forma endógena expresando el receptor humano alfa2A y se determinó midiendo sus efectos en la modulación de la impedancia usando el método de detección CellKey. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 6×10^4 células/pocillo en el tampón de HBSS (Invitrogen) + 20 mM de HEPES (Invitrogen) con un 0,1 % de BSA y se les permitió equilibrarse durante 60 min a 28 °C antes de empezar el experimento. Las placas se colocaron en el sistema y se hicieron las mediciones a 28 °C de temperatura. Las soluciones se añadieron simultáneamente a los 96 pocillos utilizando un sistema de fluidos integrados: HBSS (control basal), agonista de referencia a 100 nM (control estimulado), agonista de referencia (determinación de EC₅₀) o los compuestos de prueba. Las mediciones de impedancia se controlan durante 10 minutos después de añadir el ligando. El agonista de referencia estándar es la epinefrina, que se prueba en cada experimento a varias concentraciones para generar una curva de concentración-respuesta a partir de la cual se calcula el valor de EC₅₀.

Los datos de la dosis-respuesta de los compuestos de prueba se analizaron con el software Hill utilizando el análisis de regresión no lineal de las curvas de concentración-respuesta generadas con valores medios replicados usando el ajuste de la curva de la ecuación de Hill. Los resultados se presentan en la tabla 1. Se considera que los compuestos con EC₅₀ y 33,3 µM no tienen ninguna actividad adrenérgica alfa-2 significativa.

1.7 Modelo *in vitro* de la esclerosis múltiple: Oligodendrocitos de ratones lesionados con interferón-gamma cocultivados con neuronas

60 Cultivo de oligodendrocito cocultivados con neuronas

Las neuronas/OPC se cultivaron como lo ha descrito anteriormente Yang *et al.* (2005 J Neurosci Methods;149(1) pp50-6) con modificaciones. En resumen, se retiró el cerebro completo (sin cerebelo) obtenido de embriones de ratas viejas de 17 días de vida (Wistar, Janvier labs). Los cerebros fueron tratados durante 20 min a 37 °C con una solución de tripsina-EDTA (Pan Biotech) a una concentración final de un 0,05 % de tripsina y un 0,02 % de EDTA. La disociación

se interrumpió mediante la adición del medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/litro de glucosa (Pan Biotech), que contenía DNase I grado II (concentración final 0,5 mg/ml; Pan Biotech, lote: h140508) y un 10 % de suero fetal bovino (FCS; Invitrogen, lote: 41Q7218K). Las células se disociaron mecánicamente mediante tres pasos forzados a través de la punta de una pipeta de 10 ml. Luego, las células se centrifugaron a 515 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se volvió a suspender en un medio de cultivo definido que consistía en un medio neurobasal (Invitrogen, lote: 1636133) con una solución del 2 % de suplemento B27 (Invitrogen, lote: 1660670), 2 mmol/litro de L-glutamina (Pan Biotech), el 2% de solución de PS y el 1 % de FCS y 10 ng/ml de plaquetas derivadas del factor de crecimiento (PDGF-AA, lote: H131205). Las células se sembraron a una densidad de 20 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos revestidas de PLL (BD corning, lote: 6614022) y laminina (Sigma, lote: 083M4034V). Las láminas se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada, en una atmósfera de aire de (95 %)-CO₂ (5 %). La mitad del medio se cambió por un medio fresco cada 2 días. A los 18 días se preincubaron los compuestos de prueba 1 hora antes de la aplicación del interferón-gamma (70 U/ml, 48H, R&D system, lote: AAL2214081).

15 **Exposición de los compuestos de prueba y el interferón gamma**

El día 18 del cultivo, los compuestos de prueba (4 concentraciones) se disolvieron en un medio de cultivo y se preincubaron con oligodendrocito cocultivado con neuronas durante 1 hora antes de la aplicación del interferón-gamma (70 U/ml, 48H). Una hora después de la incubación de los compuestos de prueba, se añadió el interferón gamma a una concentración de 70 U/ml durante 48 h todavía en presencia de los compuestos de prueba. Luego, las células se fijaron con una solución fría de etanol (95 %, Sigma, lote: SZBD3080V) y ácido acético (5 %, Sigma, lote: SZBD1760V) 5 min a -20 °C. Tras la permeabilización con un 0,1 % de saponina (Sigma, lote: BCBJ8417V), las células se incubaron durante 2 h con anticuerpo monoclonal anti-O4 producido en el ratón (Sigma, lote: SLBF5997V) a una dilución de 1/1000 en PBS (PAN, lote: 8410813) que contenía un 1 % de FCS, un 0,1 % desaponina de 0,1%, durante 2 h a temperatura ambiente. Este anticuerpo se reveló con IgG de cabra antirratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen, lote: 1664729) a una dilución de 1/400 en PBS que contenía un 1 % de FCS, un 0,1 % de saponina, durante 1 h a temperatura ambiente.

30 **Análisis del número total de células O4**

Para cada condición, se hicieron 30 fotos por pocillo usando ImageXpress (dispositivo molecular) con una ampliación de 20x. Todas las imágenes se capturaron en las mismas condiciones. El análisis del número total de células O4 se realizó automáticamente utilizando el editor de módulos personalizados (dispositivo molecular). Los datos se expresaron en porcentajes de condiciones de control (sin intoxicación, sin interferón-gamma = 100 %) con el fin de expresar el daño del interferón gamma. Todos los valores se expresaron como media + /-SEM (media s. e.) (n = 6 pocillos por condición).

40 **1.8- Modelo in vitro de la enfermedad de Parkinson Neuronas de ratas mesencefálicas primarias lesionadas con rotenona**

Cultivo de neuronas dopaminérgicas mesoencefálicas

Se cultivaron neuronas dopaminérgicas de rata según lo descrito por Schinelli *et al.*, (1988 J. Neurochem 50 pp1900-07) y Visanji *et al.*, (2008 FASEB J. 22(7) pp2488-97). En resumen, los mesencéfalos obtenidos de embriones de ratas de 15 días de vida (Janvier Labs, France) se diseccionaron al microscopio. Los mesencéfalos embrionarios se retiraron y se colocaron en un medio helado de Leibovitz (L15, Pan Biotech, lote: 9310614) que contenía un 2 % de penicilina-estreptomycin (PS, Pan Biotech, lote: 1451013) y un 1 % de albúmina de suero bovino (BSA, Pan Biotech, Batch: h140603). La porción ventral de la flexión mesencefálica, una zona del cerebro en desarrollo rica en neuronas dopaminérgicas, se utilizó para las preparaciones de las células.

El mesocéfalo se disoció por tripsinización durante 20 minutos a 37 °C (0,05 % de tripsina y 0,02 %, de EDTA, PanBiotech, lote: 5890314). Se detuvo la reacción mediante la adición del medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM, PanBiotech, lote: 1300714) que contenía DNase I grado II (0,1 mg/ml, PanBiotech, lote: H140508) y un 10 % de suero fetal bovino (FCS, Gibco, lote: 41Q7218K). Luego, las células se disociaron mecánicamente mediante tres pasos a través una pipeta de 10 ml. Las células se centrifugaron a 180 x g durante 10 minutos a +4 °C en una capa de BSA (3,5 %) en un medio L15. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular sedimento se volvió a suspender en un medio cultivo definido que consistía en un medio neurobasal (Invitrogen, lote: 1636133) suplementado con B27 (2 %, Invitrogen, lote: 1660670), L-glutamina (2mM, PanBiotech, lote: 8150713), un 2 % de solución PS, 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, PanBiotech, lote: H140108) y 1 ng/ml de factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF, Pan Biotech, lote: H130917). El conteo de células viables se realizó en un citómetro Neubauer utilizando el test de exclusión de azul tripán. Las células se sembraron con una densidad de 40 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con poli-L-lisina (Corning Biocoat, lote: 6614022) y se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C en una atmósfera de un 5 % de CO₂, un 95 % de aire. La mitad del medio se cambió por un medio fresco cada 2 días.

El día 6 de cultivo, el medio se retiró y se añadió uno nuevo, con o sin rotenona (Sigma, lote: 021M2227V) diluida a 10 nM en medio controlado. Se evaluaron 3 pocillos por condición. Los compuestos de prueba se disolvieron en el medio de cultivo y luego se preincubaron con neuronas mesencefálicas durante 1 hora antes de aplicar la rotenona. Tras 24 horas de intoxicación, las células se fijaron con una solución del 4 % de paraformaldehído (Sigma, lote SLBF7274V) en PBS (Pan Biotech, lote: 4831114), pH = 7.3 durante 20 min. a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las células dos veces en PBS, se permeabilizaron y se bloquearon zonas no específicas con una solución de PBS con un 0,1 % de saponina (Sigma, lote: BCBJ8417V) y un 1 % de FCS durante 15 min. a temperatura ambiente. Después las células se incubaron con anticuerpos hidroxilasa antitirosina monoclonales producidos en ratones (TH, Sigma, lote: 101M4796) a una dilución de 1/10 000 en PBS que contenía un 1 % de FCS, un 0,1 % de saponina, durante 2 horas a temperatura ambiente. Este anticuerpo se reveló con IgG de cabra antirratón Alexa Fluor 488 (sondas moleculares, lote: 1531668) a una dilución de 1/800 en PBS que contenía un 1 % de FCS, un 0,1 % de saponina, durante 1 h a temperatura ambiente.

Análisis del número total de neuronas TH positivas

Los cultivos inmunomarcados se examinaron automáticamente con ImageXpress (dispositivo molecular de EEUU). Para cada condición, se analizaron automáticamente 20 campos por pocillo (lo que representaba ~80 % de la superficie total del pocillo) de 3 pocillos. El número total de neuronas TH se analizó automáticamente con el editor de módulos personalizado (dispositivos moleculares, EEUU). Los datos se expresaron en porcentajes de las condiciones de control (sin intoxicación, sin rotenona = 100 %) con el fin de expresar el daño de la rotenona. Todos los valores se expresaron como media +/- SEM (media s. e.) de 1 cultivo (n = 3 pocillos por condición y por cultivo).

1.9 Modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer: Neuronas de rata corticales primarias lesionadas beta-amiloide 1-42.

Cultivo de neuronas corticales de rata

El cultivo de neuronas corticales de ratón se realizó siguiendo la descripción de Singer *et al.*, (1999 J. Neuroscience 19 pp2455-63) and Callizot *et al.*, (2013 J.Neurosci. Res. 91 pp706-16). Se mató a hembras embarazadas (Wistar; Janvier Labs) en el 15º día de gestación por dislocación cervical. Se recogieron los fetos y se colocaron inmediatamente en un medio de hielo L15 Leibovitz (Pan Biotech, lote: 9310614) en una solución con un 2 % de penicilina (10 000 U/ml) y estreptomina (10 mg/ml) (PS; Pan Biotech, lote: 1451013) y un 1 % de albúmina de suero bovino (BSA; Pan Biotech, lote: h140603). El córtex se trató durante 20 min. a 37 °C con una solución de tripsina/EDTA (Pan Biotech, lote: 5890314) a una concentración final del 0,05 % de tripsina y el 0,02 % de EDTA. La disociación se detuvo añadiendo el medio modificado de Eagle de Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/litro de glucosa (Pan Biotech, lote: 1300714), que contenía DNase I grado II (concentración final de 0,5 mg/ml; Pan Biotech, lote: h140508) y un 10 % de suero fetal bovino (FCS; Invitrogen, lote: 41Q7218K). Las células se disociaron mecánicamente mediante tres pasos forzados a través de la punta de una pipeta de 10 ml. Luego, las células se centrifugaron a 515 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se volvió a suspender en un medio de cultivo definido que consistía en un medio neurobasal (Invitrogen, lote: 1636133) con una solución del 2 % de suplemento B27 (Invitrogen, lote: 1660670), 2 mmol/litro de L-glutamina (Pan Biotech, lote: 8150713), un 2 % de solución PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, PanBiotech, lote: H140108). Las células viables se contaron en un citómetro Neubauer mediante el test de exclusión de azul tripán Las células se sembraron a una densidad de 30 000 por pocillo en placas de 96 pocillos previamente recubiertos con poli-L-lisina (Corning Biocoat, lote: 6614022) y se cultivaron a 37 °C en una incubadora de aire de (95 %)-CO₂ (5 %). El medio se cambió cada 2 días. Las neuronas corticales se intoxicaron con las soluciones A-beta (véase más adelante) tras 11 días de cultivo.

Compuestos de prueba y exposición beta-amiloide 1-42

El preparado beta-amiloide 1-42 se realizó siguiendo el siguiente procedimiento descrito por Callizot *et al.*, 2013. En resumen, el péptido beta-amiloide 1-42 (Bachem, lote: 1014012) se disolvió en el medio de cultivo definido, sin suero, a concentración inicial de 40 µmol/litro. Esta solución se agitó durante tres días a 37 °C en la oscuridad y se utilizó inmediatamente después de su correcta disolución en el medio de cultivo a las concentraciones utilizadas. Los compuestos de prueba se disolvieron en el medio de cultivo y luego se preincubaron con neuronas corticales primarias durante 1 hora antes de aplicar el beta-amiloide 1-42. El preparado beta-amiloide 1-42 se añadió a una concentración final de 20 µM (incluyendo hasta ~2 µM de oligómeros tóxicos medios por WB) diluida en un medio de control en presencia de fármacos. Después de 24 horas de intoxicación, las células se fijaron con una solución fría de etanol (95 %, Sigma, lote: SZBD3080V) y ácido acético (5 %, Sigma, lote: SZBD1760V) 5 min a -20 °C. Tras la permeabilización con un 0,1 % de saponina (Sigma, lote: BCBJ8417V), las células se incubaron durante 2 horas con proteína asociada a antimicrotúbulos de anticuerpos monoclonales de ratón 2 (MAP-2; Sigma, lote: 063M4802) a una dilución de 1/400 en PBS (Pan biotech, lote: 4831114) con un 1 % de suero fetal bovino (Invitrogen, lote: 41Q7218K) y 0,1 % de saponina. Este anticuerpo se reveló con IgG de cabra antirratón Alexa Fluor 488 (sonda molecular, lote: 101M4796) a una dilución de 1/400 en PBS con un 1 % de suero fetal bovino y un 0,1 % de saponina, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Análisis del número total de neuronas

Los cultivos inmunomarcado se examinaron automáticamente con ImageXpress (dispositivo molecular de EEUU) con una ampliación de x20. Para cada condición, se analizaron automáticamente 30 campos por pocillo (lo que representaba ~80 % de la superficie total del pocillo) de 3 pocillos. El número total de neuronas se analizó automáticamente con el editor de módulos personalizado (dispositivos moleculares, EEUU). Los datos se presentaron en porcentaje de condiciones de control (sin intoxicación, sin beta-amiloide 1-42 = 100 %) con el fin de exponer el daño A-beta 1-42. Todos los valores se presentaron como media +/- SEM (media s. e.) (n = 3 pocillos por condición y por cultivo).

1.10 Modelo in vitro de leucodistrofia (PMD): Sobreexpresión del PLP1 y la DM20 mutantes en la estirpe celular humana

Un día antes de la transfección, las células 293T se colocaron en placas a 300 000 células/mL. Las células 293T se transfectaron con construcciones mutantes de PLP1 y DM20 utilizando lipofectamina 2000 siguiendo el procedimiento del fabricante. Tras la transfección, las células se trataron con moléculas o se dejaron sin tratar. Como control, las células se transfectaron con las formas originales de las proteínas. 48 horas más tarde se recolectaron los lisados celulares. La acumulación de proteínas se evaluó por western-blot.

1.11 Modelo in vitro de diabetes de tipo 2: líneas celulares Min6 y INS1**Citoprotección del estrés del retículo endoplasmático**

Las células se colocaron en placas de 96 pocillos con una densidad de $0,5 \cdot 10^6$ células/mL para la estirpe celular Min6, $0,4 \cdot 10^6$ células/mL para la línea celular INS1 el día anterior al tratamiento. El estrés del retículo endoplasmático se provocó añadiendo 2,5 µg/mL de tunicamicina (Sigma Aldrich) junto con inhibidores de fosfatasa. Los medios se cambiaron 6 horas más tarde por otros nuevos y la citoprotección se mantuvo añadiendo inhibidores de fosfatasa. Se evaluó la viabilidad de las células midiendo la reducción de WST-8 en formazán utilizando el Kit-8 de recuento de células (Sigma), siguiendo las recomendaciones del proveedor, 72 horas después del tratamiento con tunicamicina.

Protección contra la acumulación de insulina con tendencia a un mal plegamiento en Akita

Las células Min6 se nucleofectaron con construcciones mutantes de insulina^{enAkita} y se sembraron en placas de 96 pocillos a 300 000 células/mL y, 24 horas después, las células fueron tratadas con moléculas o se dejaron sin tratar. Como control, las células se nucleofectaron con plásmido no relevante. 6 días más tarde, se añadió un agente selectivo (G418). Se evaluó la viabilidad de las células midiendo la reducción de WST-8 en formazán utilizando el Kit-8 de recuento de células siguiendo las recomendaciones del proveedor, 9 días después del tratamiento.

1.12- Modelo in vitro de enfermedad inflamatoria/infecciosa: Fibroblastos embrionarios de ratón inducidos por el poli-I:C**Protocolos experimentales**

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) fueron lipofectados con poli-I:C y tratados con dos concentrados de compuestos de la invención (25 µM) durante 6 h. Después de 6 h de cultivo, la fosforilación del eIF2alfa (eIF2a-P) y la expresión del PPP1R15A (GADD34) se monitorizó mediante el método western blotting, mientras que la producción de interferón (IFN)-beta de tipo I se cuantificó en sobrenadantes de cultivo con el método ELISA. El control (nt) y poli-I:C/DMSO son controles negativo y positivo, respectivamente. El poli-I:C (ácido polinosínico policitidílico o sal sódica del ácido polinosínico policitidílico) es un inmunoestimulante que se utiliza para estimular las infecciones virales. El poli-I:C, que tiene una estructura similar a la del ARN bicatenario, es conocido por interactuar con el receptor 3 tipo toll que se expresa en los compartimentos intracelulares de células B y células dendríticas. El guanabenz (25 µM) se ha utilizado como compuesto inhibidor de referencia.

Cultivo celular

Los MEF se cultivaron en DMEM, el 10 % FCS (HyClone, Perbio), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 2 mM de glutamina, 1 aminoácido no esencial MEM y 50 µM 2-mercaptoetanol. Los MEF fueron tratados durante el tiempo indicado con 10 µg/ml de poli-I:C (InvivoGen) en combinación con lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Inmunotransferencia

Las células fueron lisadas en un 1 % de Tritón X-100, 50 mM de HEPES, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de MgCl₂, 2 mM de EDTA y un 10 % de glicerol, suplementado con comprimidos Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche). La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de proteínas BCA (Pierce). Se cargaron 25-50 µg de material soluble de Tritón X-100 sobre un gradiente del 2 %-12 % o el 8 % de SDS-PAGE antes de inmunotransferencia y la detección de la quimioluminiscencia (sustrato quimioluminiscete SuperSignal West Pico, Pierce). Los anticuerpos

policlonales de conejo que reconocen el GADD34 (C-19) eran de Santa Cruz Biotechnology y los anti-eIF2alpha[pS⁵²] eran de Invitrogen.

Elisa

5 El conteo del IFN-beta en los sobrenadantes de cultivo se realizó utilizando el kit Mouse Interferón Beta ELISA (fuente de interferones PBL) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.13 Apoptosis inducida por la hipoxia en cardiomiocitos de ratas neonatales cultivados

Cultivo celular

10 Los cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatales se obtuvieron de los ventrículos de ratas Sprague Dawley de 1 día de vida (Janvier, Francia). Las ratas fueron eutanizadas y sus corazones extirpados. Los corazones se cortaron en trozos pequeños (1-2 mm³) y fueron digeridos enzimáticamente utilizando la rata del kit de disociación de corazones neonatales y el disociador gentleMACS™ (MiltenyiBiotec, Alemania). Tras la disociación, se filtraron los homogenatos (70 µm) para obtener una suspensión de una única célula. Las células aisladas se obtuvieron por centrifugación y se volvieron a suspender en el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene un 10 % de suero de caballo (HS), un 5 % de suero bovino fetal (FBS) y un 1 % de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se enriquecieron con miocitos mediante la distribución previa en placas durante 90 min para agotar la población de no miocitos. Las células no ligadas fueron distribuidas en placas de 6 o 96 pocillos a una densidad de células adecuada. Las células fueron cultivadas a 37 °C en el 95 % de aire/5 % de CO₂ durante 24 h. Luego el medio de cultivo se cambió por DMEM fresco que contenía el 1 % de FBS y distintas concentraciones del compuesto de prueba treinta minutos antes de la incubación en una cámara de cultivo normal o hipóxica (N₂/CO₂, 95 %/5 %; 0,3 % O₂).

Tratamiento con el compuesto de prueba

25 Los cardiomiocitos de ratas neonatales purificados fueron inoculados en una placa de 96 pocillos a 10⁶ células/2 mL para los experimentos de citometría de flujo. Después de 24 horas, los cardiomiocitos fueron tratados con distintos concentrados del compuesto de prueba en un medio de cultivo con el 0,1 % de DMSO. Las células de los controles positivos fueron tratadas con un medio de cultivo (0,1 % de DMSO). Treinta minutos después de empezar los tratamientos, las células fueron incubadas en la cámara de cultivo hipóxica (N₂/CO₂, 95 %/5 %; O₂ final medido: 0,3 %) durante 36 horas. Las células de los controles negativos se dejaron en condiciones normóxicas a 37 °C con un medio de cultivo (1 % de FBS, 0,1 % de DMSO) durante los mismos periodos de tiempo.

35 **Medición de las células apoptóticas**

Al final del periodo de tratamiento, se realizó la citometría de flujo para medir la cantidad de células apoptóticas. Se utilizó el kit de detección de apoptosis de isotiocianato de fluoresceína (FITC) de anexina V. Las células se lavaron dos veces con PBS y volvieron a suspenderse en una solución de unión. Se añadió FITC de anexina V y yoduro de propidio de acuerdo con el protocolo del fabricante. La mezcla se incubó durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente y luego se midió la fluorescencia celular mediante una citometría de flujo de escáner FACS.

45 **2. RESULTADOS**

2.1 Citoprotección y selectividad del compuesto

Los resultados de los distintos ensayos se realizaron con los compuestos seleccionados de la invención que se muestran en la siguiente tabla 1. Como ejemplo, la figura 1 representa el efecto citoprotector del compuesto 12 después del estrés inducido por una exposición de tunicamicina.

Tabla 1:

Compuesto n.º	Comparación de la citoprotección del estrés del retículo endoplasmático con el guanabenz	Ensayo de receptores alfa2-adrenérgicos funcionales
1	+	
2	+	
3	+	
4	++	
5	+	
6	++	EC50 y 33,3 µM

7	+	
8	+	
9	+	
10	++	EC50 y 33,3 µM
11	+++	EC50 > 0,7µM
12	+++	EC50 y 33,3 µM
13	++	EC50 y 33,3 µM
14	++	
15	++	EC50 y 33,3 µM
16	+	EC50 y 33,3 µM
17	+++	EC50 y 33,3 µM
19	+++	
21	++	
23	++	

2.2 Esclerosis múltiple

5 La figura 2 muestra la protección dependiente de la dosis de los oligodendrocitos de ratas heridas de interferón gamma mediante los compuestos 11, 12 y 17 de la invención. Estos datos muestran que los compuestos de esta invención son un prometedor tratamiento efectivo de la esclerosis múltiple.

10 2.3 Enfermedad de Parkinson (PD)

La figura 3 muestra la protección dependiente de la dosis de las neuronas de ratas mesencefálicas primarias heridas de rotenona mediante los compuestos 5, 11 y 12 de la invención.

15 Estos datos muestran que los compuestos de esta invención son un prometedor tratamiento efectivo de las sinucleinopatías y más específicamente de la enfermedad de Parkinson.

2.4 Alzheimer (AD) y amiloidosis

20 La figura 4 muestra la protección dependiente de la dosis de las neuronas corticales primarias de ratas heridas de beta-amiloide 1-42 mediante el compuesto 12 de la invención. Estos datos muestran que los compuestos de esta invención son un prometedor tratamiento efectivo para la amiloidosis y más específicamente para el Alzheimer.

25 2.5 Leucodistrofia: Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (PMD),

Según la descripción, las mutaciones T181P y L223P en proteínas PLP1 y DM20 provocan un fenotipo grave de la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (Strautnieks *et al.* 1992, Am. J. Hum. Genet. 51 (4): 871–878; Gow and Lazzarini, 1996 Nat Genet. 13(4):422-8).

30 Los compuestos 12 y 17 de la invención (5 microM) son capaces de prevenir la acumulación de la proteína DM20 mutada en T181P expresada en la célula humana 293T (figura 5).

Estos datos muestran que los compuestos de esta invención, específicamente los compuestos 12 y 17, prometen ser un tratamiento eficaz de trastornos desmielinizantes como las leucodistrofias, más concretamente la PMD.

35 2.6 Diabetes de tipo 2

La figura 6 presenta los resultados de la sobreexpresión de la preproinsulina con una mutación Akita en células Min6 con el compuesto 16 de la invención.

A distintas concentraciones, los compuestos 12, 16 y 17 previenen la muerte celular del insulinoma de Min6 asociado a la acumulación de proteínas mal plegadas inducidas por 6 horas de exposición a la tunicamicina (figura 7).

40 A distintas concentraciones, los compuestos 11, 12, 16 y 17 previenen la muerte celular del insulinoma INS1 asociado a la acumulación de proteínas mal plegadas inducidas por 6 horas de exposición a la tunicamicina (figura 8).

Estos datos muestran que los compuestos de esta invención prometen un tratamiento eficaz de la prediabetes y la diabetes, preferiblemente de la prediabetes de tipo 2 y la diabetes de tipo 2.

45 2.7 Condiciones inflamatorias no infecciosas o relacionadas con la infección

La respuesta normal de las MEF al poli I:C se caracteriza por la expresión de la PPP1R15A, que aumenta en eIF2alpha-P (variable en el tiempo y relacionada con los niveles de expresión de la PPP1R15A) mediante la activación de la PKR y la producción de IFN de tipo 1 (amplitud de 500 a 700 pg/ml). Eliminación de la PPP1R15A -/- las MEF

50 no pueden producir esta citoquina en respuesta al poli I:C.

La potencia de los compuestos de la invención para inhibir la PPP1R15A se evaluó midiendo el aumento de la fosforilación eIF2alpha, la disminución de manifestación de la PPP1R15A debido a su propia inhibición farmacológica dando lugar a la inhibición general de la síntesis proteica y la producción de IFN de tipo 1.

5 Los compuestos evaluados de la invención resultaron ser eficaces a 25 μ M para aumentar la fosforilación de eIF2alpha, disminuir la expresión de la PPP1R15A y prevenir la producción de IFN de tipo 1. La figura 9 muestra la capacidad de los compuestos 6, 10, 11, 12, 15, 16 y 17 (a 25 microM) para prevenir la producción de IFN de tipo 1 en fibroblastos embrionarios de ratón lipoinfectados con poli I:C.

Estos datos muestran que los compuestos de esta invención prometen ser un tratamiento eficaz de las enfermedades inflamatorias no infecciosas o relacionadas con la infección.

10

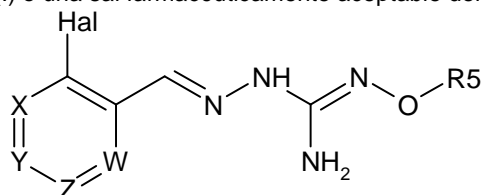
2.8 Isquemia cardíaca

El compuesto 10 de la invención protege los cardiomiocitos de rata neonatal cultivados de la apoptosis inducida por la hipoxia (figura 10). Estos datos muestran que los compuestos de esta invención prometen ser un tratamiento eficaz de la isquemia, en particular la isquemia cardíaca.

15

REIVINDICACIONES

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



5

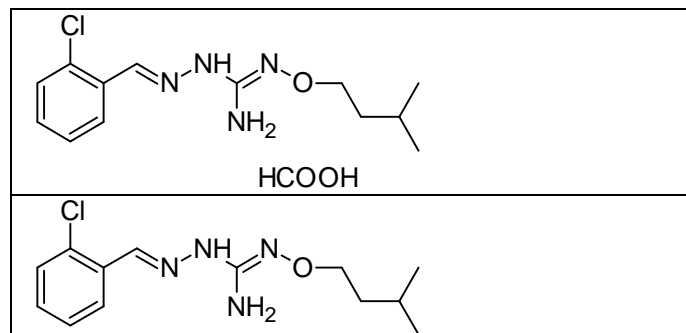
(I)

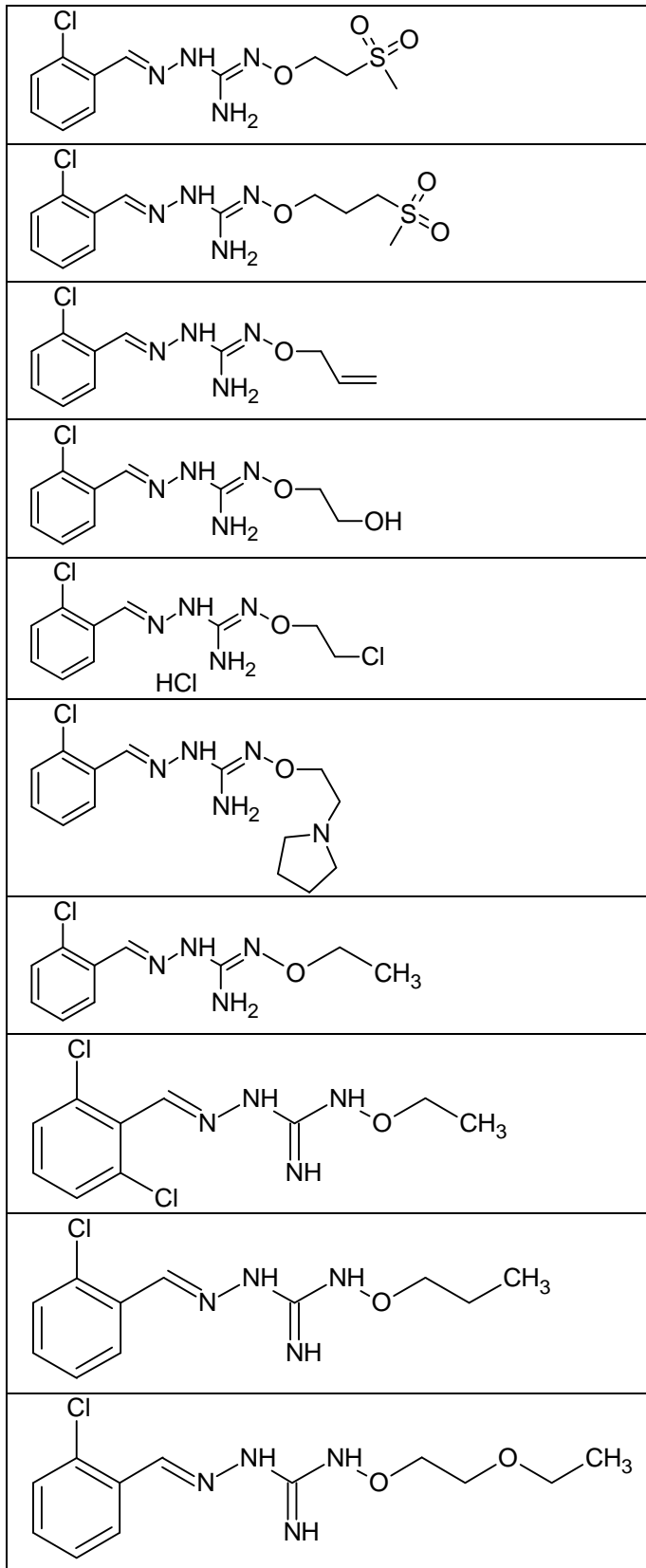
en el que:

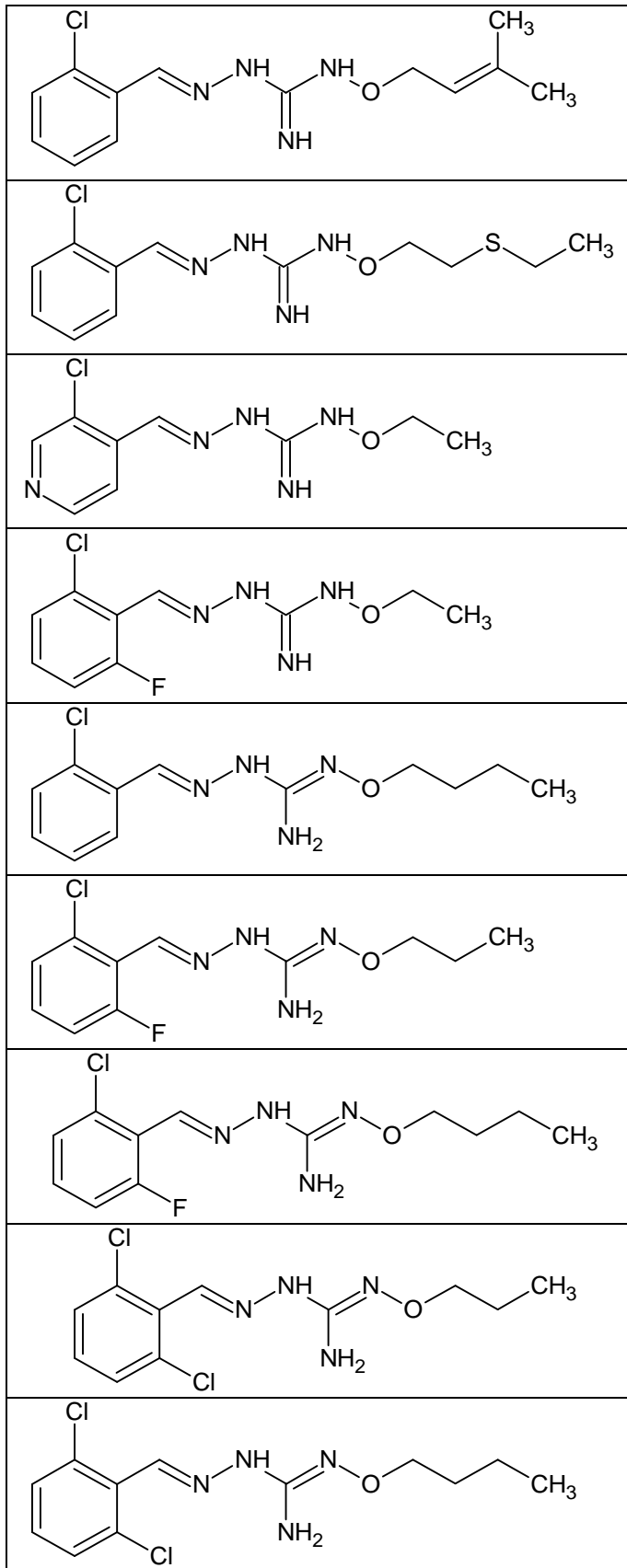
Hal = F, Cl, Br, I

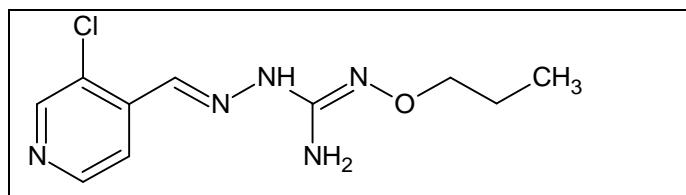
- 10 X es $-\text{CR}_1=$ o $-\text{N}=\text{}$,
 Y es $-\text{CR}_2=$ o $-\text{N}=\text{}$,
 Z es $-\text{CR}_3=$ o $-\text{N}=\text{}$,
 W es $-\text{CR}_4=$ o $-\text{N}=\text{}$,
 R1 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;
 15 R2 se selecciona de entre H, Hal, alquilo, O-alquilo y C(O)R6;
 R3 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;
 R4 es H, Cl, F, I o Br;
 R5 es alquilo, cicloalquilo, aralquilo, alquenoilo, cicloalquenoilo, heterociclilo, arilo, C(O)-alquilo y C(O)-arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7;
 20 R6 se selecciona de OH, O-alquilo, O-arilo, aralquilo, NH_2 , NH-alquilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, CF_3 , alquilo y alcoxi; cada R7 está independientemente seleccionado de entre halógeno, OH, CN, COO-alquilo, aralquilo, heterociclilo, S-alquilo, SO-alquilo, SO_2 -alquilo, SO_2 -arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH_2 , NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF_3 , alquilo y alcoxi, o un tautómero del mismo.
- 25 2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Hal es Cl.
3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que X es $-\text{CR}_1=$ y R1 es H o F.
- 30 4. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Y es $-\text{CR}_2=$ y R2 es H o F.
5. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z = $-\text{CR}_3=$ y R3 es H o F.
- 35 6. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que W = $-\text{CR}_4=$ y R4 es H, Cl o F.
7. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R5 se elige de entre alquenoilo o alquilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7 elegidos de entre halógeno, OH, heterocíclico, S-alquilo, SO-alquilo, SO_2 -alquilo, Oalquilo.
- 40 8. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado de entre los siguientes:

45



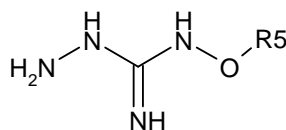






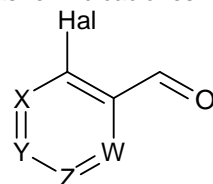
o un tautómero del mismo
o una sal aceptable del mismo

- 5 9. Proceso para preparar un compuesto de la fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, que comprende la etapa de reaccionar un compuesto de la fórmula (A):



(A)

- 10 en el que R5 se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, con un compuesto de la fórmula (B) :

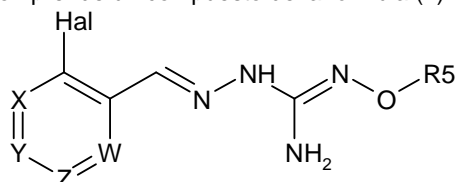


(B),

en el que X, Y, Z, W y Hal se definen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8.

- 15 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una etapa adicional de purificación.

11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (II):



(II)

- 20 en la que:
Hal = F, Cl, Br, I
X es -CR1= o -N=,
Y es -CR2= o -N=,
25 Z es -CR3= o -N=,
W es -CR4= o -N=,
R1 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;
R2 se selecciona de entre H, Hal, alquilo, O-alquilo y C(O)R6;
R3 se selecciona de entre H, Hal, alquilo y O-alquilo;
30 R4 es H, Cl, F, I o Br;
R5 es alquilo, cicloalquilo, aralquilo, alquenilo, cicloalquenilo, heterociclilo, arilo, C(O)-alquilo y C(O)-arilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente con uno o más grupos R7;
R6 se selecciona de OH, O-alquilo, O-arilo, aralquilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, NH-arilo, CF₃, alquilo y alcoxi;
35 cada R7 está independientemente seleccionado de entre halógeno, OH, CN, COO-alquilo, aralquilo, heterociclilo, SO-alquilo, SO₂-alquilo, SO₂-arilo, COOH, CO-alquilo, CO-arilo, NH₂, NH-alquilo, N(alquilo)₂, CF₃, alquilo y alcoxi;
o un tautómero del mismo
con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
40 12. Composición de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el compuesto (II) es un compuesto de la fórmula (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

13. Compuesto de la fórmula (II) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo de las tauopatías elegidas entre la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la degeneración lobar frontotemporal o la demencia (FTD) (la enfermedad de Pick); las sinucleinopatías elegidas de entre la enfermedad de Parkinson, la demencia con cuerpos de Lewy, el fallo autonómico puro y la atrofia sistémica múltiple; las enfermedades relacionadas con la poliglutamina y la polialanina elegidas de entre la enfermedad de Huntington, la atrofia muscular espinobulbar (o la enfermedad de Kennedy), la atrofia dentatorubro-pálidoluisiana, la degeneración espinocerebelosa de tipo 1, la degeneración espinocerebelosa de tipo 2, la degeneración espinocerebelosa de tipo 3 (o enfermedad de Machado-Joseph), la degeneración espinocerebelosa de tipo 6, la degeneración espinocerebelosa de tipo 7 y la degeneración espinocerebelosa de tipo 17, la distrofia muscular oculofaríngea; los trastornos desmielinizantes como las leucodistrofias, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y la esclerosis múltiple, la fibrosis quística, el lupus eritematoso sistémico, la colitis, la colitis ulcerosa, la enfermedad intestinal inflamatoria, la pancreatitis, la sepsis, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), cánceres, diabetes, esclerosis latera amiotrófica, las seipinopatías, los trastornos en el almacenamiento lisosomal, enfermedades de amiloidosis, la inflamación, los trastornos metabólicos y los trastornos cardiovasculares elegidos de la adiposidad, la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia familiar, la obesidad, la aterosclerosis, la hipertensión, las enfermedades del corazón, la isquemia cardíaca, la apoplejía, el infarto de miocardio, la constricción transaórtica, el accidente vascular; la osteoporosis, el traumatismo en el sistema nervioso, la isquemia, la osteoporosis, las enfermedades retinales elegidas entre la retinosis pigmentaria, las ciliopatías retinales, el glaucoma, la degeneración macular y el envejecimiento.

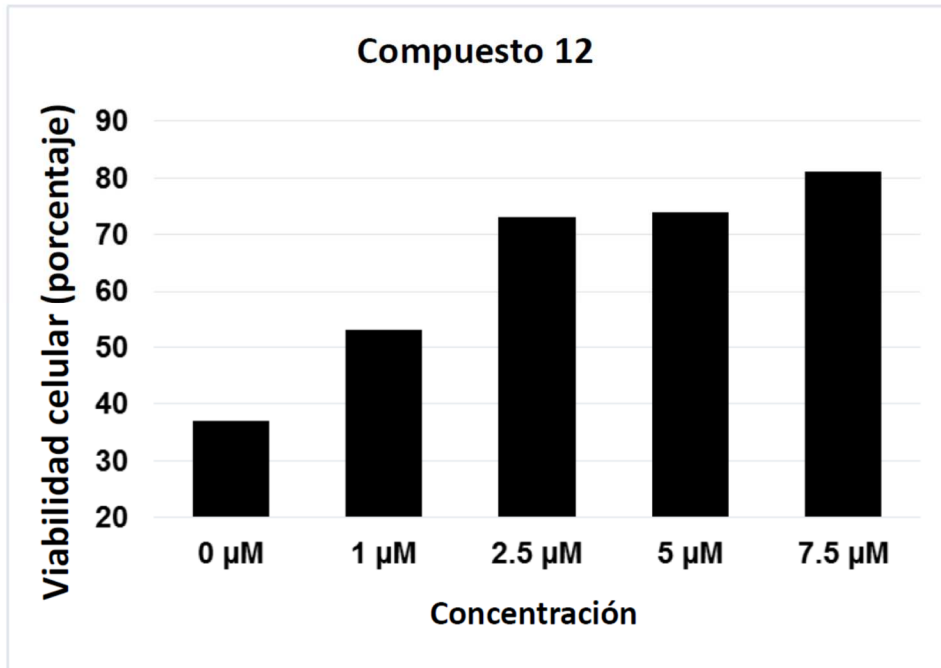


Fig. 1

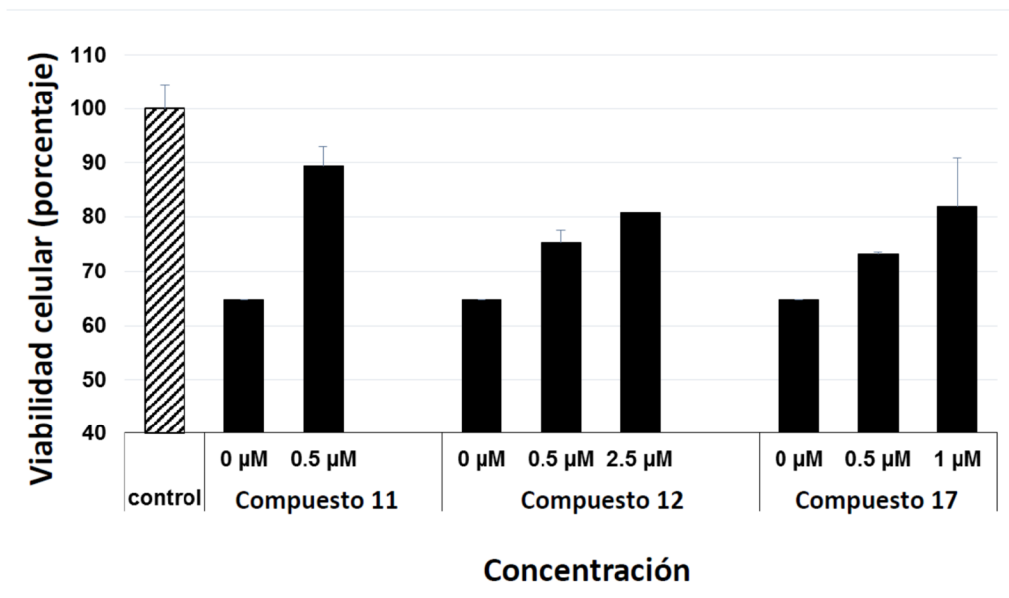


Fig. 2

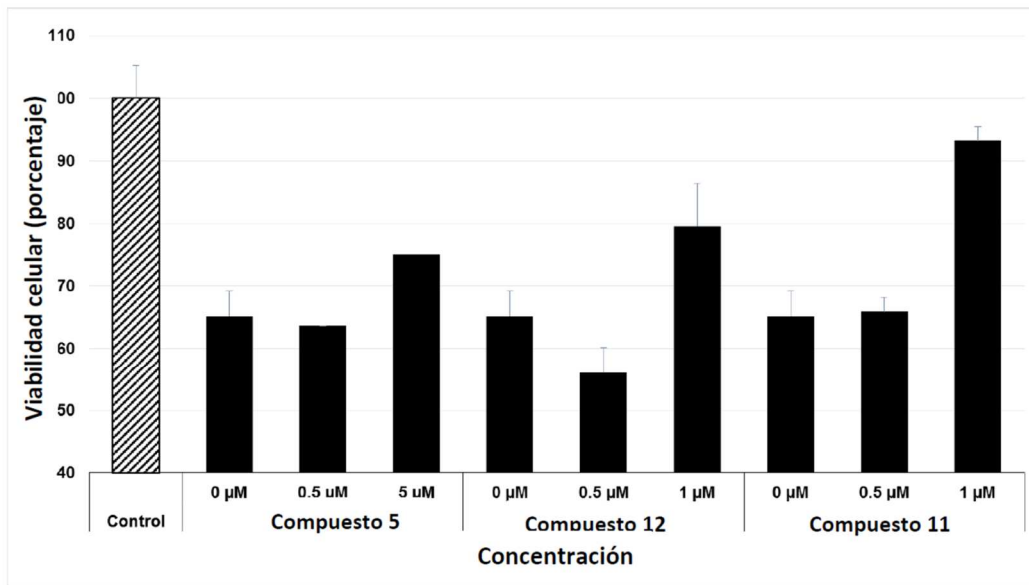


Fig. 3

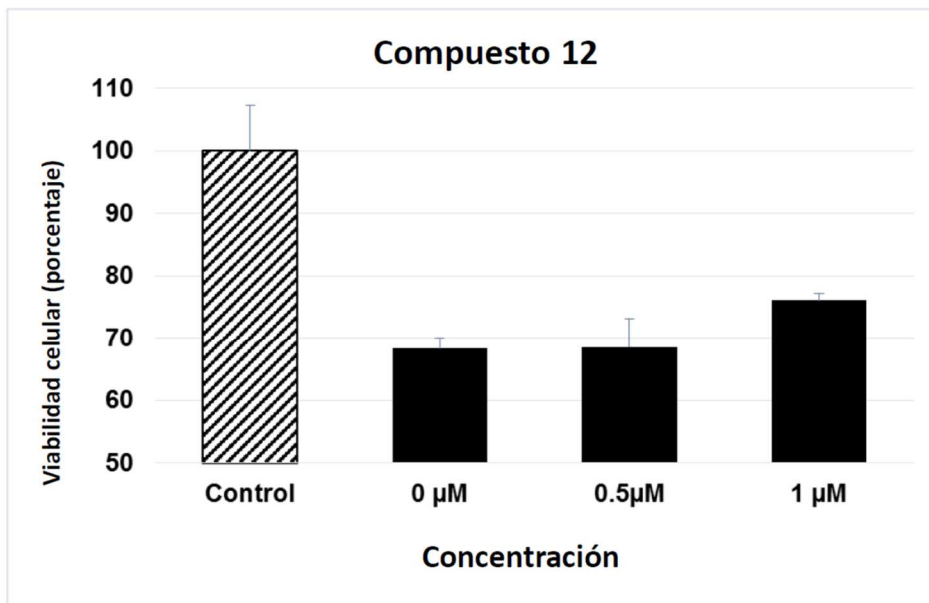


Fig. 4

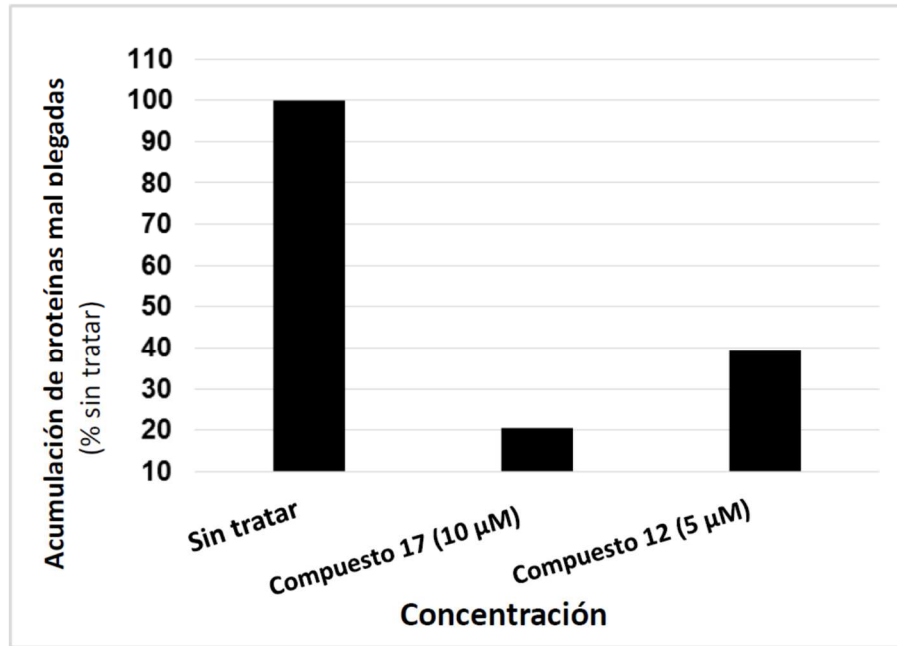


Fig. 5

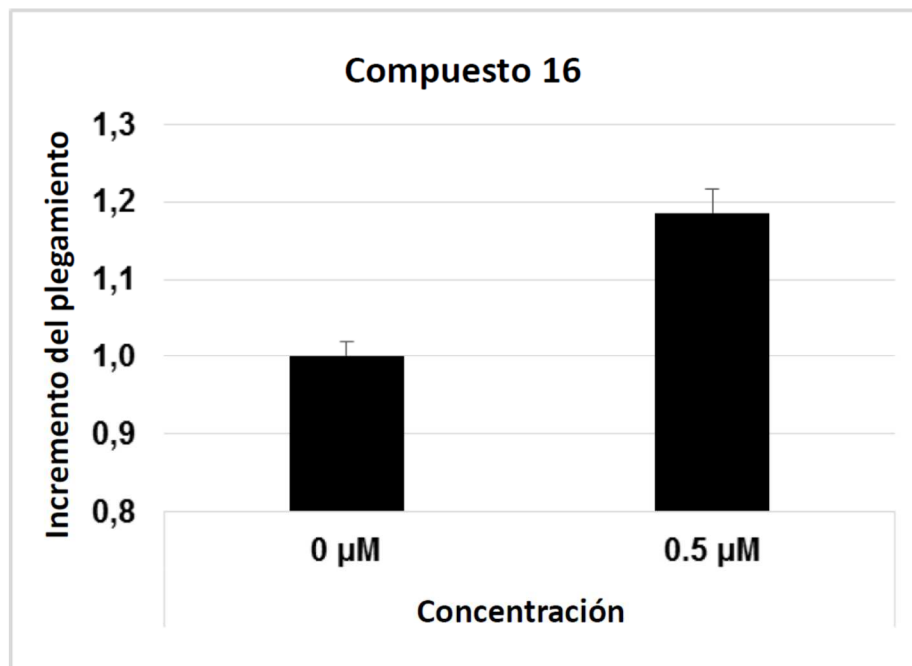


Fig. 6

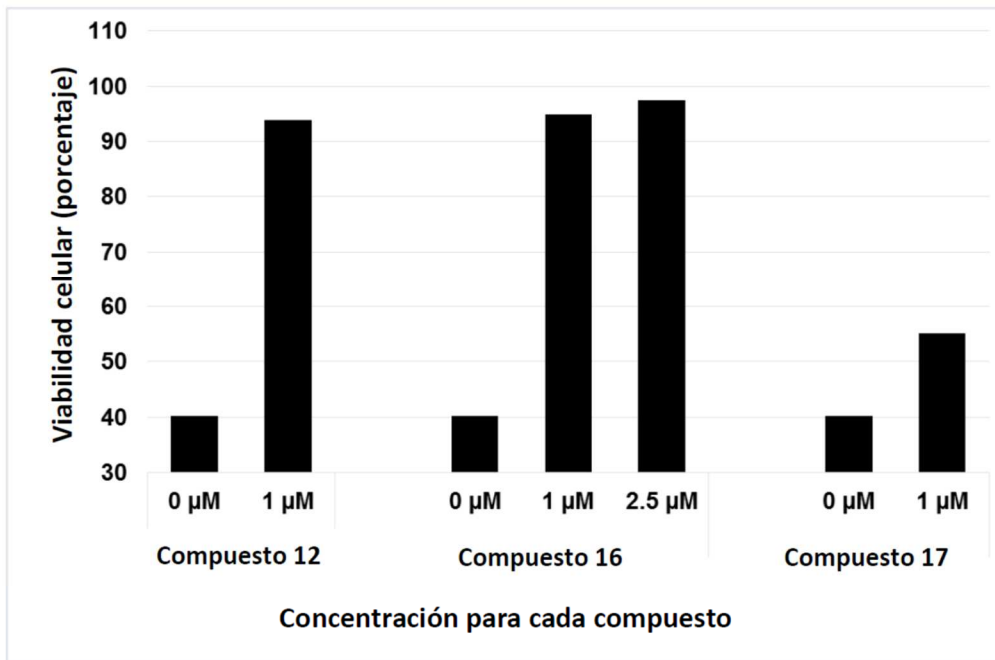


Fig. 7

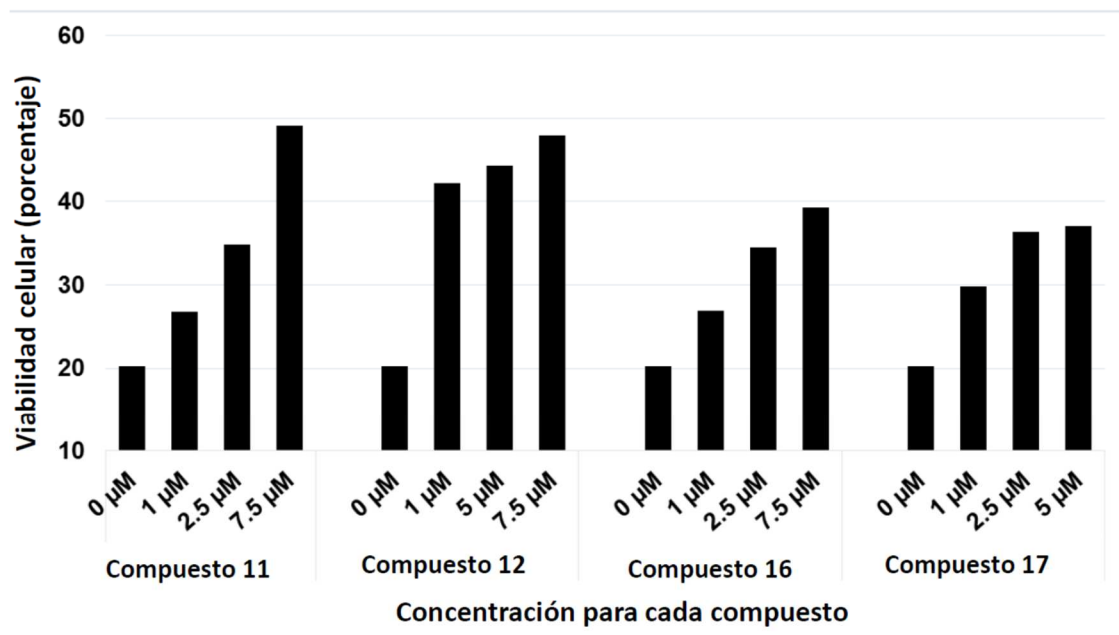


Fig. 8

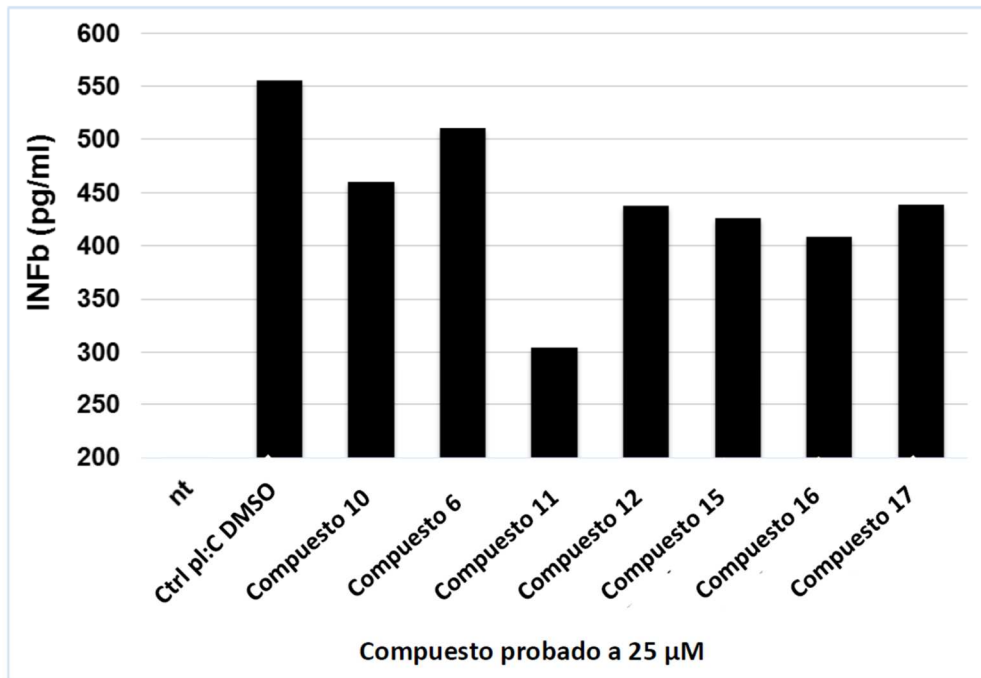


Fig. 9

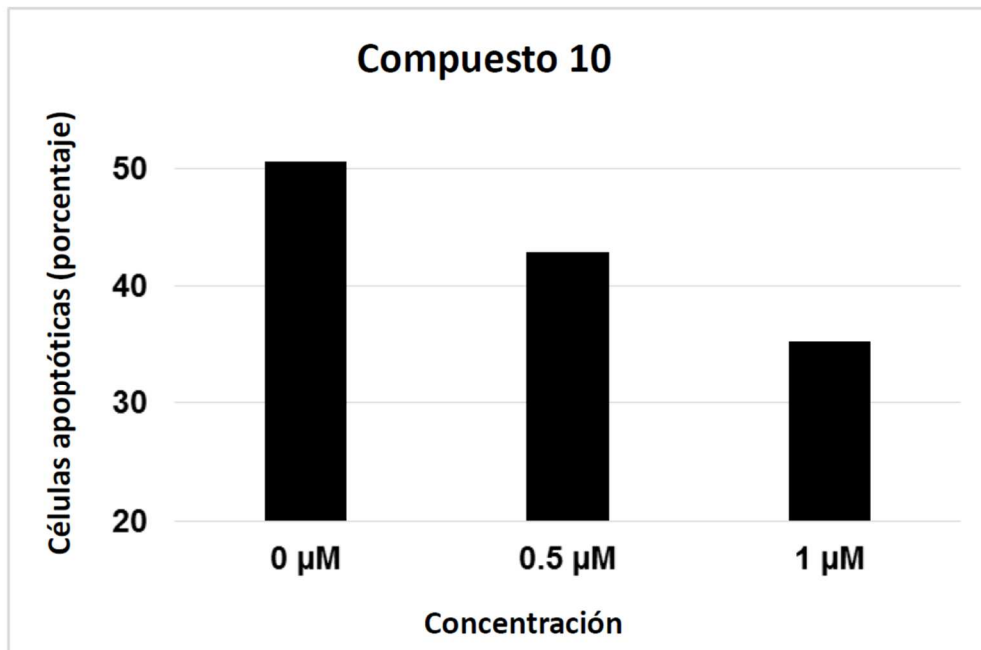


Fig. 10