



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:
10.01.2014 14700310.7

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:
**13.07.2016 Europejski Biuletyn Patentowy 2016/28
EP 2943467 B1**

(13) T3

(51) Int.Cl.

C07C 281/18 (2006.01)
C07D 253/075 (2006.01)
C07D 213/61 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) Tytuł wynalazku:

Pochodne benzylidenoguanidyny i ich zastosowanie terapeutyczne w leczeniu zaburzeń związanych z nieprawidłowym fałdowaniem białek

(30)

Pierwszeństwo:

10.01.2013 GB 201300435

(43)

Zgłoszenie ogłoszono:

18.11.2015 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2015/47

(45)

O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:

31.01.2017 Wiadomości Urzędu Patentowego 2017/01

(73)

Uprawniony z patentu:

**Medical Research Council, Swindon, GB
InFlectis BioScience, Nantes, FR**

(72)

Twórca(y) wynalazku:

**PHILIPPE GUEDAT, Montenois, FR
ANNE BERTOLOTTI, Cambridge, GB**

(74)

Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Agata Granis
PATPOL KANCELARIA PATENTOWA SP. Z O.O.
ul. Nowoursynowska 162J
02-776 Warszawa**

PL/EP 2943467 T3

Uwaga:

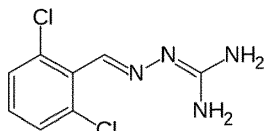
W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

OPIS

[0001] Niniejszy wynalazek dotyczy związków posiadających potencjalnie terapeutyczne zastosowanie do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i zwłaszcza z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek. W szczególności przedmiotem wynalazku są związki zdolne do wykazywania działania ochronnego przeciwko cytotoksycznemu stresowi siateczki śródplazmatycznej (ER).

Tło wynalazku

[0002] Związek 2-(2,6-dichlorobenzylideno)hydrazynokarboksyimidamid, także referowany jako guanabenz, jest alfa agonistą typu alfa-2 stosowanym jako lek przeciwnadciśnieniowy.



Guanabenz

[0003] Dotychczas zgłoszono także inne pochodne guanabenzu. Na przykład, w patencie US 3,982,020 (Sandoz, Inc.) ujawniono podstawione benzylidenohydrazyny i ich zastosowanie jako środków hipoglikemicznych-antyhiperglikemicznych, przeciw otyłości i przeciwzapalnych. W US 2004/0068017 (Bausch & Lomb Inc.) ujawniono podstawione benzylidenohydrazyny, które mogą zwiększać aktywność żelatynazy A w komórkach oka. Częściczki znajdują zastosowanie do leczenia jaskry pierwotnej z otwartym kątem przesączania. W zgłoszeniu WO 2008/061647 (Acure Pharma AB) ujawniono zastosowanie N-(2-chloro-3,4,-dimetoksybenzylidenoamino)guanidyny jako inhibitora VEGFR i jej związane zastosowanie do leczenia lub zapobiegania niepożądanego tworzenia naczyń krwionośnych w przebiegu wzrostu guza i/albo w stanach zapalnych. W zgłoszeniu WO 2005/031000 (Acadia Pharmaceuticals, Inc.) ujawniono podstawione benzylidenohydrazyny i ich zastosowanie do leczenia ostrego bólu oraz przewlekłego bólu neuropatycznego. W końcu w EP 1908464 (CNRS) ujawniono guanabenz i chloroguanabenz oraz ich zastosowanie do leczenia chorób związanych z ekspansją poliglutaminową, w tym choroby Huntingtona.

[0004] Ostatnio odnotowano, że guanabenz posiada potencjał terapeutyczny w wielu innych zaburzeniach. Guanabenz został przedstawiony jako posiadający aktywność przeciw prionową (D. Tribouillard-Tanvier i in., 2008 PLoS One 3, e1981). Odnotowano, że jego aktywność ochronna przeciwko nieprawidłowemu fałdowaniu białek jest zaskakująco dużo szersza i obejmuje tłumienie gromadzenia zmutowanej huntingtyny w testach komórkowych (WO 2008/041133) oraz ochronę przeciwko śmiertelności skutkom ekspresji podatnym na nieprawidłowe fałdowanie u mutantu Insulin Akita siateczki śródplazmatycznej (ER) komórek beta trzustkowych Min6 i INS-1 (P. Tsaytler, H. P. Harding, D. Ron i A. Bertolotti, Science, 332, 1 April 2011, 91-94).

[0005] Guanabenz także wykazywał promowanie przeżycia komórek HeLa narażonych na inny cytotoksyczny stres ER indukowany przez inhibitor N-glykozytacji tunikamycynę, w sposób zależny od dawki (P. Tsaytler, H. P. Harding, D. Ron i A. Bertolotti, Science, 332, 1 April 2011, 91-94). Ilościowa ocena przeżycia komórek dowodzi, że guanabenz podwaja liczbę komórek przeżywiających stres ER ze średnim skutecznym stężeniem ~ 0,4 μM. Ani agonista receptora α2-adrenergicznego klonidyna, ani antagonist receptoru α2-adrenergicznego efaroksan nie ochraniały komórek przed stresem ER, a efaroksan nie kolidował z ochronnym działaniem guanabenzu (P. Tsaytler, H. P. Harding, D. Ron i A. Bertolotti, Science, 332, 1 April 2011, 91-94). Te obserwacje pokazują, że guanabenz ratuje komórki przed śmiertelnym stresem ER poprzez mechanizm niezależny od receptora α2-adrenergicznego. Guanabenz chroni komórki przed

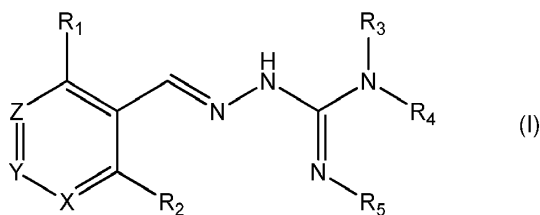
różnym śmiertocnym gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek poprzez wiązanie do regulatorowej podjednostki białka fosfatazy 1, PPP1 R15A (GADD34), selektywnie zakłócając indukowaną stresem defosforylację podjednostki α czynnika 2 inicjacji translacji (eIF2 α). Guanabenz ustala prędkość translacji w komórkach poddanych stresowi na poziomie podatnym na działanie dostępnych chaperonów, tak aby przywrócić homeostazę białek. Odnotowano, że Guanabenz nie wiąże się do konstytutywnego PPP1 R15B (CReP) i dlatego nie hamuje translacji komórek nie poddanych stresowi. (P. Tsaytler, H. P. Harding, D. Ron i A. Bertolotti, Science, 332, 1 April 2011, 91-94).

[0006] Niepowodzenie stabilizacji proteostazy ER przez montowanie adekwatnej odpowiedzi na niesfałdowane białka (UPR) jest rozpoznawane jako czynnik przyczyniający się do wielu stanów patologicznych. Zatem cząsteczki tu opisane, które hamują fosfatazę eIF2 α w celu dostosowania syntezy białek, mogą być terapeutycznie korzystne w ogromnej liczbie chorób spowodowanych przez stres nieprawidłowego fałdowania białek, a w szczególności z powodu gromadzenia nieprawidłowo sfałdowanych białek. W CA958018 i WO 93/03714 ujawniono pochodne benzyliidnoguanidyny.

[0007] Niniejszy wynalazek dostarcza związków alternatywnych opartych na rdzeniu struktury guanabenzu, które mają potencjalnie terapeutyczne zastosowania do leczenia zaburzeń związanych z nieprawidłowym fałdowaniem białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek.

Streszczenie wynalazku

[0008] W pierwszym aspekcie wynalazek dotyczy związku o wzorze (I), lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli,



w którym:

R₁ oznacza alkil, Cl, F lub Br;

R₂ oznacza H lub F;

R₃ jest wybrany z H i alkilu;

R₄ jest wybrany z H i C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocyklilu i aryl, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylo COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH₂, NH-alkilu, N(alkil)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

X i Z oznaczają niezależnie CR₁₁, i Y jest wybrany z CR₁₁ i N; R₁₁ oznacza H lub F;

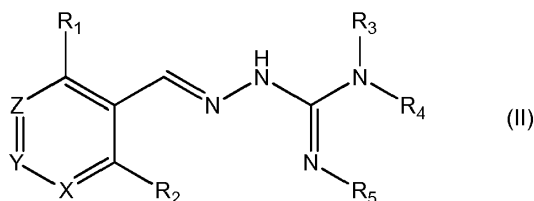
do zastosowania do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i zwłaszcza z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, wybranych spośród neuropatii Charcot-Marie-Tootha; ostrego zespołu

Dejerine-Sottasa; chorób siatkówki, zwłaszcza retinopatii barwnikowej, ciliopatii siatkówki, degeneracji plamki żółtej lub retinopatii cukrzycowej oraz ALS.

[0009] Wcześniejsze badania wskazywały, że grupa arylowa musi być co najmniej dwu-podstawiona aby dostarczać związki wykazujące użyteczną aktywność farmakologiczną (zob.na przykład, D. Tribouillard-Tanvier i in., PLoS One 3, e1981 (2008) oraz EP1908464A, CNRS). Jednakże, przeciwnie do wyników wcześniejszych badań, obecnie zgłaszający niespodziewanie stwierdził, że pochodne aryłowe mono-podstawione są również aktywne.

[0010] Ponadto, związki o wzorze (I) jak określono powyżej, korzystnie nie wykazują aktywności wobec receptora adrenergicznego $\alpha 2A$ w porównaniu do związków ze stanu techniki, takich jak guanabenz (Fig. 4). Ta utrata aktywności alfa-2 adrenergicznej czyni te związki terapeutycznie użyteczne do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek a zwłaszcza z gromadzeniem nieprawidłowo sfaldowanych białek, takich jak choroba Charcot Marie Tootha (CMT), choroby siatkówki, szczególnie retinopatii barwnikowej (RP), choroby Alzheimerera, choroby Parkinsona (PD), stwardnienia zanikowego bocznego (ALS), choroby Huntingtona, tauopatii, choroby prionowej, cukrzycy, szczególnie cukrzycy typu 2 i raka. Brak aktywności alfa-2 adrenergicznej oznacza, że związki o wzorze (I) można podawać w dawkach odpowiednich do traktowania wymienionych powyżej chorób, bez żadnego znaczącego wpływu na ciśnienie krwi.

[0011] W drugim aspekcie wynalazek dotyczy związku o wzorze (II), lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli,



w którym:

R₁ oznacza alkil, Cl, F lub Br;

R₂ oznacza H lub F;

R₃ jest wybrany z H i alkilu;

R₄ jest wybrany z H i C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

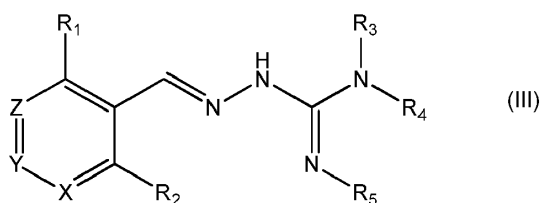
R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocyklilu, aryłu i heteroaryłu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

Każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylo COOH, CO-alkilu, CO-aryłu, NH₂, NH-alkilu, N(alkilu)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

X i Z oznaczają niezależnie CR₁₁, i Y oznacza N;

R₁₁ oznacza H lub F.

[0012] W trzecim aspekcie wynalazek dotyczy związku o wzorze (III), lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli,



w którym:

R₁ oznacza alkil, Cl, F lub Br;

R₂ oznacza H lub F;

R₃ jest wybrany z H i alkil;

R₄ oznacza C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

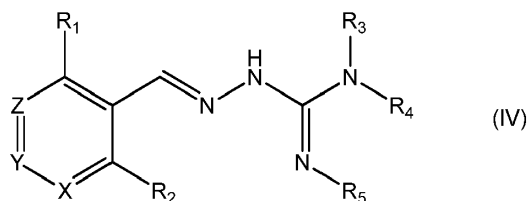
R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocyklu, arylu i heteroarylu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylo COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH₂, NH-alkilu, N(alkil)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

X i Z każdy oznacza niezależnie CR₁₁, i Y jest wybrany z CR₁₁ i N; i

R₁₁ oznacza H lub F.

[0013] W czwartym aspekcie wynalazek dotyczy związku o wzorze (IV), lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli,



w którym:

R₁ oznacza alkil lub Br;

R₂ oznacza H;

R₃ jest wybrany z H i alkil;

R₄ jest wybrany z H i C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocyklu i arylu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylo COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH₂, NH-alkilu, N(alkil)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

X i Z każdy oznacza CH i Y oznacza CR₁₁;

R₁₁ oznacza H lub F.

[0014] W dalszym aspekcie wynalazek dotyczy kompozycji farmaceutycznych zawierających związek o wzorze (II), (III) lub (IV) jak opisano powyżej, z domieszką odpowiednich farmaceutycznie dopuszczalnych rozcieńczalnika, substancji pomocniczej lub nośnika.

Szczegółowy opis

[0015] Jak stosuje się w niniejszym opisie określenie „alkil” obejmuje zarówno nasycone prostoańcuchowe jak i rozgałęzione grupy alkilowe, które mogą być podstawione (mono- lub poli-) lub niepodstawione. Korzystnie grup alkilowa oznacza grupę C₁₋₂₀ alkilową, bardziej korzystnie C₁₋₁₅, jeszcze bardziej korzystnie grupę C₁₋₁₂ alkilową, jeszcze bardziej korzystnie grupę C₁₋₆ alkilową, bardziej korzystnie grupę C₁₋₃ alkilową. Szczególnie korzystne grupy alkilowe obejmują, na przykład, metyl, etyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl, tert-butyl, pentyl i heksyl. Odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰. Korzystnie grupa alkilowa jest niepodstawiona.

[0016] Jak stosuje się w niniejszym opisie określenie „cykloalkil” odnosi się do cyklicznej grupy alkilowej, która może być podstawiona (mono- lub poli-) lub niepodstawiona. Korzystnie grupa cykloalkilowa oznacza grupę C₃₋₁₂ cykloalkilową. Odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰.

[0017] Jak stosuje się w niniejszym opisie określenie „alkenyl” odnosi się do grupy zawierającej jedno lub więcej wiązań podwójnych węgiel-węgiel, która może być rozgałęziona lub nierozgałęziona, podstawiona (mono- lub poli-) lub niepodstawiona. Korzystnie grupa alkenylowa oznacza grupę C₂₋₂₀ alkenylową, bardziej korzystnie grupę C₂₋₁₅ alkenylową, jeszcze bardziej korzystnie grupę C₂₋₁₂ alkenylową, lub korzystnie grupę C₂₋₆ alkenylową, bardziej korzystnie grupę C₂₋₃ alkenylową. Odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰ jak określono powyżej. Określenie „cykliczny alkenyl” ma być rozumiany odpowiednio.

[0018] Jak stosuje się w niniejszym opisie określenie „aryl” odnosi się do C₆₋₁₂ grupy aromatycznej, która może być podstawiona (mono- lub poli-) lub niepodstawiona. Typowe przykłady obejmują fenyl i naftyl etc. Odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰.

[0019] Jak stosuje się w niniejszym opisie, określenie „heterocykl” (także referowane tu jako „heterocyklil” i „heterocykliczny”) odnosi się do podstawionej (mono- lub poli-) lub niepodstawionej nasyconej, nienasyconej lub częściowo nienasyconej grupy cyklicznej zawierającej jeden lub więcej heteroatomów wybranych spośród N, O i S, i która ewentualnie ponadto zawiera jedną lub więcej grup CO. Odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰. Określenie „heterocykl” obejmuje zarówno grupy heteroarylowe jak i grupy heterocykloalkilowe, jak opisano powyżej.

[0020] Jak stosuje się w niniejszym opisie, określenie „heteroaryl” odnosi się do grupy C₂₋₁₂ aromatycznej, podstawionej (mono- lub poli-) lub niepodstawionej, która zawiera jeden lub więcej heteroatomów. Korzystnie grupa heteroarylowa oznacza grupę C₄₋₁₂ aromatyczną zawierającą jeden lub więcej heteroatomów wybranych spośród N, O i S. Odpowiednie grupy heteroarylowe obejmują pirol, pirazol, pirymidynę, pirazynę, pirydynę, chinolinę, tiofen, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tiazol, oksazol, izo-tiazol, izo-oksazol, imidazol, furan i podobne. Ponownie, odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰.

[0021] Jak stosuje się w niniejszym opisie, określenie „heterocykloalkil” odnosi się do podstawionej (mono- lub poli-) lub niepodstawionej cyklicznej grupy alifatycznej, która zawiera jeden lub więcej heteroatomów. Korzystne grupy heterocykloalkilowe obejmują piperydynyl, pirolidynyl, piperazynyl, tiomorfolinyl i morfolinyl. Bardziej korzystnie, grupa heterocykloalkilowa jest wybrany spośród N-piperydynylu, N-pirolidynylu, N-

piperazyneu, N-tiomorfolinyu i N-morfolinyu. Ponownie, odpowiednie podstawniki obejmują, na przykład, jedną lub więcej grup R¹⁰.

[0022] Jak stosuje się w niniejszym opisie, określenie „aralkil” obejmuje, ale nie ogranicza się do niej, grupę posiadającą zarówno funkcjonalność arylu jak i alkilu. Tytułem przykładu, określenie obejmuje grupy, w których jeden z atomów wodoru grupy alkilowej jest zastąpiony przez grupę arylową, np. grupę fenylową ewentualnie posiadającą jeden lub więcej podstawników, takich jak halo, alkil, alkoksy, hydroksy i podobne. Typowe grupy aralkilowe obejmują benzyl, fenetyl i podobne.

[0023] W jednym korzystnym wykonaniu, R₁ oznacza Cl, Br, Me lub F, bardziej korzystnie, Cl.

[0024] W jednym korzystnym wykonaniu, R₂ oznacza H.

[0025] W jednym korzystnym wykonaniu, Y oznacza CR₁₁.

[0026] W jednym korzystnym wykonaniu, Y oznacza N.

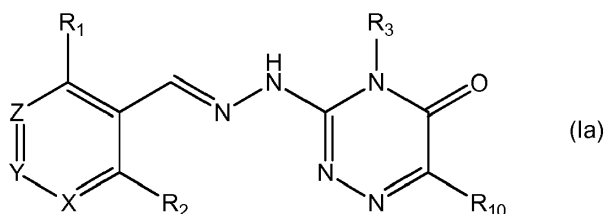
[0027] W jednym korzystnym wykonaniu, R₃ i R₄ oba oznaczają H.

[0028] W jednym korzystnym wykonaniu, R₃ oznacza H i R₄ oznacza C(O)R₆.

[0029] W jednym korzystnym wykonaniu, R₆ oznacza alkil lub alkoksy, bardziej korzystnie, Me lub OMe.

[0030] W jednym korzystnym wykonaniu, R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀.

[0031] W jednym korzystnym wykonaniu, wspomniany związek ma wzór (Ia), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,



w którym R₁, R₂, R₃ i R₁₀ są takie jak określono powyżej.

[0032] W jednym szczególnie korzystnym wykonaniu, związek o wzorze (I) jest wybrany spośród następujących:

Przykład 1	
Przykład 2	
Przykład 3	
Przykład 4	

Przykład 6	
Przykład 7	
Przykład 8	
Przykład 9	
Przykład 13	
Przykład 15	
Przykład 16	

i ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli.

[0033] W jednym zwłaszcza korzystnym wykonaniu, związek o wzorze (I) jest wybrany spośród przykładu 1, 3, 6 i 15, jak przedstawiono powyżej.

[0034] Jeszcze bardziej korzystnie, związek o wzorze (I) jest wybrany z przykładu 1 i przykładu 15, bardziej korzystnie z przykładu 1, to znaczy związku 1-[(E)-[(2-chlorofenilo)metylideno]amino]-guanidyny.

Związki

[0035] W jednym aspekcie wynalazek dotyczy związków o wzorach (II), (III) lub (IV), lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli, jak określono powyżej. W korzystnym aspekcie wynalazek wykorzystuje *mutatis mutandis*. Szczególnie korzystne związki dla tego aspektu obejmują przykłady 7, 8, 9, 13 i 16 jak tu opisano.

Zastosowania terapeutyczne

[0036] Zgłaszający wykazał, że związki o wzorze (I) posiadają potencjalne terapeutyczne zastosowania do leczenia zaburzeń związanych z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek. W szczególności pokazano, że związki o wzorze (I) mają ochronne działanie przeciwko cytotoksycznemu stresowi siateczki śródplazmatycznej (ER) i zaburzeniom związanym z wiekiem.

[0037] W jednym aspekcie wynalazek dotyczy zastosowania związku o wzorze (I) jak określono powyżej, do wytwarzania leku do leczenia zaburzenia związanego ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek, i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, jak określono powyżej.

[0038] Jak stosuje się w niniejszym opisie, fraza „wytwarzanie leku” obejmuje zastosowanie jednego lub więcej powyżej opisanych związków bezpośrednio jako leku poza jego zastosowaniem w programie monitorowania innego środka czynnego albo na dowolnym etapie wytwarzania takiego leku.

[0039] Ujawniono również sposób leczenia zaburzenia związanego ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek u podmiotu, który tego potrzebuje, przy czym wspomniany sposób obejmuje podawanie terapeutycznie skutecznej ilości związku o wzorze (I), jak określono powyżej, wspomnianemu podmiotowi.

[0040] Określenie „sposób” odnosi się do postępowania, środków, technik i procedur w celu zrealizowania podanego zadania włączając, ale nie ograniczając się do nich, takie postępowanie, środki, techniki i procedury, które są znane albo łatwe do opracowania na podstawie znanych postępowań, środków, technik i procedur przez specjalistów w dziedzinie chemii, farmakologii, biologii, biochemii i medycyny.

[0041] W niniejszym dokumencie określenie „leczenie” obejmuje znoszenie, znaczące hamowanie, spowolnienie lub odwrócenie progresji choroby lub zaburzenia, znaczące złagodzenie objawów klinicznych choroby lub zaburzenia lub znaczące zapobieganie pojawienia się objawów klinicznych choroby lub zaburzenia.

[0042] Określenie „ilość terapeutycznie skuteczna” odnosi się do takiej ilości podawanego związku, która będzie łagodzić do pewnego zakresu jeden lub więcej objawów zaburzenia lub choroby poddanych leczeniu.

[0043] Odpowiedź na niesfałdowane białka (ang. unfolded protein response, w skrócie UPR) jest komponentą systemu obrony komórkowej przeciwko nieprawidłowemu sfałdowaniu białek, która dostosowuje fałdowanie w siateczce śródplazmatycznej (ER) do zmiany warunków. UPR jest aktywowana w odpowiedzi na gromadzenie niesfałdowanych lub nieprawidłowo sfałdowanych białek w świetle przewodu siateczki śródplazmatycznej. W tym opisie UPR ma dwa główne cele: (i) przywrócenie prawidłowej funkcji komórki poprzez zatrzymanie translacji białka, oraz (ii) aktywowanie szlaków sygnałowych, które prowadzą do zwiększonego wytwarzania chaperonów komórkowych zaangażowanych w fałdowanie białek. Jeśli te cele nie są osiągnięte w pewnych ramach czasowych lub zakłócenie się przedłuża, UPR dąży do apoptozy.

[0044] Promotorowymi komponentami UPR są rezydujące w ER białka transbłonowe IRE1, ATF6, i PERK, które będąc sensorami wad fałdowania przeprogramowują transkrypcję i translację w sposób skoordynowany i przywracają proteostazę. Aktywowane IRE1 i ATF6 wzmacniają transkrypcje genów zaangażowanych w fałdowanie ER, takich jak te kodujące chaperony BiP i GRP94. Aktywowany PERK tłumi globalną syntezę białek poprzez fosforylację podjednostki czynnika 2 inicjacji translacji (eIF2 α) w Ser51 promując translację czynnika transkrypcji ATF4. Ten ostatni kontroluje ekspresję CHOP, innego czynnika transkrypcji, który z kolei promuje ekspresję PPP1 R15A/GADD34. PPP1 R15A, efektor pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego, co kończy sygnałowanie UPR rekrutuje katalityczną podjednostkę fosfatazy białkowej 1 (PP1c) do defosforylacji eIF2 α , umożliwiając wznowienie syntezy białek. Defekt UPR przyczynia się do wielu stanów patologicznych, co może być skorygowane przez odpowiednie zwiększenie tej adaptacyjnej odpowiedzi. Selektywne inhibitory indukowanej stresem eIF2 α fosfatazy PPP1 R15A-PP1 opóźniają defosforylację eIF2 α i w konsekwencji selektywną syntezę białek w komórkach poddanych stresowi, bez wpływu na syntezę białek w komórkach nie poddanych stresowi. Przedłuża to korzystne działanie UPR. Przejściowe zmniejszenie syntezy białek jest korzystne w komórkach poddanych stresowi, ponieważ zmniejsza strumień syntetyzowanych białek zwiększając dostępność chaperonów i chroni przed stresem nieprawidłowego fałdowania białek (P. Tsaytler, H. P. Harding, D. Ron i A. Bertolotti, Science, 332, 1 April 2011, 91-94). Nieselektywne inhibitory 2 fosfataz eIF2 α mogą mieć niepożądane działania, tak jak trwałe

hamowanie translacji jest szkodliwe. W rzeczywistości ablacja genetyczna zarówno PPP1 R15A jak i PPP1 R15B skutkuje wczesno embrionalną śmiertelnością u myszy wskazując, że hamowanie dwóch fosfataz eIF2 α PPP1 R15A-PP1 i PPP1 R15B-PP1 jest szkodliwe dla organizmów. Przeciwnie genetyczna ablacja PPP1 R15A nie wywołuje szkodliwych konsekwencji u myszy (Harding i in., 2009, Proc Natl Acad Sci USA, 106, 1832-1837). Ponadto przewiduje się, że specyficzne inhibitory PPP1 R15A są obojętne w komórkach nie poddanych stresowi, tak jak PPP1 R15A nie ulegają ekspresji przy braku stresu. Zatem przewiduje się, że selektywne inhibitory PPP1 R15A są bezpieczne. Nieselektywne inhibitory dwóch fosfataz eIF2 α mogą być również użyteczne w leczeniu chorób z nieprawidłowym fałdowaniem białek, gdy stosowane w dawkach, które skutkują jedynie częściowym hamowaniem fosfataz.

[0045] Cytoprotekcję przeciwko stresowi ER można oceniać stosując odpowiednie testy. Na przykład, cytoprotekcje można oceniać w komórkach HeLa, w których stres ER ujawnia się po dodaniu środowiska zawierającego tunikamycynę, mieszaninę homologiczną nukleozydowych antybiotyków, która hamuje UDP-HexNAc: poliprenol-P HexNAc-1-P rodzinę enzymów i jest stosowany w celu wywołania odpowiedzi na niesfałdowane białka. Żywotność komórek można wykrywać w obecności lub przy braku związków inhibitorów po upływie określonego czasu przez pomiar redukcji WST-8 do formazanu stosując standardowy zestaw do pomiaru żywotności komórek (taki jak Cell Viability Counting Kit-8 from Dojindo). Cytoprotekcję przeciwko stresowi ER wyraża się jako procentowy wzrost żywych komórek (w odniesieniu do kontroli) po stresie ER. Dalsze szczegóły odpowiedniego testu są przedstawione w części obejmującej załączone przykłady.

[0046] W korzystnym wykonaniu związek o wzorze (I) może przedłużać działania ochronne UPR w stosunku do kontroli (to znaczy przy braku związku inhibitora) o co najmniej 20 %, bardziej korzystnie, co najmniej 30 %, jeszcze bardziej korzystnie, co najmniej 40 %, co najmniej 50 %, co najmniej 60%, co najmniej 70 %, co najmniej 80 %, jeszcze bardziej korzystnie, co najmniej 90 %.

[0047] Zgłaszający wykazał, że związki o wzorze (I) stanowią inhibitory interakcji PPP1 R15A-PP1, co indukuje działanie ochronne. Korzystnie, związek wykazuje działanie ochronne z EC₅₀ niższym niż około 5 μ M, jeszcze bardziej korzystnie, niższym niż około 2 μ M, bardziej korzystnie, niższym niż około 1 μ M. Związek powinien być pozbawiony działania alfa2 adrenergicznego. Zatem w jednym korzystnym wykonaniu związek nie wykazuje żadnego działania w funkcjonalnym teście alfa-2-adrenergicznym.

[0048] Zgłaszający ponadto wykazał, że niektóre związki o wzorze (I) selektywnie hamują PPP1 R15A-PP1, a zatem przedłużają działanie ochronne UPR, tak aby uwalniać komórki od stresu nieprawidłowego fałdowania białek. Inhibitory PPP1 R15A-PP1 opisane w niniejszym opisie patentowym zatem mają terapeutyczne zastosowanie do leczenia wielu chorób związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i zwłaszcza z gromadzeniem nieprawidłowo sfalutowanych białek.

[0049] W jednym wykonaniu związek o wzorze (I) może hamować PPP1 R15A i PPP1 R15B.

[0050] W korzystnym wykonaniu związek o wzorze (I) może selektywnie hamować PPP1 R15A bardziej niż PPP1 R15B.

Jak ujawniono związek o wzorze (I) ma zastosowanie do leczenia chorób neurodegeneracyjnych, szczególnie, gdzie odgrywa rolę gromadzenie nieprawidłowo sfalutowanych białek (Brown i in., 2012, Frontiers in Physiology, 3, Artykuł 263).

W jednym korzystnym wykonaniu związek o wzorze (I) ma zastosowanie do leczenia zaburzeń wybranych spośród Charcot Marie Tooth, ostrego zespołu Dejerine-Sottas (Voermans i in., 2012, J Peripher New Syst, 17(2), 223-5), chorób siatkówki (takich jak retinopatia barwnikowa, ciliopatie siatkówki, degeneracja plamki

zółtej lub retinopatia cukrzycowa, ale nie ograniczających się do nich) oraz stwardnienia zanikowego bocznego (ALS).

[0051] Ujawniono również związek o wzorze (I), jak określono powyżej, do zastosowania do leczenia zaburzeń związanych ze szlakiem fosforylacji eIF2 α , gdzie odgrywa rolę gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek. Korzystnie zaburzenie stanowi choroba lub zaburzenie, w której zaangażowana jest PPP1 R15A. Przykłady takich zaburzeń obejmują choroby związane z nieprawidłowym fałdowaniem białek, takie jak, ale nie ograniczone do nich, Charcot Marie Tooth, ostry zespół Dejerine-Sottas i retinopatię barwnikową.

[0052] Ujawniono również związek o wzorze (I), jak określono powyżej, do zastosowania do leczenia chorób wywołanych przez, związanych z, lub w których zaangażowana jest fosforylacja eIF2 α i/albo aktywność PPP1 R15A, gdzie odgrywa rolę gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek.

[0053] Ujawniono również związek o wzorze (I), jak określono powyżej, do zastosowania do leczenia zaburzeń UPR, takich jak starzenie, ale bez ograniczania się do niego (Naidoo i in., 2008, J Neurosci, 28, 6539-48).

Jak stosuje się w niniejszym opisie „choroba lub zaburzenie, w której zaangażowana jest PPP1 R15A” odnosi się do choroby lub zaburzenia charakteryzującego się nieprawidłową aktywnością PPP1 R15A, gdzie występuje gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek. Nieprawidłowa aktywność odnosi się do: (i) ekspresji PPP1 R15A w komórkach, w których normalnie nie występuje ekspresja PPP1 R15A; (ii) zwiększonej ekspresji PPP1 R15A; lub (iii) zwiększonej aktywności PPP1 R15A.

[0054] Ujawniono również sposób leczenia ssaka, u którego występuje stan chorobowy łagodzony przez hamowanie PP1 R15A, gdzie występuje gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek, przy czym sposób obejmuje podawanie ssakowi terapeutycznie skutecznej ilości związku o wzorze (I), jak określono powyżej.

[0055] Ujawniono również inhibitor PPP1 R15A o wzorze (I) lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól, do zastosowania do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek i/albo zaburzeniami UPR, przy czym związek ten nie wykazuje lub wykazuje zredukowaną aktywność agonisty alfa 2 adrenergicznego w porównaniu z guanabenzem.

Ujawniono również inhibitor PPP1 R15A o wzorze (I) lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól, do zastosowania do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek i/albo zaburzeniami UPR, przy czym związek ten nie hamuje translacji białek w nie poddanych stresowi komórkach wyrażających PPP1 R15B.

[0056] Ujawniono również sposób leczenia zaburzenia charakteryzującego się aktywnością odpowiedzi na stres ER z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, sposób obejmujący podawanie pacjentowi terapeutycznie skutecznej ilości co najmniej jednego związku o wzorze (I), przy czym związek ten moduluje odpowiedź na stres ER.

Ujawniono również inhibitor PPP1 R15A o wzorze (I) lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól, do zastosowania do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek i/albo zaburzeniami UPR, przy czym związek ten wykazuje selektywność wobec holofosfatazy PPP1 R15A-PP1, nie mając jednak lub mając zredukowaną aktywność wobec holofosfatazy PPP1 R15B-PP1, i przy czym stosunek (aktywność wobec holofosfatazy PPP1 R15A-PP1 / aktywność wobec holofosfatazy PPP1R15B-PP1) dla tego związku jest co

najmniej równy lub wyższy niż stosunek (aktywność wobec holofosfatazy PPP1 R15A-PP1 / aktywność wobec holofosfatazy PPP1R15B-PP1) dla guanabenzu.

[0057] Ujawniono również inhibitor PPP1 R15A o wzorze (I) lub jego farmaceutycznie dopuszczalną sól, do zastosowania do leczenia zaburzeń związanych ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek i/albo zaburzeniami UPR, przy czym:

- związek ten posiada aktywność wobec holofosfatazy PPP1R15A-PP1, ale jednak nie ma lub ma zredukowaną aktywność wobec holofosfatazy PPP1R15B-PP1, i;
- w którym stosunek (aktywność wobec holofosfatazy PPP1 R15A-PP1 / aktywność wobec holofosfatazy PPP1R15B-PP1) dla tego związku jest co najmniej równy lub wyższy niż stosunek (aktywność wobec holofosfatazy PPP1 R15A-PP1 / aktywność wobec holofosfatazy PPP1R15B-PP1) dla guanabenzu; i
- w którym związek ten nie wykazuje lub wykazuje zredukowaną aktywność agonisty alfa 2 adrenergicznego w porównaniu z guanabenzem.

[0058] Jak stosuje się w niniejszym opisie choroba lub zaburzenie charakteryzująca się aktywnością odpowiedzi na stres ER, i/albo choroba lub zaburzenie związane ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek i/albo zaburzeniami UPR, jest wybrana spośród Charcot Marie Tooth, ostrego zespołu Dejerine-Sottas (Voermans i in., 2012, J Peripher New Syst, 17(2), 223-5), choroby siatkówki (takiej jak, ale nie ograniczonej do, retinopatii barwnikowej, ciliopatii siatkówki, degeneracji plamki żółtej, retinopatii cukrzycowej), choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, stwardnienia zanikowego bocznego (ALS), choroby Huntingtona, cukrzycy, ale nie ograniczonej do cukrzycy typu 2 i raka, bez ograniczania, jak szpiczaka mnogiego.

Choroba Charcot Marie Tooth

[0059] W jednym korzystnym wykonaniu związek o wzorze (I) stosuje się do leczenia choroby Charcot Marie Tooth.

[0060] Ponad 100 mutacji w genie kodującym białko otoczki mielinowej białka zero (P0), monotopowego białka transbłonowego, które stanowi podstawowe białko produkowane przez mielinizujące komórki Schwanna, powoduje neuropatię Charcot-Marie-Tooth (D'Antonio i in., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). Mutacje są dominująco dziedziczne i powodują chorobę przez przyrost funkcji toksycznych (D'Antonio i in., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). Delecja seryny 63 z P0 (P0S63del) powoduje neuropatię Charcot-Marie-Tooth 1 B u ludzi i podobną demielinizującą neuropatię u transgenicznym myszy. Zmutowane białko gromadzi się w ER i wywołuje UPR (D'Antonio i in., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). Genetyczna ablacja CHOP, genu pro-apoptycznego w UPR przywraca funkcje motoryczne u myszy z Charcot-Marie-Tooth (Pennuto i in., 2008, Neuron, 57, 393-405). Stwierdzenie, że hamowanie PPP1 R15A w komórkach prawie znosi ekspresję CHOP w komórkach ze stresem ER wskazuje, że genetyczne lub farmakologiczne hamowanie PPP1 R15A powinno redukować dysfunkcje u myszy z Charcot-Marie-Tooth. Ostatnio D'Antonio i in. (2013 J.Exp. Med Vol.str.1-18) wykazali, że myszy P0S63del traktowane salubrynałem, małą cząsteczką zwiększającą fosforylację eIF2alfa (Boyce i in. 2005 Science Vol. 307 str.935-939), odzyskują prawie normalną zdolność ruchową w teście bieżni obrotowej oraz poprawę nieprawidłowości morfologicznej i elektrofizjologicznej. Gromadzenie mutanata CMT-związanego w białkach ER nie jest przypisane do P0S63del; co najmniej pięć innych mutantów P0 zidentyfikowano, jako pozostające w ER i wywołujące UPR (Pennuto i in., 2008 Neuron Vol.57 str.393-405; Saporta i in., 2012 Brain Vol.135 str.2032-2047). Ponadto nieprawidłowe fałdowanie białek i gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek w ER było

zaangażowane w patogenenezę innych neuropatii CMT jako mutacje w PMP22 i Cx32 (Colby i in., 2000 Neurobiol.Disease Vol. 7 str.561-573; Kleopa i in., 2002 J. Neurosci. Res. Vol.68 str.522-534; Yum i in., 2002 Neurobiol. Dis. Vol. 11 str.43-52). Jednakże salubralin jest toksyczny i nie może być stosowany do leczenia ludzi s D'Antonio i in. (2013 J.Exp. Med Vol. str.1-18). Przeciwnie inhibitory PPP1 R15A o wzorze (I) są przewidywane jako bezpieczne i mogą być użyteczne do leczenia CMT-1 A i 1 B.

Choroby siatkówki

[0061] Ostatnio opublikowana literatura dostarczyła dowodów, że UPR jest zaangażowana w rozwój zwyrodnienia siatkówki: dziedzicznych degeneracji siatkówki, takich jak ciliopatia siatkówki i retinopatia barwnikowa, zwyrodnienia plamki żółtej, retinopatii wcześniaków, degeneracji siatkówki indukowanej światłem, odwarstwienia siatkówki, retinopatii cukrzycowa i jaskry (przegląd Gorbatyuk i Gorbatyuk 2013 - Retinal degeneration: Focus on the unfolded protein response, Molecular Vision Tom 19 str.1985-1998).

[0062] W jednym korzystnym wykonaniu związek o wzorze (I) jest do zastosowania do leczenia chorób siatkówki, bardziej szczegółowo, dziedzicznej degeneracji siatkówki, takiej jak ciliopatia siatkówki i retinopatia barwnikowa, zwyrodnienia plamki żółtej, retinopatii wcześniaków, degeneracji siatkówki indukowanej światłem, odwarstwienia siatkówki, retinopatii cukrzycowej i jaskry.

[0063] Ciliopatie siatkówki stanowią grupę rzadkich zaburzeń genetycznych pochodzących z defektu pierwotnej rzęski fotoreceptorów wywołując retinopatię barwnikową. Doniesiono, że ten defekt indukuje stres ER z powodu gromadzenia białka w wewnętrznym segmencie fotoreceptora, co z kolei wywołuje UPR (WO2013/124484). Degradacja siatkówki jest często wspólną cechą w ciliopatiach, co można obserwować w klinicznie izolowanej retinopatii barwnikowej, takiej jak wrodzona ślepotą Lebera lub retinopatii barwnikowej sprzężonej z chromosomem X, albo także w objawowych stanach, takich jak zespół Bardet-Biedl Syndrome (BBS) lub zespół Alström Syndrome (ALMS). Ciliopatia siatkówki jest wybrana z grupy obejmującej zespół Bardet-Biedla, zespół Senior-Lokena, zespół Jouberta, zespół Salidono-Mainzera, zespół Sensenbrennera, zespół Jeuna, zespół Meckel-Grudera, zespół Alströma, zespół MORM, wrodzona ślepotą Lebera spowodowana mutacją w genie rzęski i retinopatia barwnikowa sprzężoną z chromosomem X spowodowaną mutacją w genie RPGR.

[0064] Retinopatia barwnikowa jest dziedziczną, zwyrodnieniową chorobą oczu, która powoduje ciężkie upośledzenie widzenia i często ślepotę. Jest to najczęstszą przyczyną genetycznie uwarunkowanej ślepoty. Chorzy doświadczają jednego lub więcej z następujących objawów: ślepoty zmierzchowej; widzenia lunetowego (nie widzenia peryferyjnego); widzenia peryferyjnego (nie widzenia środkowego); widzenia poklatkowego; awersji do odblasków; powolnego przystosowania z ciemności do światła środowiska i vice versa; nieostrości widzenia; słabej separacji kolorów; i skrajnego przemęczenia oczu.

[0065] Ukazujące się publikacje potwierdzają rolę stresu ER w apoptozie siatkówki i śmierci komórkowej (Jing i in., 2012, Exp Diabetes Res, 2012, 589589). Retinopatia barwnikowa (RP) jest najczęstszą postacią dziedzicznego zwyrodnienia siatkówki spowodowaną przez ponad 100 mutacji w genie rodopsyny (Dryja i in., 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 9370-4). Rodopsyna stanowi receptor sprzężony z białkiem G, który transdukuje światło w komórkach pręcikowych fotoreceptorów i składa się z kompleksu kowalencyjnego pomiędzy białkiem transbłonowym opsyną złożoną z 348 aminokwasów, kowalencyjnie związanym z 11-*cis* retinalem (Palczewski, 2006, Annu Rev Biochem, 75, 743-67). Mutacje ropsyny wywołujące RP są stanowią przeważnie mutacje zmieniające sens kodonu rozłożone w całym białku (Dryja i in., 1991, Proc Natl Acad Sci USA, 88, 9370-4), podobnie jak mutacje SOD1 wywołujące ALS (Valentine i in., 2005, Annu Rev Biochem, 74, 563-93). Mutanty rodopsyny wywołujące RP badano w różnych układach i wyniki heterologicznej

ekspresji białek w komórkach ssaczych, u myszy transgenicznych i muszki owocówki są zgodne (Griciuc i in., 2011, Trends Mol Med, 17, 442-51). Najbardziej rozpowszechnione rodopsyny wywołujące RP są nieprawidłowo sfałdowane, nie wiążą 11-*cis*-retinalu, nie docierają do powierzchni komórek, ale pozostają w ER (Griciuc i in., 2011, Trends Mol Med, 17, 442-51). Nieprawidłowe sfałdowanie mutantów rodopsyny indukuje stres ER i śmierć komórek pręcikowych (Griciuc i in., 2011, Trends Mol Med, 17, 442-51). To zdecydowanie sugeruje, że inhibitory PPP1 R15A opisane w niniejszym wynalazku będą użyteczne do leczenia RP.

[0066] Degeneracja plamki żółtej związana z wiekiem (AMD) stanowi główną przyczynę praktycznej ślepoty powyżej 65 roku życia w Stanach Zjednoczonych. Doniesiono, że AMD ocenia się na 54% wszystkich obecnych przypadków ślepoty wśród populacji rasy białej w Stanach Zjednoczonych. W badaniach przewiduje się, że w wyniku wzrostu częstości występowania AMD, liczba ludzi niewidomych w US może wzrosnąć nawet o 70% do roku 2020.

Shen i in. (2011 Effect of Guanabenz on Rat AMD Models and Rabbit Choroidal Blood - Vol. 5 str.27-31) wykazali, że guanabenz znacząco chronił nabłonek barwnikowy siatkówki (RPE) przed zwyrodnieniem wywołanym przez NaIO₃, hamował rozwój neowaskularyzacji naczyńkowej (CNV) w szczurzym modelu AMD indukowanym przez laser i zwiększał znacząco naczyniówkowy przepływ krwi *in vivo*.

Jednakże, guanabenz stanowi receptor alfa2 adrenergiczny i z powodu swojego działania hipotensyjnego nie może być stosowany do leczenia degeneracji siatkówki lub plamki żółtej.

Związki według wynalazku, które są inhibitorami PPP1 R15A, tak jak guanabenz, ale które korzystnie nie wykazują aktywności wobec receptora adrenergicznego alfa2A, będą łagodzić degenerację siatkówki lub plamki żółtej.

Choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, ALS, choroba Huntingtona, tauopatie i choroby prionowe

[0067] Jak ujawniono związek o wzorze (I) może być stosowany do leczenia choroby wybranej spośród choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, ALS, choroby Huntingtona, tauopatii i chorób prionowych.

[0068] Ponieważ gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek jest cechą charakterystyczną różnych chorób, a wykazano, że związek o wzorze (I) redukuje gromadzenie 4 niepowiązanych nieprawidłowo sfałdowanych i powodujących chorobę białek (FIG. 4-6), zatem związek o wzorze (I) będzie użyteczny również do leczenia innych chorób neurodegeneracyjnych wywołanych przez gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanych białek.

[0069] Ponadto, ponieważ indukcja UPR jest cechą chorób spowodowanych gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, związek o wzorze (I) będzie użyteczny do traktowania tych chorób. (Scheper & Hoozemans 2009; Kim i in. 2008).

[0070] Guanabenz redukuje objawy u myszy zainfekowanych prionami (D. Tribouillard-Tanvier i in., 2008 PLoS One 3, e1981). Jednakże guanabenz nie jest użyteczny do leczenia ludzkich chorób z nieprawidłowym sfałdowaniem białek, ze względu na swoją aktywność hipotensyjną. Przeciwnie inhibitory PPP1 R15A pozbawione aktywności alfa2 adrenergicznej i opisane w niniejszym wynalazku, mogą być użyteczne do traktowania chorób prionowych.

Choroba Parkinsona (PD)

[0071] Salubriinal hamuje defosforylację eIF2 α , w której zaangażowany jest PPP1 R15A (Boyce i in. 2005 Science Vol. 307 str.935-939). Ostatnio, Colla i in. (J. of Neuroscience 2012 Vol. 32 Nr 10 str.3306-3320) stwierdzili, że salubriinal znacząco tłumi przejawy choroby w dwóch modelach alfa-synukleinopatii.

[0072] Bez zamiaru wiązania się z jakąkolwiek teorią, przypuszcza się, że związki według wynalazku, które są inhibitorami PPP1 R15A, będą łagodzić przejawy chorobowe w alfa- synukleinopatii, takich jak choroba Parkinsona.

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS)

[0073] Saxena i in. (Nature Neuroscience 2009 Vol. 12 str.627-636) stwierdzili, że salubrial przedłuża długość życia w modelu myszy transgeniczej G93A-SOD1 choroby neuronu ruchowego. Bez zamiaru wiązania się z jakąkolwiek teorią, przypuszcza się, że związki według wynalazku, które są inhibitorami PPP1 R15A, będą łagodzić przejawy chorobowe w ALS z mutacją G93A SOD1. Ponad 140, przeważnie zmieniających sens kodonu, mutacji w genie SOD1 powoduje gromadzenie zmienionego białka w postaciach występujących w rodzinie stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Ponieważ różnorodne mutanty SOD1 mają te same powszechne defekty (Munch i in. 2010), przyjmuje się, że różnorodne mutanty SOD1 powodują ALS zgodnie ze wspólnym mechanizmem. Ponadto objawy kliniczne są takie same dla sporadycznej i rodzinnej postaci chorób, i jest obecnie dobrze udokumentowane, że nieprawidłowe fałdowanie białek odgrywa zasadniczą rolę zarówno w rodzinnym jak i sporadycznym ALS. Zatem związki o wzorze (I) można stosować do traktowania zarówno w rodzinnej jak i sporadycznej postaci ALS.

[0074] Zgłaszający stwierdził, że cytoprotekcyjna aktywność guanabenzu na stres nieprawidłowego fałdowania białek jest zaskakująco szeroka, tak że guanabenz redukuje również gromadzenie huntingtyny w komórkach (WO 2008/041133). To stwierdzenie jest nieoczekiwane ponieważ mutant huntingtyny jest albo cytozolowy lub jądrowy. Jednakże istnieją dowody, że metabolizm mutantu huntingtyny był poprzednio wiązany z odpowiedzią na stres ER (Nishitoh i in., 2002, Genes Dev, 16, 1345-55; Rousseau i in., 2004, Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 9648-53; Duennwald and Lindquist, 2008, Genes Dev, 22, 3308-19). Stwierdzenie zgłaszającego, że guanabenz chroni komórki przez cytotoksycznym stresem ER i redukuje gromadzenie mutantu huntingtyny dodatkowo podtrzymuje koncepcję, że istnieją aspekty odpowiedzi na stres ER, które wpływają na gromadzenie mutantu huntingtyny. Ponadto zaburzenie odpowiedzi na stres ER było zaangażowane w wiele patologii, włączając cukrzycę typu 2 i neurodegenerację (Scheper i Hoozemans, 2009, Curr Med Chem, 16, 615-26). Zatem, bez zamiaru wiązania się z jakąkolwiek teorią, uważa się, że guanabenz i związki pokrewne wykazują działanie ochronne przeciwko wtórnym chorobom UPR, mianowicie chorobom z powodu gromadzenia nie rezydujących w ER nieprawidłowo sfałdowanych białek, co wywołuje UPR.

Cukrzyca

[0075] Jak ujawniono związek o wzorze (I) może być stosowany do leczenia cukrzycy, bardziej korzystnie cukrzycy typu 2.

[0076] Wydzielające insulinę komórki β w trzustce mają poważne i ściśle regulowane zadanie biosyntetyczne polegające na wydzielaniu insuliny. Zatem komórki te wykazują ważną potrzebę utrzymania homeostazy ER (Back i Kaufman, 2012, Annu Rev Biochem, 81, 767-93). Cukrzyca typu 2 manifestuje się przez podwyższone poziomy glukozy we krwi z powodu na oporność na insulinę w tkance tłuszczowej, mięśniach i wątrobie i/ albo upośledzone wydzielanie insuliny przez trzustkowe komórki β . W odpowiedzi masa komórek β wzrasta i ich funkcjonowanie zwiększa się. Ostatecznie obciążenie komórkami β jest zbyt wysokie prowadzące do ich stopniowego spadku ich liczby i śmierci. Wzrastająca liczba dowodów wykazuje, że śmierć komórek β jest wynikiem stresu ER (Back i Kaufman, 2012, Annu Rev Biochem, 81, 767-93). Co ważne delekcja *Chop* poprawia funkcjonowanie komórek β w różnych modelach cukrzycy (Song i in., 2008, J Clin Invest, 118, 3378-89). Bez zamiaru wiązania się z jakąkolwiek teorią, uważa się, że inhibitory PPP1

R15A-PP1 będą poprawiać funkcjonowanie komórek β w cukrzycy typu 2, ponieważ hamowanie PPP1 R15A-PP1 zmniejsza poziomy pro-apoptotycznego białka CHOP podczas stresu ER (Tsytler i in., 2011, Science, 332, 91-4).

Rak

[0077] Jak ujawniono związek o wzorze (I) może być stosowany do leczenia raka.

[0078] Komórki rakowe mają duże zapotrzebowanie metaboliczne i ich proliferacja opiera się na wydajnej syntezie białek. Translacja inicjacji odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu homeostazy białka, różnicowaniu, proliferacji i transformacji nowotworowej. Wzrastająca translacja inicjacji przyczynia się do inicjacji raka i odwrotnie zmniejszenie translacji inicjacji może zredukować wzrost guza (Donze i in., 1995, EMBO J, 14, 3828-34; Pervin i in., 2008, Cancer Res, 68, 4862-74; Chen i in., 2011, Nat Chem Biol, 7, 610-6). Bez zamiaru wiązania się z jakąkolwiek teorią, uważa się, że hamowanie PPP1 R15A może selektywnie zmniejszać translację w komórkach nowotworu i zmniejszać wzrost guza.

Starzenie się

[0079] Wiadomo, że starzenie się zaburza odpowiedzi na stres i w szczególności, z wiekiem zaburzona jest UPR (Naidoo i in., 2008, J Neurosci, 28, 6539-48). Zatem, przedłużenie korzystnego działania UPR poprzez hamowanie fosfatazy eIF2 α może łagodzić choroby związane z wiekiem.

Kompozycje farmaceutyczne

[0080] W celu zastosowania według niniejszego wynalazku związku lub ich fizjologicznie dopuszczalne sole, estry lub inne fizjologicznie funkcjonalne pochodne, tu opisane, mogą być prezentowane w postaci formułacji farmaceutycznej, zawierającej związek lub ich fizjologicznie dopuszczalne sole, estry lub inne fizjologicznie funkcjonalne pochodne, razem z jednym lub więcej farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem i ewentualnie innymi leczniczymi i/albo profilaktycznymi składnikami. Nośniki muszą być dopuszczalne pod względem kompatybilności z innymi składnikami formułacji i dlatego nieszkodliwe dla odbiorcy. Kompozycje farmaceutyczne mogą być przeznaczone do zastosowania u ludzi lub u zwierząt w medycynie ludzkiej i weterynarii.

[0081] Przykłady takich odpowiednich substancji pomocniczych do różnych postaci kompozycji farmaceutycznych tu opisanych można znaleźć w publikacji „Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 2nd Edition, (1994), wydanej przez A Wade and PJ Weller.

[0082] Nośniki lub rozcieńczalniki dopuszczalne do stosowania terapeutycznego są dobrze znane ze stanu techniki i opisane, na przykład, w Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

[0083] Przykłady odpowiednich nośników obejmują laktozę, skrobię, glukozę, metylocelulozę, stearynian magnezu, mannitol, sorbitol i podobne. Przykłady odpowiednich rozcieńczalników obejmują etanol, glicerol i wodę.

[0084] Wyboru nośnika farmaceutycznego, substancji pomocniczej lub rozcieńczalnika można dokonywać w zależności od zamierzonej drogi podawania i standardowej praktyki farmaceutycznej. Kompozycje farmaceutyczne mogą zawierać, lub dodatkowo zawierać, jako nośnik, substancję pomocniczą lub rozcieńczalnik, dowolny(e) odpowiednią(e) substancję(e) wiążącą(e), substancję(e) poślizgową(e), środek(ki) zawieszający(e), substancję(e) błonotwórczą(e), substancję(e) zwiększającą(e) rozpuszczalność, bufor(y), substancję(e) poprawiającą(e) smak i zapach, substancję(e) powierzchniowo czynną(e), substancję(e) zagęszczającą(e), konserwant(y) (w tym przeciwutleniacz(e)) i podobne, oraz substancje włączone w celu uczynienia formułacji izotonicznej z krwią docelowego odbiorcy.

[0085] Przykłady odpowiednich substancji wiążących obejmują skrobię, żelatynę, cukry naturalne, jak glukozę, bezwodną laktozę, sypką laktozę, beta-laktozę, słodziki kukurydziane, gumy naturalne i syntetyczne, takie jak guma akacjowa, tragakanta lub alginian sodu, karboksymetylocelulozę i glikol polietylenowy.

[0086] Przykłady odpowiednich substancji poślizgowych obejmują oleinian sodu, stearynian sodu, stearynian magnezu, octan sodu, chlorek sodu i podobne.

[0087] Konserwanty, substancje stabilizujące, barwniki oraz substancje poprawiające smak i zapach mogą być również zawarte w kompozycji farmaceutycznej. Przykłady konserwantów obejmują benzoesan sodu, kwas sorbinowy i estry kwasu p-hydroksybenzoesowego. Można stosować również przeciwutleniacze i środki zawieszające.

[0088] Formulacje farmaceutyczne obejmują te odpowiednie do podawania doustnego, miejscowego (w tym na skórę, dopoliczkowego, do oczu lub podjęzykowego), doodbytniczego lub pozajelitowego (w tym podskórnego, śródskórnego, domięśniowego i dożylnego), do nosa, wewnątrzgałkowego i do płuc np., przez inhalację. Formulacja, jeśli jest to odpowiednie, może dogodnie występować w postaci oddzielnych jednostkach dawkowania i może być sporządzona dowolnym sposobem dobrze znanym w dziedzinie farmacji. Wszystkie sposoby obejmują etap doprowadzenia do połączenia związku czynnego z płynnymi nośnikami lub rozdrobnionymi stałymi nośnikami albo z oboma ich rodzajami, a następnie, jeśli jest to pożądane, ukształtowanie produktu do pożądanej formulacji.

[0089] Formulacje farmaceutyczne odpowiednie do podawania doustnego, w których nośnik jest stały, korzystnie występują w postaci jednostek dawkowania, takich jak bolusy, kapsułki lub tabletki, każde zawierające określoną ilość związku. Tabletki można sporządzać przez prasowanie lub formowanie, ewentualnie z jednym lub więcej dodatkowym składnikiem. Tabletki prasowane można wytwarzać przez prasowanie w odpowiednim urządzeniu związku aktywnego w postaci sypkiej, takiej jak proszek lub granulki, ewentualnie zmieszanej z substancją wiążącą, substancją poślizgową, obojętnym rozcieńczalnikiem, substancją powierzchniowo czynną lub substancją dyspergującą. Tabletki formowane można sporządzać przez formowanie związku czynnego z obojętnym płynnym rozcieńczalnikiem. Tabletki mogą być ewentualnie powlekane, jeśli niepowlekane, mogą być z podziałką. Kapsułki można wytwarzać przez napełnianie związkiem czynnym, albo osobno albo z domieszką jednego lub więcej dodatkowych składników, do otoczki kapsułki, po czym zapieczętowane w zwyczajowy sposób. Kapsułki ryżowe są analogiczne do kapsułek, przy czym związek czynny razem z dowolnymi składnikami dodatkowymi jest zapieczętowany w kopercie z papieru ryżowego. Związek czynny może być również sporządzony w postaci granulek ulegających dyspersji, które na przykład mogą być zawieszane w wodzie przed podaniem lub posypane na żywność. Granulki mogą być pakowane, np. w saszetki. Formulacje odpowiednie do podawania doustnego, w których nośnik jest płynny, mogą występować w postaci roztworu lub zawiesiny w cieczy wodnej lub bezwodnej albo w postaci ciekłej emulsji typu olej w wodzie.

[0090] Formulacje do podawania doustnego obejmują formy dawkowania o kontrolowanym uwalnianiu, np., tabletki, w których związek czynny jest sporządzony w odpowiedniej matrycy o kontrolowanym uwalnianiu, albo jest powlekany odpowiednią powłoczką o kontrolowanym uwalnianiu.

Takie formulacje mogą być dogodne do stosowania profilaktycznego.

[0091] Formulacje farmaceutyczne odpowiednie do podawania doodbytniczego, w których nośnik jest ciałem stałym, najbardziej korzystnie występują w postaci jednostek dawkowania w czopkach. Odpowiednie nośniki obejmują masło kakaowe lub inne substancje zwyczajowo stosowane w tej dziedzinie. Czopki można

dogodnie sporządzać przez zmieszanie związku czynnego ze zmiękczonej lub stopionym nośnikiem, a następnie schłodzenie i ukształtowanie w formach.

[0092] Formułacje farmaceutyczne odpowiednie do pozajelitowego podawania obejmują jałowe roztwory lub zawiesiny związku czynnego w wodnych lub olejowych podłożach.

[0093] Formułacje farmaceutyczne według wynalazku są odpowiednie do podawania do oczu, w szczególności do podawania wewnątrzgałkowego, miejscowego do oczu, okołooocznego, bardziej korzystnie do podawania miejscowego do oczu lub okołooocznego.

[0094] Preparaty do wstrzykiwań mogą być dostosowane do wstrzykiwań w bolusie lub do infuzji ciągłej. Takie preparaty dogodnie występują w pojemnikach dawek jednostkowych lub dawek wielokrotnych, które są zapieczętowane po wprowadzeniu formułacji aż do czasu ich użycia. Alternatywnie związek czynny może być w postaci proszku, który jest konstytuowany przed użyciem z odpowiednim podłożem, takim jak jałowa, pozbawiona pirogenów woda.

[0095] Związek czynny może być również sporządzony w postaci długodziałającego preparatu depot, który może być podawany przez iniekcję domięśniową lub przez implantację, np., podskórną lub domięśniową. Preparaty depot mogą obejmować, na przykład, odpowiednie materiały polimerowe lub hydrofobowe albo żywice jonowymienne. Takie długodziałające formułacje są zwłaszcza dogodne do stosowania profilaktycznego.

Formułacje odpowiednie do podawania do płuc via przedsionek jamy ustnej występują, tak że cząstki zawierające związek czynny i korzystnie mające średnicę w zakresie od 0,5 do 7 mikronów, są podawane do drzewa oskrzelowego odbiorcy. Jedną możliwością jest, że takie formułacje są w postaci doskonale rozdrobnionych proszków, które dogodnie występują albo w kapsułce do przebijania, odpowiednio np. żelatynowej, do stosowania w urządzeniu do inhalacji, albo alternatywnie jako samonośne formułacje zawierające związek czynny, odpowiedni ciekły lub gazowy propelent i ewentualnie inne składniki, takie jak substancja powierzchniowo czynna lub stały rozcieńczalnik. Odpowiednie płynne propelenty obejmują propan i chlorofluorowęgle, a odpowiednie gazowe propelenty obejmują dwutlenek węgla. Samonośne formułacje można również stosować gdy związek czynny jest zdyspergowany w postaci kropelek roztworu lub zawiesiny.

[0096] Takie samonośne formułacje są analogiczne do tych znanych ze stanu techniki i można je wytwarzać zgodnie z ustalonymi procedurami. Odpowiednio występują one w pojemniku zaopatrzonym w manualnie uruchamiany lub automatycznie funkcjonujący zawór posiadający pożądane cechy do wytwarzania areozolu; korzystnie zawór jest typu odmierzającego dostarczającą ustaloną objętość, na przykład, 25 do 100 mikrolitrów, przy każdej operacji.

[0097] Istnieje ponadto możliwość, aby związek czynny był w postaci roztworu lub zawiesiny do stosowania w atomizerze lub nebulizatorze, w którym przyspieszony strumień powietrza lub mieszanie ultradźwiękowe stosuje się do wytwarzania drobnych kropelek mgły do inhalacji.

[0098] Formułacje odpowiednie do podawania do nosa obejmują preparaty na ogół podobne do opisanych do podawania do płuc. Gdy są zdyspergowane takie formułacje powinny mieć pożądaną średnicę cząstki w zakresie od 10 do 200 mikronów w celu umożliwienia zatrzymania w jamie nosa; można to osiągnąć, jeśli to stosowane, przez używanie proszku o odpowiednim rozmiarze cząstki lub przez dobór odpowiedniego zaworu. Inne odpowiednie formułacje obejmują grube proszki posiadające średnicę cząstki w zakresie od 20 do 500 mikronów, do podawania drogą szybkiej inhalacji przez jamę nosową z pojemnika trzymanego tuż

przy nosie, i krople donosowe zawierające od 0,2 to 5% wag/obj. związku czynnego w wodnym lub oleistym roztworze lub zawieszynie.

[0099] Farmaceutycznie dopuszczalne nośniki są dobrze znane specjalistom w tej dziedzinie i obejmują, ale nie są do nich ograniczone, 0,1 M i korzystnie 0,05 M bufor fosforanowy lub 0,8% sól fizjologiczną. Ponadto takie farmaceutycznie dopuszczalne nośniki mogą stanowić wodne lub niewodne roztwory, zawiesiny i emulsje. Przykładami niewodnych rozpuszczalników są glikol propylenowy, glikol polietylenowy, oleje roślinne, takie jak oliwa, i przydatne do iniekcji estry organiczne, jak oleinian etylu. Nośniki wodne obejmują wodę, roztwory alkoholowo-wodne, emulsje lub zawiesiny, w tym sól fizjologiczną i roztwory buforowane. Podłoża do podawania pozajelitowego obejmują roztwór chlorku sodu, dekstrozy Ringera, dekstrozy i chlorku sodu, roztwór Ringera z dodatkiem mleczanu lub nietłotne oleje. Mogą również występować konserwanty i inne substancje dodatkowe, takie jak na przykład, środki przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające, środki chelatujące, gazy obojętne i podobne.

[0100] Formulacje odpowiednie do podawania miejscowego mogą na przykład obejmować żele, kremy lub maści. Takie preparaty można stosować np. na rany lub owrzodzenia, albo bezpośrednio rozprzestrzeniane na powierzchni rany lub owrzodzenia, albo nanoszone na odpowiednim podłożu, takim jak bandaż, gaza, siatka i tym podobne, które można aplikować na lub nad powierzchnią poddaną leczeniu.

[0101] Formulacje płynne lub proszkowe mogą obejmować te, które można rozpylać na lub posypywać nimi bezpośrednio miejsce do leczenia, np. ranę lub owrzodzenie. Alternatywnie nośnik, taki jak bandaż, gaza lub siatka lub podobne, mogą być nasycone lub posypane formacją, a następnie zastosowane na miejsce do leczenia.

[0102] Zgodnie z dalszym aspektem wynalazku, przedmiotem jest sposób wytwarzania kompozycji farmaceutycznej lub weterynaryjnej, jak opisano powyżej, obejmujący doprowadzenie do połączenia związku(ów) czynnego(ych) z nośnikiem, na przykład przez zmieszanie.

[0103] Na ogół formulacje wytwarza się przez równomierne i dokładne doprowadzenie do połączenia środka czynnego z płynnymi nośnikami lub dokładnie rozdrobnionymi stałymi nośnikami albo oboma, a następnie, jeśli jest to pożądane, uformowanie produktu. Wynalazek rozciąga się na sposoby wytwarzania kompozycji farmaceutycznych dostarczającej związek o wzorze ogólnym (I) razem lub w połączeniu z farmaceutycznie lub weterynaryjnie dopuszczalnym nośnikiem lub podłożem.

Sole/estry

[0104] Związki według wynalazku mogą występować w postaci soli lub estrów, szczególnie w postaci farmaceutycznie lub weterynaryjnie dopuszczalnych soli lub estrów.

Farmaceutycznie dopuszczalne sole związków według wynalazku obejmują odpowiednie ich sole addycyjne z kwasem lub zasadą. Przegląd odpowiednich soli farmaceutycznych można znaleźć w publikacji Berge i in., J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Sole tworzy się, na przykład, z silnymi kwasami nieorganicznymi, takimi jak kwasy mineralne, np. kwasy fluorowcowodorowe, jak kwas chlorowodorowy, bromowodorowy i jodowodorowy, z kwasem siarkowym, kwasem fosforowym, wodorosiarczan, hemisiarczan, tiocyjanian, nad(tlenodi)siarczan, fosforan i sulfonian; z silnymi karboksylowymi kwasami organicznymi, takimi jak kwasy alkanokarboksylowe o 1 do 4 atomach węgla, które są niepodstawione lub podstawione (np., fluorowcem), takie jak kwas octowy; z nasyconymi lub nienasyconymi kwasami dikarboksylowymi, na przykład szczawiovym, malonowym, bursztynowym, maleinowym, fumarowym, ftalowym lub tetraftalowym; z kwasami hydroksykarboksylowymi, na przykład kwasem askorbinowym, glikolowym, mlekowym, jabłkowym, winowym lub cytrynowym; z aminokwasami, na przykład kwasem asparginowym lub

glutaminowym; z kwasem benzoesowym; lub organicznymi kwasami sulfonowymi, takimi jak kwasy (C₁-C₄)-alkilo- lub arylo-sulfonowe, które są niepodstawione lub podstawione (na przykład, przez fluorowiec) takimi jak kwas metano- lub p-toluenosulfonowy. Sole, które nie są farmaceutycznie lub weterynaryjnie dopuszczalne mogą również być wartościowe jako związki pośrednie.

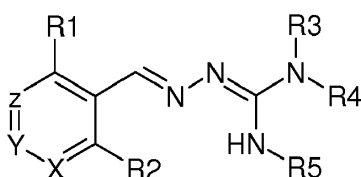
[0105] Korzystne sole obejmują, na przykład, octan, trifluoroctan, mleczan, glukonian, cytrynian, winian, maleinian, jabłczan, pantoteinian, adypinian, asparaginian, benzoesan, maślan, diglukonian, cyklopentanian, glukohoheptanian, glicerofosforan, szczawian, heptanonian, heksanonian, fumaran, nikotynian, palmitynian, pektynian, 3-fenylpropionian, pikrynian, piwalonian, proprionian, winian, laktobionian, kamforonian, undekanonian i bursztynian, sole organicznych kwasów sulfonowych, takie jak metanosulfonian, etanosulfonian, 2-hydroksyetasulfonian, kamforsulfonian, 2-naftalenosulfonian, benzenosulfonian, p-chlorobenzenosulfonian i p-toluenosulfonian; i sole z kwasami nieorganicznymi, takie jak chlorowodorek, bromowodorek, jodowodorek, siarczan, wodorosiarczan, hemisiarczan, tiocyjanian, nad(tlenodi)siarczan, fosforan i sulfonian.

[0106] Estry tworzy się stosując albo kwasy organiczne albo alkohole/wodorotlenki, w zależności od grupy funkcyjnej, którą poddaje się estryfikacji. Kwasy organiczne obejmują kwasy karboksylowe, takie jak kwasy alkanokarboksylowe o 1 do 12 atomach węgla, które są niepodstawione lub podstawione (np., przez fluorowiec), takie jak kwas octowy; nasycone lub nienasycone kwasy dikarboksylowe, na przykład szczawiowy, malonowy, bursztynowy, maleinowy, fumarowy, ftalowy lub tetratafowy; kwasy hydroksykarboksylowe, na przykład askorbinowy, glikolowy, mlekowy, jabłkowy, winowy lub cytrynowy; aminokwasy, na przykład kwas asparaginowy lub glutaminowy; kwas benzoesowy; lub organicznymi kwasami sulfonowymi, takie jak kwasy (C₁-C₄)-alkilo- lub arylo-sulfonowe, które są niepodstawione lub podstawione (na przykład, przez fluorowiec), takie jak kwas metano- lub p-toluenosulfonowy. Odpowiednie wodorotlenki obejmują nieorganiczne wodorotlenki, takie jak wodorotlenek sodu, wodorotlenek glinu. Alkohole obejmują alkanoalkohole o 1-12 atomach węgla, które mogą być niepodstawione lub podstawione (np. przez fluorowiec).

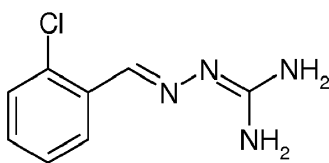
ENANCJOMERY/AUTOMERY

[0107] We wszystkich aspektach wynalazku poprzednio omawianych, wynalazek obejmuje, gdy jest to odpowiednie, wszystkie enancjomery, diastereoizomery i tautomery związków według wynalazku. Specjalista w tej dziedzinie rozpoznaje związki wykazujące właściwości optyczne (mające jeden lub więcej chiralnych atomów węgla) lub cechy tautomerii. Odpowiadające enancjomery i/albo tautomery można wyodrębnić/wytwarzać sposobami znanymi ze stanu techniki. Enancjomery charakteryzują się konfiguracją absolutną centrów chiralnych i opisane są za pomocą Cahn, Ingolda i Preloga reguł pierwszeństwa R- i S-konfiguracji. Takie konwencje nazewnictwa są dobrze znane w stanie wiedzy (np. zob. 'Advanced Organic Chemistry', 3. edycja, wyd. March, J., John Wiley and Sons, New York, 1985).

[0108] Związki o wzorze (I) zatem obejmują również formy tautomeryczne o wzorze:



[0109] Jako przykład ilustracyjny, forma tautomeryczna przykładu 1 jest:



[0110] Związki według wynalazku zawierające centrum chiralne można stosować w postaci mieszaniny racemicznej, mieszaniny enancjomerycznie wzbogaconej albo mieszaninę racemiczną można rozdzielić z użyciem dobrze znanych metod i oddzielny enancjomer można stosować osobno.

Izomery stereo i geometryczne

[0111] Niektóre ze związków według wynalazku mogą występować jako stereoizomery i/albo izomery geometryczne - np. mogą one posiadać jeden lub więcej centrów asymetrii i/albo centrów geometrycznych i dlatego mogą występować w dwóch lub więcej postaciach stereoizomerycznych i/albo geometrycznych. Niniejszy wynalazek obejmuje zastosowanie wszystkich oddzielnych stereoizomerów i izomerów geometrycznych tych inhibitorów i ich mieszanin. Określenia stosowane w zastrzeżeniach obejmują te postaci, pod warunkiem, że postaci te zachowują odpowiednią aktywność funkcjonalną (ale niekoniecznie w tym samym stopniu).

[0112] Niniejszy wynalazek obejmuje również wszystkie odpowiednie odmiany izotopowe środka lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli. Odmiana izotopowa środka według niniejszego wynalazku lub jego farmaceutycznie dopuszczalnej soli, jest określana jako taka, w której co najmniej jeden atom jest zastąpiony atomem posiadającym tę samą liczbę atomową, ale inną masę atomową niż masa atomowa zwykle występująca w naturze. Przykłady izotopów, które można wprowadzić do środka lub jego farmaceutycznie dopuszczalnych soli, obejmują izotopy wodoru, węgla, azotu, tlenu, fosforu lub chloru, takie jak odpowiednio ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F i ^{36}Cl . Pewne odmiany izotopowe środka i jego farmaceutycznie dopuszczalnych soli, na przykład, te, w których jest wprowadzony izotop radioaktywny, taki jak ^3H lub ^{14}C , są użyteczne w leku i/albo w badaniach dystrybucji tkankowej substratu. Izotopy trytu, to znaczy, ^3H , i węgla 14, to znaczy, ^{14}C , są szczególnie korzystne ze względu na łatwość wytwarzania i wykrywania. Ponadto podstawienie izotopami, takimi jak deuter, to znaczy, ^2H , może dostarczać pewnych korzyści terapeutycznych wynikających z większej stabilności metabolicznej, na przykład, zwiększonego czasu półtrwania *in vivo* lub zmniejszonych wymagań dawkowania i dlatego może być korzystne w pewnych okolicznościach. Na przykład, wynalazek obejmuje związki o wzorze ogólnym (I), gdzie każdy atom wodoru został zastąpiony przez atom deuteru. Odmiany izotopowe środka według niniejszego wynalazku i jego farmaceutycznie dopuszczalnych soli według wynalazku można na ogół wytwarzać zgodnie z konwencjonalnymi procedurami stosując właściwe odmiany izotopowe odpowiednich reagentów.

Proleki

[0113] Związki według niniejszego wynalazku mogą być w postaci proleku, to znaczy w postaci kowalencyjnie związanych związków, które uwalniają czynny lek macierzysty o wzorze ogólnym (I) *in vivo*. Takie proleki stanowią na ogół związki według wynalazku, w których jedna lub więcej odpowiednia grupa została zmodyfikowana tak, że modyfikacja może być odwracalna po podaniu pacjentowi będącemu człowiekiem lub innym ssakiem. Rewersja zwykle przeprowadzana jest za pomocą enzymu naturalnie występującego u pacjenta, aczkolwiek możliwe jest podanie drugiego środka razem z prolekiem w celu przeprowadzenia rewर्सji *in vivo*. Przykłady takich modyfikacji obejmują ester (na przykład, dowolny z tych opisanych powyżej), przy czym rewर्सję można prowadzić z esterazą etc. Inne takie układy znane są specjalistom w tej dziedzinie.

Solwaty

[0114] Związki według niniejszego wynalazku mogą być w postaci solwatów.

Polimorfy

[0115] Związki według wynalazku mogą występować w różnych postaciach krystalicznych, postaciach polimorficznych i postaciach (nie)hydratowanych. Jest dobrze ugruntowane w przemyśle farmaceutycznym, że związki chemiczne można wyodrębnić w dowolnej z takich postaci za pomocą nieznanymi różniących się sposobów oczyszczania lub wyodrębniania postaci z rozpuszczalników stosowanych w procesie syntezy tych związków.

Podawanie

[0116] Kompozycje farmaceutyczne według niniejszego wynalazku mogą być przystosowane do podawania drogą doodbytniczą, do nosa, dooskrzelową, miejscową (włączając drogę dopoliczkową, podjęzykową i do oczu, w szczególności do podawania wewnątrzgałkowego, miejscowego do oczu, okołooocznego), dopochwową lub pozajelitową (włączając podawanie podskórne, dożylnie, domięśniowe, dotętnicze i śródskórne), wewnątrztrzewnową lub dooponową. Korzystnie formułacja stanowi formułację do podawania doustnego. Formułacje mogą dogodnie występować w jednostkowych postaciach dawkowania to znaczy, w postaci oddzielnych porcji zawierających jednostkową dawkę, dawkę wielokrotną lub podjednostki dawki jednokrotnej. Przykładowo formułacje mogą być w postaci tabletek i kapsułek o podtrzymywanym uwalnianiu, i mogą być sporządzane sposobami dobrze znanymi w dziedzinie farmacji.

[0117] Formułacje do podawania doustnego według niniejszego wynalazku mogą występować w jednostkowych postaciach dawkowania, takich jak kapsułki, kapsułki twarde, krople, opłatki, pastylki i tabletki, każda zawierająca ustaloną ilość składnika czynnego; jak proszki lub granulki; jak roztwór, emulsja lub zawiesina składnika czynnego w cieczy wodnej lub niewodnej; lub jak płynna emulsja olej w wodzie lub woda w oleju; lub jak bolus *etc.* Korzystnie, kompozycje te zawierają od 1 do 250 mg i bardziej korzystnie od 10 do 100 mg, składnika czynnego na dawkę.

[0118] Dla kompozycji do podawania doustnego (np. tabletek lub kapsułek), określenie „dopuszczalny nośnik” obejmuje podłoże, takie jak zwyczajowe substancje pomocnicze np. substancje wiążące, na przykład syrop, guma akacjowa, żelatyna, sorbitol, tragakanta, poliwinylpirolidon (Powidon), metyloceluloza, etyloceluloza, karboksymetyloceluloza sodowa, hydroksypropylometyloceluloza, sacharoza i skrobia; substancje wypełniające i nośniki, na przykład skrobia kukurydziana, żelatyna, laktoza, sacharoza, celuloza mikrokrystaliczna, kaolin, mannitol, fosforan dwuwapniowy, chlorek sodu i algininian sodu; i substancje poślizgowe, jak stearynian magnezu, stearynian sodu i inne stearyniany metali, stearynian glicerolu, kwas stearynowy, krzemionka fluidalna, olej silikonowy, talk, woski, oleje i krzemionka koloidalna. Można również stosować substancje poprawiające smak i zapach, takie jak mięta, olej z roślin typu Wintergreen, smak wiśniowy i podobne. Może być też pożądanym dodanie środka koloryzującego w celu uczynienia postaci dawkowania łatwo rozpoznawalnej. Tabletki można również powlekać metodami dobrze znanymi w stanie techniki.

[0119] Tabletki można sporządzać przez prasowanie lub formowanie, ewentualnie z jednym lub więcej dodatkowym składnikiem. Tabletki prasowane można wytwarzać przez prasowanie w odpowiednim urządzeniu związku aktywnego w postaci sypkiej, takiej jak proszek lub granulki, ewentualnie zmieszanej z substancją wiążącą, substancją poślizgową, obojętnym rozcieńczalnikiem, substancją powierzchniowo czynną lub substancją dyspergującą. Tabletki formowane można sporządzać przez formowanie w odpowiednim urządzeniu mieszaniny sproszkowanego związku zwilżonego z obojętnym płynnym

rozcieńczalnikiem. Tabletki mogą być ewentualnie powlekane lub dzielone i mogą być formułowane tak, aby zapewnić powolne lub kontrolowane uwalnianie środka czynnego.

[0120] Inne formułacje odpowiednie do podawania doustnego obejmują tabletki do ssania zawierające środek czynny w bazie smakowej, zwykle sacharozie i gumie akacjowej lub tragakancie; pastylki zawierające środek czynny w obojętnej bazie takiej jak żelatyna lub gliceryna, albo sacharoza i guma akacjowa; i płyny do płukania ust zawierające środek czynny w odpowiednim płynnym nośniku.

[0121] Inne postaci do podawania obejmują roztwory lub emulsje, które można wstrzykiwać drogą dożylną, dotętniczą, dokanałową, podskórną, śródskórną, wewnątrztrzewnową, wewnątrzgałową, miejscową, okołoczną lub domięśniową, i które sporządza się z jałowych lub poddawanych sterylizacji roztworów. Postaci do wstrzykiwań zwyczajowo zawierają od 10 do 1000 mg, korzystnie od 10 do 250 mg, składnika czynnego na dawkę.

[0122] Kompozycje farmaceutyczne według niniejszego wynalazku mogą być również w postaci czopków, globulek, zawiesin, emulsji, lotonów, maści, kremów, żeli, areozoli, roztworów lub proszków do opylania.

[0123] Alternatywnym sposobem podawania przezskórnego jest stosowanie plastra na skórę. Na przykład, składnik czynny może być wprowadzony do kremu zawierającego wodną emulsję glikoli polietylenowych lub ciekłej parafiny. Składnik czynny może być również wprowadzony, w stężeniu pomiędzy 1 i 10% wag., do maści zawierającej bazę białego wosku lub białej miękkiej parafiny razem z takimi substancjami stabilizującymi lub konserwantami, które mogą być wymagane.

Dawkowanie

[0124] Osoba o zwykłych umiejętnościach w tej dziedzinie potrafi łatwo określić odpowiednią dawkę jednej z gotowych kompozycji do podawania pacjentowi bez zbędnego eksperymentowania. Zwykle lekarz określi rzeczywistą dawkę, która będzie najbardziej odpowiednia dla indywidualnego pacjenta i będzie zależęć od wielu czynników, włączając aktywność konkretnego zastosowanego związku, stabilność metaboliczną i długość działania tego związku, wiek, masę ciała, ogólny stan zdrowia, płeć, dietę, tryb i czas podawania, szybkość wydalania, połączenie leków, ciężkość poszczególnego stanu i przebieg indywidualnej terapii. Dawkowania ujawnione w niniejszym opisie są przykładowe dla przeciętnego przypadku. Mogą występować oczywiście indywidualne przypadki, gdy wyższe lub niższe zakresy dawek są zalecane i są one objęte zakresem niniejszego wynalazku.

[0125] Zgodnie z niniejszym wynalazkiem skuteczną ilość związku o wzorze ogólnym (I) można podawać do kierowania do poszczególnego stanu lub choroby. Oczywiście to dawkowanie będzie dalej modyfikowane zgodnie ze sposobem podawania związku. Na przykład, do osiągnięcia „skutecznej ilości” w intensywnej terapii korzystne jest podawanie związku o wzorze ogólnym (I) drogą pozajelitową. Najbardziej skuteczną jest dożylna infuzja związku w 5% dekstrozie w wodzie lub w roztworze soli fizjologicznej albo podobna formułacja z odpowiednimi substancjami pomocniczymi, aczkolwiek stosuje się również domięśniowe wstrzyknięcie bolusa. Typowo dawka pozajelitowa będzie wynosić od około 0,01 do około 100 mg/kg; korzystnie pomiędzy 0,1 do 20 mg/kg, w trybie utrzymania stężenia leku w osoczu na poziomie skutecznym.

[0126] Związki można podawać jeden do czterech razy dziennie w ilości do osiągnięcia całkowitej dobowej dawki od około 0,4 do około 400 mg/kg/dobę. Dokładną ilość związku, która jest terapeutycznie skuteczna oraz najlepszą dla związku drogę podawania łatwo ustali specjalista w tej dziedzinie przez zbilansowanie stężenia leku we krwi, które jest wymagane do uzyskania skutku terapeutycznego.

[0127] Związki według niniejszego wynalazku można podawać doustnie pacjentowi, w taki sposób, że stężenie leku jest wystarczające do osiągnięcia jednego lub więcej wskazań terapeutycznych tu

ujawnionych. Zwykle kompozycję farmaceutyczną zawierającą związek podaje się w dawce doustnej od około 0,1 do około 50 mg/kg w sposób odpowiadający stanowi pacjenta. Korzystnie dawka doustna wynosi od około 0,1 do około 20 mg/kg.

[0128] Oczekuje się, że nie występują żadne niedopuszczalne toksyczne działania, gdy podaje się związki według niniejszego wynalazku w zgodności z wynalazkiem. Związki według niniejszego wynalazku, które mogą wykazywać dobrą dostępność biologiczną, można badać w jednym z kilku testów biologicznych w celu określenia stężenia związku, które jest wymagane do uzyskania podanego skutku farmakologicznego.

Połączenia

[0129] W szczególnie korzystnym wykonaniu jeden lub więcej związków według wynalazku podaje się w połączeniu z jednym lub więcej innymi środkami czynnymi, na przykład, istniejącymi lekami dostępnymi na rynku. W takich przypadkach związki według wynalazku można podawać kolejno, jednocześnie lub seryjnie z jednym lub więcej innymi środkami czynnymi.

[0130] Leki na ogół są bardziej skuteczne, gdy stosuje się je w połączeniu. W szczególności terapia skojarzona jest pożądana w celu uniknięcia nakładania się głównych toksyczności, mechanizmu działania lub mechanizmu(ów) oporności. Ponadto pożądanym jest również podawanie większości leków w ich maksymalnie tolerowanych dawkach przy minimalnych odstępach czasu pomiędzy tymi dawkami. Główne korzyści łączenia leków są takie, że może to promować addytywne lub pozytywne synergistyczne działania przez oddziaływania biochemiczne, a także może zmniejszać powstawanie oporności.

[0131] Korzystne połączenia można zaproponować badając aktywności hamujące testowanych związków razem ze środkami znanymi lub przypuszczalnie dającymi korzyść w leczeniu konkretnego zaburzenia. Tę procedurę można również stosować w celu określenia kolejności podawania środków, to znaczy przed, jednocześnie albo po podaniu. Taki typ podawania może cechować wszystkie środki czynne tu ujawnione.

Test

[0132] Ujawniono również zastosowanie w teście związku jak opisano powyżej w celu identyfikacji dalszych kandydatów związków mogących hamować PPP1 R15A-PP1.

[0133] Korzystnie, test stanowi test wiązania kompetycyjnego.

[0134] Bardziej korzystnie, test wiązania kompetycyjnego obejmuje skontaktowanie związku według wynalazku z PPP1 R15A-PP1 oraz kandydata związku i wykrycie jakiegokolwiek zmiany w interakcji pomiędzy związkiem według wynalazku i PPP1 R15A-PP1.

[0135] Korzystnie, kandydat związku tworzy się z zastosowaniem konwencjonalnej modyfikacji SAR związku według wynalazku.

[0136] Jak stosuje się w niniejszym opisie określenie „konwencjonalna modyfikacja SAR” odnosi się do standardowych sposobów znanych w stanie techniki zmieniania podanego związku na drodze chemicznej derywatyzacji.

[0137] Zatem zidentyfikowany związek działa jak model (na przykład, szablon) do opracowania innych związków. Związki stosowane w takim teście mogą być wolne w roztworze, unieruchomione na stałym nośniku, wsparte na powierzchni komórki lub ulokowane wewnątrz komórki. Można mierzyć zniesienie aktywności lub tworzenie wiązań kompleksów pomiędzy związkiem i badanym środkiem.

[0138] Test może być badaniem przesiewowym, podczas którego bada się pewną liczbę środków. W jednym aspekcie metoda badania według niniejszego wynalazku jest badaniem przesiewowym o wysokiej wydajności.

[0139] Ujawniono również zastosowanie kompetycyjnych testów przesiewowych leków, w których neutralizujące przeciwciała zdolne do wiązania związku specyficznie konkurują z badanym związkiem o wiązanie ze związkiem.

[0140] Inna technika badań przesiewowych zapewnia wysokowydajną analizę (ang. high throughput screening HTS) środków wykazujących powinowactwo wiązania do substancji i jest oparta na metodzie opisanej szczegółowo WO 84/03564.

[0141] Oczekuje się, że metody badań jak tu opisane będą odpowiednie zarówno do badań przesiewowych badanych związków w małej i dużej skali, jak i do oznaczeń ilościowych.

[0142] Korzystnie, test badania kompetycyjnego obejmuje skontaktowanie związku według wynalazku z PPP1 R15A-PP1 w obecności znanego substratu dla PPP1 R15A-PP1 i wykrywanie jakiegokolwiek zmiany w interakcji pomiędzy tym PPP1 R15A-PP1 i tym znanym substratem.

[0143] Ujawniono również sposób wykrywania wiązania ligandu do PPP1 R15A-PP1, sposób obejmujący etapy:

- (i) skontaktowanie ligandu z PPP1 R15A-PP1 w obecności znanego substratu
- (ii) wykrywanie dowolnej zmiany interakcji pomiędzy PPP1 R15A-PP1 i wspomnianym znanym substratem;

i w którym wspomniany ligand stanowi związek według wynalazku.

[0144] Ujawniono również sposób obejmujący etapy:

- (a) przeprowadzenia metody badania opisanego powyżej;
- (b) zidentyfikowania jednego lub więcej ligandów zdolnych do wiązania do domeny wiążącej ligand; i
- (c) przygotowania pewnej ilości jednego lub więcej ligandów.

[0145] Ujawniono również sposób obejmujący etapy:

- (a) przeprowadzenia metody badania opisanego powyżej;
- (b) zidentyfikowania jednego lub więcej ligandów zdolnych do wiązania do domeny wiążącej ligand; i
- (c) przygotowania kompozycji farmaceutycznej zawierającej jeden lub więcej ligandów.

[0146] Ujawniono również sposób obejmujący etapy:

- (a) przeprowadzenia metody badania opisanego powyżej;
- (b) zidentyfikowania jednego lub więcej ligandów zdolnych do wiązania do domeny wiążącej ligand;
- (c) zmodyfikowania jednego lub więcej ligandów zdolnych do wiązania do domeny wiążącej ligand;
- (d) przeprowadzenia metody badania opisanego powyżej;
- (e) ewentualnie przygotowania kompozycji farmaceutycznej zawierającej jeden lub więcej wspomnianych ligandów.

[0147] Ujawniono również ligand zidentyfikowany metodą opisaną powyżej.

[0148] Ujawniono również kompozycje farmaceutyczną zawierającą ligand zidentyfikowany metodą opisaną powyżej.

[0149] Ujawniono również zastosowanie ligandu zidentyfikowanego metodą opisaną powyżej do przygotowania kompozycji farmaceutycznej do zastosowania do leczenia zaburzenia związanego z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, jak określono powyżej.

[0150] Powyższa metoda może być stosowana do badania przesiewowego liganda użytecznego jako inhibitor PPP1 R15A-PP1.

[0151] Związki o wzorze ogólnym (I) są użyteczne zarówno jako narzędzia laboratoryjne jak i środki lecznicze. W laboratorium pewne związki według wynalazku są użyteczne do ustalenia, czy znany lub nowo

opracowany kierunek cel przyczynia się zasadniczo lub co najmniej znacząco do funkcji biochemicznej podczas ustalania lub przebiegu stanu chorobowego, proces zwyczajowo referowany jako „validacja docelowa”.

[0152] Niniejszy wynalazek ponadto opisany jest w odniesieniu do następujących figur, w których:

Fig. 1 pokazuje zależną od dawki ochronę komórek HeLa przez związek o wzorze (I), Przykład 1 według wynalazku, przed stresem ER indukowanym przez 6 godzin ekspozycji na tunikamycynę. Zob. opis testu 1.

Fig. 2 pokazuje, że związek o wzorze (I), Przykład 1 według wynalazku, opóźnia powrót translacji w komórkach po stresie. Bardziej szczegółowo, Fig. 2 pokazuje, że translacja jest tłumiona 2h po dodaniu tunikamycyny. Powrót translacji jest widoczny w komórkach traktowanych tylko tunikamycyną. Przykład 1 według wynalazku przedłuża tłumienie translacji w komórkach traktowanych tunikamycyną. Zob. opis testu 3.

Fig. 3 pokazuje, że związek o wzorze (I), Przykład 1 według wynalazku, odwrotnie niż guanabenz, nie wykazuje aktywności wobec receptora adrenergicznego $\alpha 2A$, jak określono zgodnie z testem funkcjonalnym dla receptora adrenergicznego $\alpha 2A$. Zob. opis testu 5.

Fig. 4 pokazuje, że związek o wzorze (I), Przykład 1 według wynalazku, zapobiega pozostawaniu w ER P0S63del, zmutowanego białka związanego z Charcot Marie Tooth 1 B. Oś Y: liczba komórek. UT: nie traktowane.

Fig. 5 pokazuje, że związek o wzorze (I), Przykład 1 według wynalazku, zmniejsza gromadzenie dwóch niepowiązanych, wywołujących chorobę, nieprawidłowo sfałdowanych białek: amino-końcowego fragmentu zmutowanej huntingtyny (Htt48Q) związanego z chorobą Huntingtona i zmutowanego SOD1 (A4V), związanego ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Oś Y: procent gromadzenia białek, w stosunku do komórek nie traktowanych. UT: nie traktowane.

Fig. 6 pokazuje, że związek o wzorze (I), Przykład 1 według wynalazku, zmniejsza gromadzenie zmutowanej rodopsyny P23H związanej z retinopatią barwnikową. Oś Y: liczba komórek. UT: nie traktowane.

[0153] Niniejszy wynalazek jest ponadto opisany w odniesieniu do następujących przykładów, nie stanowiących jego ograniczenia.

Przykłady

Metody i materiały

[0154]

Przykład 1 zakupiono w Chemdiv ref: 1683-6588

Przykład 2 zakupiono w Chembridge ref: 5173161

Przykład 4 zakupiono w Enamine ref: Z49562642

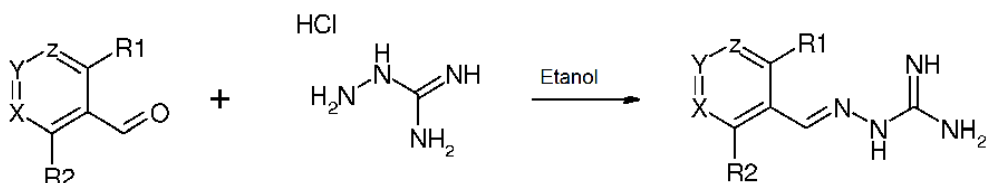
Przykład 6 zakupiono w Chemdiv ref: 1683-6502

Wytwarzanie związków według niniejszego wynalazku

[0155] Reagenty i związki handlowe zostały zakupione z Acros Organics, Sigma-Aldrich. Związki według niniejszego wynalazku można wytwarzać zgodnie z następującą procedurą ogólną:

Procedura ogólna A:

[0156]



[0157] Do roztworu benzaldehydu (1 równ.) w etanolu (300 ml) kolejno dodawano chlorowodorek aminoguanidyny (1 równ.) i roztwór octanu sodu (1 równ.) w temperaturze 25°C. Powstałą mieszaninę ogrzewano w temperaturze 80°C przez następne ~ 6 godzin. Zakończenie reakcji monitorowano metodą TLC stosując dichlorometan/metanol (8/2) jako fazę ruchomą. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcją pozostawiono do ochłodzenia do temperatury 25°C i wylano do nasyconego roztworu NaHCO₃(700 ml). Powstały osad odsączono pod próżnią i przemyto wodą (100 ml). Powstałe ciało stałe roztało z eterem dietylowym (2 x 25 ml) i wysuszono pod próżnią do uzyskania pożądanego pochodnej podstawionej aminoguanidyny.

[0158] Następujące związki wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A:

Przykład 1: 1-[(E)-[(2-chlorofenilo)metylideno]amino]-guanidyna

[0159] Wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A wychodząc z 2-chlorobenzaldehydu. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 5,61 (s, 2H); 6,06 (s, 2H); 7,22-7,32 (m, 2H); 7,40 (dd, 1 H); 8,15 (dd, 1 H); 8,28 (s, 1 H); MS (ESI+): *m/z*= 197,4 [M+H]⁺

Przykład 3: 1-[(E)-[(2-fluorofenilo)metylideno]amino]-guanidyna

[0160] Wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A wychodząc 2-fluorobenzaldehydu.

Przykład 7: 1-[(E)-[(2-chloro-4-fluorofenilo)metylideno]amino]guanidyna

[0161] Wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A wychodząc z 2-chloro-4-fluorobenzaldehydu, z 67% wydajnością. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 5,80 (brs, 2H); 5,84 (brs, 2H); 7,19-7,34 (m, 4H); 8,16 (s, 1 H); MS (ESI+): *m/z*= 215,1 [M+H]⁺

Przykład 13: 1-[(E)-[(3-chloropirydyn-4-ylo)metylideno]amino]guanidyna

[0162] Wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A wychodząc z 3-chloroizonikotynoaldehydu, z 50% wydajnością. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 6,01 (brs, 2H); 6,33 (brs, 2H); 8,10 (d, 1H); 8,14 (s, 1H); 8,37 (dd, 1H); 8,52(s, 1 H); MS (ESI+): *m/z* = 198,4 [M+H]⁺

Przykład 15: 1-[(E)-[(2-chloro-6-fluorofenilo)metylideno]amino]guanidyna

[0163] Wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A wychodząc z 2-chloronikotynoaldehydu, z 56% wydajnością. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 5,84 (brs, 2H); 5,88 (brs, 2H); 7,18-7,35 (m, 3H); 8,16 (s, 1 H); MS (ESI+): *m/z*= 215,4 [M+H]⁺.

Związek pośredni 1: 3-chloro-5-fluoroizonikotynoaldehyd

[0164] Do roztworu N,N-diizopropylaminy (0,864 g, 0,006690 mol) w THF (6 ml) podczas mieszania dodano kroplami w czasie 15 minut n-buLi (1,6M w heksanie) (7,6 ml, 0,012164 mol) w temperaturze -78° C. Powstałą mieszaninę mieszano w temperaturze -78° C przez 15 minut, po czym umożliwiono ogrzanie do temperatury 0° C, podczas czego w dalszym ciągu mieszano przez 1 godzinę. Powstałą mieszaninę reakcyjną ponownie ochłodzono do temperatury -78° C, a następnie kroplami w ciągu 10 minut dodano roztwór 3-chloro-5-fluoropirydyny (0,8 g, 0,006082 mol) w THF (6 ml). Powstałą mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze -78° C przez 1 godzinę, a następnie dodano kroplami mrówczan metylu (0,73 g, 0,012164 mol) w temperaturze -78° C. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze -78° C przez

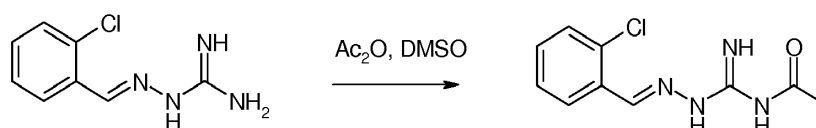
dotatkową 1 godzinę. Reakcję monitorowano metodą TLC stosując heksan: octan etylu (5:5) jako fazę ruchomą. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wylano do nasyconego roztworu NH_4Cl (50 ml) i ekstrahowano octanem etylu (4 x 25 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto zdemineralizowaną wodą (50 ml), solanką (25 ml), wysuszono nad siarczanem sodu i zatężono pod próżnią. Destylacja fazy organicznej dostarczyła pożądany aldehyd (0,6 g, 61,85% wydajność) w surowej postaci. Surowy związek stosowano bezpośrednio w następnym etapie bez żadnej dodatkowej obróbki.

Przykład 16: 1-[(E)-[(3-chloro-5-fluoropirydyn-4-ylo)metylideno]amino]guanidyna

[0165] Wytworzono zgodnie z procedurą ogólną A wychodząc z 3-chloro-5-fluoroizonikotynoaldehydu, z 14% wydajnością. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 5,95-6,30 (m, 4H); 8,10 (s, 1 H); 8,46-8,52 (m, 2H); MS (ESI+): $m/z=216,0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Przykład 8: N-{N-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]karbamimidoilo}acetamid

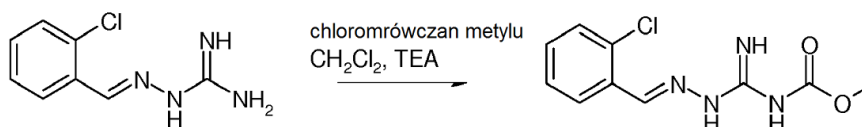
[0166]



[0167] Do roztworu 1-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]-guanidyny (0,50 g, 0,002543 mol) w DMSO (10ml) dodano bezwodnik octowy (0,26 g, 0,002543 mol) w temperaturze 25°C. Powstałą mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 25°C przez następne 15 godzin. Zakończenie reakcji monitorowano metodą TLC stosując dichlorometan/metanol (9,5/0,5) jako fazę ruchomą. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wylano do wody (100 ml) i ekstrahowano octanem etylu (2 x 150ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto solanką (100 ml), wysuszono nad siarczanem sodu, przesączono i zatężono pod próżnią. Powstały surowy produkt następnie oczyszczono metodą chromatografii flash stosując dichlorometan: metanol jako fazę ruchomą, po czym pożądany produkt wymyto około 1,0% metanolem w dichlorometanie. Destylacja frakcji czystego produktu zapewniła N-{N-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]karbamimidoilo}acetamid (0,080 g, 13% wydajność). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 2,97 (s, 3H); 7,25-7,41 (m, 3H); 7,42-7,53 (m, 1H); 7,79 (brs, 1H); 8,22-8,29 (m, 1H); 8,48 (s, 1H); 10,58 (brs, 1H); MS (ESI+): $m/z=239,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Przykład 9: N-{N-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]karbamimidoilo}karbaminian metylu

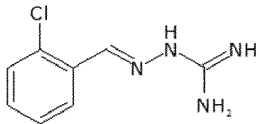
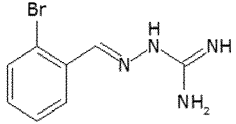
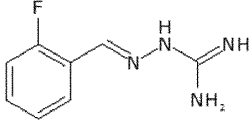
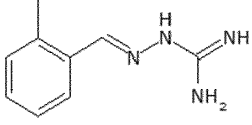
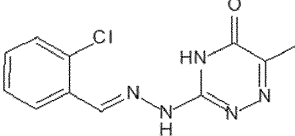
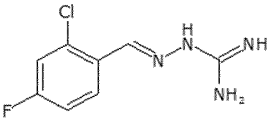
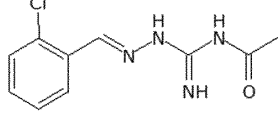
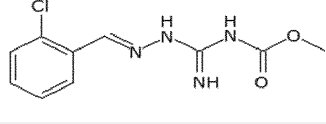
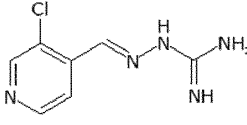
[0168]

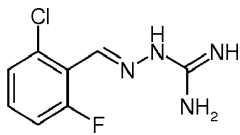
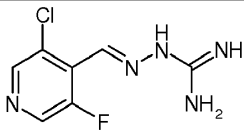


[0169] Do zawiesiny 1-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]-guanidyny (0,15 g, 0,000762 mol) w dichlorometanie (5 ml) dodano trietyloaminę (0,32 ml, 0,002288 mol) w temperaturze 25°C. Powstałą mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 0°C stosując łaźnię lód/sól; następnie dodano do mieszaniny reakcyjnej chloromrówczan metylu (0,09 ml, 0,001144 mol) w temperaturze 0°C. Powstałą mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 godzin. Zakończenie reakcji monitorowano metodą TLC stosując dichlorometan/ metanol (9/1) jako fazę ruchomą. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną wylano do nasyconego roztworu NaHCO_3 (20 ml) i ekstrahowano dichlorometanem (3 x 25 ml). Połączono ekstrakty organiczne przemyto zdemineralizowaną wodą (20 ml), solanką (20 ml), wysuszono nad siarczanem sodu, przesączono i zatężono pod próżnią. Powstały surowy produkt następnie oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej flash stosując dichlorometan: metanol

jako fazę ruchomą, po czym pożądany produkt wymyto około 1,0% metanolem w dichlorometanie. Destylacja frakcji czystego produktu zapewniła N-{N-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]karbamimidoilo} karbaminian metylu (0,065 g, 37% wydajność). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3,60 (s, 3H); 7,34-7,43 (m, 2H); 7,45-7,52 (m, 1 H); 7,67 (brs, 1 H); 7,92 (brs, 1 H); 8,22-8,30 (m, 1 H); 8,44 (s, 1 H); 11,02 (brs, 1 H); MS (ESI+): *m/z*= 255,4 [M+H]⁺

[0170] Wybrane związki według wynalazku przedstawiono w tabeli 1 poniżej:

Związek numer	Wzór	Nazwa chemiczna
Przykład 1		1-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]guanidyna
Przykład 2		1-[(E)-[(2-bromofenylo)metylideno]amino]guanidyna
Przykład 3		1-[(E)-[(2-fluorofenylo)metylideno]amino]guanidyna
Przykład 4		1-[(E)-[(2-metylofenylo)metylideno]amino]guanidyna
Przykład 6		(6-metylo-5-okso-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-3-ylo)hydrazon 2-chlorobenzaldehydu
Przykład 7		1-[(E)-[(2-chloro-4-fluorofenylo)metylideno]amino]guanidyna
Przykład 8		N-{N-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]karbamimidoilo}acetamid
Przykład 9		N-{N-[(E)-[(2-chlorofenylo)metylideno]amino]karbamimidoilo}karbaminian metylu
Przykład 13		1-[(E)-[(3-chloropirydyn-4-ylo)metylideno]amino]guanidyna

Związek numer	Wzór	Nazwa chemiczna
Przykład 15		1-[(E)-[(2-chloro-6-fluorofenylo)metylideno]amino]guanidyna
Przykład 16		1-[(E)-[(3-chloro-5-fluoropirydyn-4-ylo)metylideno]amino]guanidyna

[0171] W niektórych doświadczeniach poniżej, można stosować sole tych związków; na przykład, można stosować sól octanową Przykładu 1 utworzoną z kwasem octowym.

Cytoprotekcja przeciw stresowi ER (Test 1)

[0172] Komórki HeLa hodowano na podłożu Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) wzbogaconej w penicylinę, streptomycynę, zawierającym 5% płodową surowicę bydlęcą (FBS), w temperaturze 37 °C w atmosferze 5% CO₂. Komórki wysiano na płytce 24-dołkowe w gęstości 15 000 komórek/ml, na 24 godziny przed traktowaniem. Stres ER wywołano przez dodanie świeżego podłoża zawierającego 2,5 µg/ml tunikamycyny (Sigma-Aldrich) razem z inhibitorami fosfatazy eIF2α (0,2-5µM). Podłoża zmieniane były 6 h później na świeże podłoża zawierające inhibitory fosfataz (0,2-5µM). Inhibitory rozpuszczono w DMSO (50 mM) i sam DMSO stosowano jako kontrolę. Żywołność komórek oceniano przez pomiar redukcji WST-8 [2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazolium] do formazanu stosując test do pomiaru żywołności komórek Cell Viability Counting Kit-8 (Dojindo) zgodnie z zaleceniami dostawcy, 48 h po traktowaniu tunikamycyną. Cytoprotekcję przeciw stresowi ER mierzy się w odniesieniu do procentowego wzrostu żywołności komórek (w stosunku do kontroli) po stresie ER. Wyniki dla Przykładu 1 według wynalazku przedstawiono na Fig. 1.

Ocena szybkości translacji w komórkach nie poddanych stresowi (Test 2)

[0173] Komórki HeLa (80,000 komórek /ml) wysiano na 12-dołkowe płytce 24 h przed każdym doświadczeniem, po czym albo nie traktowano ich albo traktowano je związkami (50 µM) przez 0,5, 1, 2,5, 5 i 7,5 h. W końcu każdego punktu czasowego dodawano do podłoża hodowlanego 30,6 µCi/ml ³⁵S-metioniny (EasyTag, PerkinElmer) w ciągu 10 min w temperaturze 37 °C. Po oznakowaniu, komórki płukano lodowato zimnym PBS i poddawano lizie w 75 µl buforu Laemmli. Lizaty poddano działaniu ultradźwięków, gotowano w temperaturze 95 °C przez 5 min i rozdzielono na żelach NuPAGE 4-12% gradient. Żele wybarwiano za pomocą Coomassie Brilliant Blue R-250 i analizowano metodą fosforo-obrazowania.

Ocena szybkości translacji w komórkach poddanych stresowi (Test 3)

[0174] Postępowanie przeprowadzono jak w przypadku mierzenia translacji komórek nie poddanych stresowi, z wyjątkiem takim, że do związków dodano tunikamycynę (2,5 µg/ml). Wyniki dla Przykładu 1 według wynalazku przedstawiono na Fig. 3.

Immunoprecypitacja (Test 4)

[0175] Komórki HeLa (80,000 komórek/ml) wysiano dzień przed wprowadzeniem traktowania, transfekowano plazmidami ekspresyjnymi GFP-PPP1 R15A lub FLAG-PPP1 R15B stosując Lipofectamine 2000 (Invitrogen) zgodnie z procedurą wytwórcy. Dwa dni po transfekcji komórki traktowano przez 6 h

związkami (50 μ M), a następnie płukano PBS i poddano lizie w buforze IP (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,2% Triton X-100, 10% glicerol i koktail inhibitora proteazy bez EDTA). Lizaty sklarowano przez odwirowanie przy 15 000 g przez 15 min w temperaturze 4 °C i następnie wyczyszczono na perełkach białka G przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C. Białka poddano immunoprecypitacji za pomocą 1,5 μ l przeciwciała GFP (JL-8, Clontech, 632380), związano do 20 μ l perełek białko-G-sefaroza (GE Healthcare, 17-0618-01). Perełki płukano następnie 3 razy zimnym buforem IP i gotowano w 50 μ l buforu Laemmli (25 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 25 mM DTT, 7,5% glicerolu, 0,05% błękitu bromofenolowego). Immunostrącone kompleksy białkowe (17 μ l) oddzielono na żelach NuPAGE stosując 4-12% gradient (Invitrogen), przeniesiono do Optitran BA-S 83 wzmocnionej błony nitrocelulozowej i wywołano za pomocą GFP i przeciwciał PP1 (sc-7482, Santa Cruz).

Test funkcjonalny akworyny dla receptora adrenergicznego α 2A (Test 5)

[0176] Komórki CHO-K1 współwyrażające mitochondrialną apoakworynę, G α 16 i rekombinowany ludzki receptor adrenergiczny α 2A hodowane do fazy mid-log w podłożu hodowlanym bez antybiotyków, odłączono za pomocą PBS-EDTA, odwirowano i ponownie zawieszono w DMEM/HAM's F12 z HEPES, bez czerwieni fenolowej + 0,1% BSA bufor bez proteazy w stężeniu 1×10^6 komórek/ml. Komórki inkubowano w temperaturze pokojowej przez co najmniej 4 godziny koelenterazyną h. W każdym dniu testu, referencyjnego agonistę (UK14304) badano w celu oceny wyniku testu i określenia EC₅₀. Następnie 50 μ l zawiesiny komórek zmieszano z 50 μ l badanego agonisty w 96-dołkowych płytkach. Powstałą emisję światła rejestrowano przy użyciu luminometru Hamamatsu Functional Drug Screening System 6000. Do standaryzacji emisji rejestrowanego światła (oznaczenie „100% sygnału”) na płytkach i w różnych doświadczeniach, niektóre dołki zawierały 100 μ M digitoniny lub nasycone stężenie AT (20 μ M). Dane dawka –odpowiedź testowanych związków analizowano za pomocą oprogramowania XLfit (IDBS) stosując regresję nieliniową stosowaną do sigmoidalnego modelu dawka-odpowiedź.

[0177] Wynik dla Przykładu 1 według wynalazku przedstawiono na Fig. 4. Korzystnie, w przeciwieństwie do guanabenzu, Przykład 1 nie jest uważany za silnego agonistę alfa-2. Ta utrata aktywności alfa-2 adrenergicznej powoduje, że związek jest terapeutycznie użyteczny do leczenia zaburzeń zastrzeżonych w niniejszym zgłoszeniu. Brak aktywności alfa-2 adrenergicznej oznacza, że związek można podawać w dawkach odpowiednich do traktowania zaburzeń zastrzeżonych w niniejszym zgłoszeniu, ale bez żadnego znaczącego działania na ciśnienie krwi, przez co unika się potrzeby podawania razem ze znanym antagonistą alfa-2 adrenergicznym (alfa blokerem).

Ocena selektywności

[0178] Selektywność uzasadniają wyniki testów 1, 2, 3 i 5:

Selektywny inhibitor PPP1 R15A powinien chronić komórki przed stresem ER (Test 1), nie hamować translacji w komórkach nie poddanych stresowi (Test 2), przedłużać tłumienie translacji po tunikamycynie (Test 3) i selektywnie dysocjować holofosfatazę PPP1 R15A-PP1, ale nie holofosfatazę PPP1R15B-PP1 (Test 4).

Wyniki

[0179] Wyniki Testów 1 do 4 dla wybranych związków według wynalazku przedstawiono w Tabeli 1 poniżej.

Tabela 1:

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Ocena selektywności
Przykł.	Przeżycie po stresie (wzrost %)	Hamowanie translacji w komórkach nie poddanych stresowi	Tłumienie translacji po T _m	Dysocjacja PPP1R15A/PP1 lub PPP1 R15B/PP1 ^b	Selektywność wobec PPP1 R15A lub PPP1R15B ^a
1	180	NIE	przedłużona	Dysocjacja PPP1R15A/PP1 ALE NIE PPP1 R15B/PP1 ^b	Selektywnie hamuje PPP1R15A, NIE PPP1R15B
2	40	TAK	przedłużona		Hamuje zarówno PPP1 R15A jak i PPP1R15B
3	80	TAK	przedłużona		Preferencyjnie hamuje PPP1 R15A
4	100	TAK	przedłużona		Hamuje zarówno PPP1 R15A jak i PPP1R15B
6	120	NIE	przedłużona		Selektywnie hamuje PPP1 R15A, nie B
7	160	TAK	przedłużona	Dysocjacja PPP1R15A/PP1 ORAZ PPP1R15B/PP1 ^b	Hamuje zarówno PPP1 R15A jak i PPP1R15B
8	100	TAK	przedłużona		Hamuje zarówno PPP1 R15A jak i PPP1R15B
9	20				
13	60-80				
15	160	NIE	przedłużona		Potencjalnie selektywny
16	140	TAK			Potencjalnie nie selektywny
^a uzasadnione hamowaniem translacji w komórkach po stresie /nie poddanych stresowi ^b potwierdza selektywność wobec PPP1 R15A-PP1 lub jej brak.					

Testy komórkowe:**Materiały i metody**

[0180] Hodowla komórkowa i reagenty Komórki linii 293T utrzymywano w podłożu hodowlanym Dulbecco's, zmodyfikowanym podłożu Eagle's, wzbogaconym w 10% płodową surowicę bydlęcą i transfekowano w 6- lub 12- dołkowych płytkach przy użyciu metodę fosforanu wapnia zwyczajowo prowadząca do transfekcji o 70% skuteczności. Rutynowo 45,000 komórek/ml wysiano przed transfekcją jak opisano w (Rousseau i in. 2009). Mielinowy P0S63del-DSred konstrukt opisano w (Pennuto i in. 2008), konstrukt huntingtyny opisano w (Rousseau i in. 2009), konstrukt SOD1A4V opisano (Munch i in. 2011) i konstrukt P23H opisano w (Mendes and Cheetham 2008).

Mikroskopia fluorescencyjna

[0181] Transfekowane komórki utrwalono z 4% paraformaldehydem i znakowano wskazanymi przeciwciałami. Mikrofotografie zrobiono w powiększeniu 100X za pomocą Leica TCS SP2AOBS mikroskopu konfokalnego lub Leica DMRB mikroskopu fluorescencyjnego.

Immunoblotting

[0182] Rutynowo 70% komórek konfluentnych z dołka 12-dołkowej płytki poddano lizie w 140 µl wrzącego buforu Laemmli (25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 25 mM ditiotretitol, 7,5% glicerol, 0,05% błękit bromofenolowy) w celu analizy immunoblot. 18 µl ekstraktów białka wprowadzono na żele 2-12% NuPAGE i przeniesiono na wzmocnioną Optitranem BA-S 83 błonę nitrocelulozową (Whatman and Schleicher & Schuell). Równy ładunek ekstraktów białkowych analizowanych metodą immunoblot był kontrolowany przez barwienie Ponceau Red i wimentyną (dane nie pokazane). Błony nasyciono w 5% wysuszonym odtłuszczonym mleku w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem i sondowano za pomocą przeciwciała Htt 2b4 lub przeciwciała HA w celu uwidocznienia SOD1 znaczonego HA. Odpowiednie drugorzędowe przeciwciała sprzężone z peroksydazą uwidoczniono z użyciem zestawu SuperSignal West Pico Chemiluminescent (Pierce). Obrazy chemiluminescencyjne uzyskano stosując Chemi-Smart 5000 (Vilber-Lourmat) umożliwiające ilościowe wykrywanie chemiluminescencji. Sygnały będące przedmiotem zainteresowania oceniano ilościowo przy użyciu programu ImageJ.

Ocena Charcot Marie Tooth 1 B (Test 6)

[0183] Delecja seryny 63 z P0 (P0S63del) powoduje neuropatię Charcot-Marie-Tooth 1 B u ludzi i podobną demielinizującą neuropatię u transgenicznym myszy. Zmutowane białko nieprawidłowo fałduje i gromadzi się w ER, wywołując UPR, i nie może być włączone do mieliny (D'Antonio i in., 2009, J Neurosci Res, 87, 3241-9). Komórki 293T transfekowano za pomocą znakowanego P0S63 del - P0S63del-DSred – i analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego, 48 h po transfekcji w obecności lub przy braku związków o wzorze (I). Zgodnie z metodologią opisaną w (Pennuto i in. 2008), komórki z P0S63del-DSred pozostałe w ER zliczono. Fig. 4 pokazuje, że w komórkach nie poddanych leczeniu, P0S63del gromadzi się w ER, ale Przykład 1 zapobiega temu gromadzeniu. Ponieważ gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanego białka P0 wywołuje CMT-1 B i wykazano, że Przykład 1 zmniejsza gromadzenie białka powodującego chorobę, związek o wzorze (I) powinien być użyteczny do leczenia CMT-1 B jak też innych postaci CMT, w których białko powodujące chorobę jest nieprawidłowo fałdowane i pozostaje w ER.

Test na chorobę Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne (Test 7)

[0184] Zgłaszający badał gromadzenie amino-końcowego fragmentu zmutowanej huntingtyny (Htt48Q) związanego z chorobą Huntingtona i mutanta SOD1 (A4V) związanego ze stwardnieniem zanikowym bocznym.

[0185] Zgłaszający stosował metodę opisaną poprzednio w WO/2008/041133. Komórki 293T transfekowano za pomocą plazmidu kodującego Htt48 lub SOD1^{A4V} i traktowano Przykładem 1 w DMSO lub samym DMSO 4 godziny po transfekcji. Lizaty SDS zebrane 48 h po transfekcji analizowano na NuPAGE, a następnie przez immunoblot z przeciwciałem Huntingtyny (2B4) lub HA (SOD1). Fig. 5 pokazuje test ilościowy sygnału w immunoblotach, znormalizowany do komórek nie traktowanych związkiem. Przykład 1 zmniejsza gromadzenie obu białek. Pokazano, że Przykład 1 zmniejsza gromadzenie białek powodujących chorobę Huntingtona i stwardnienie zanikowe boczne, związek o wzorze (I) powinien być użyteczny do leczenia takich chorób jak też innych chorób neurodegeneracyjnych powodowanych gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek.

Test gromadzenia rodopsyny P23H (Test 8)

[0186] Zgłaszający badał gromadzenie rodopsyny związanej z retinopatią barwnikową jak opisano (Mendes & Cheetham 2008).

[0187] Komórki 293T transfekowano plazmidem kodującym mutanta rodopsyny P23H i traktowano Przykładem 1 w DMSO lub samym DMSO 4 h po transfekcji. Komórki analizowano za pomocą mikroskopu. Fig. 6 pokazuje komórki z lub bez agregatów. Przykład 1 zmniejsza agregaty. Ponieważ gromadzenie nieprawidłowo sfałdowanej rodopsyny powoduje RP i pokazano, że Przykład 1 zmniejsza gromadzenie białka powodującego chorobę, związek o wzorze (I) powinien być użyteczny do leczenia retinopatii barwnikowej.

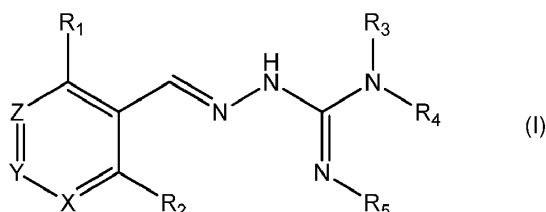
Przykłady 1 i 6 są potwierdzonymi selektywnymi inhibitorami PPP1 R15A.

Przykłady 2,4,7,8 hamują zarówno PPP1 R15A jak i B.

[0188] Pomimo, że wynalazek został opisany w związku z konkretnymi korzystnymi wykonaniami, należy rozumieć, że wynalazek jak zastrzeżono nie powinien być zbyt ograniczony do tych konkretnych wykonań. W rzeczywistości różne modyfikacje opisanych sposobów realizacji wynalazku, które są oczywiste dla specjalisty w pokrewnych dziedzinach, mają być objęte zakresem wynalazku.

ZASTRZEŻENIA PATENTOWE

1. Związek o wzorze (I), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,



lub jego postać tautomeryczna

w którym:

R₁ oznacza alkil, Cl, F lub Br;

R₂ oznacza H lub F;

R₃ jest wybrany spośród H i alkilu;

R₄ jest wybrany spośród H i C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R_6 jest wybrany spośród R_7 , OR_7 i NR_8R_9 ;

R_7 , R_8 i R_9 są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocykliku i arylu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R_{10} ;

każdy R_{10} jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, NO_2 , CN, COO-alkilu, aralkilu, SO_2 -alkilu SO_2 -arylo COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH_2 , NH-alkilu, $N(alkilu)_2$, CF_3 , alkilu i alkoksy;

X i Z każdy niezależnie oznacza CR_{11} , i Y jest wybrany spośród CR_{11} i N;

R_{11} oznacza H lub F;

do zastosowania do leczenia zaburzenia, związanego ze stresem nieprawidłowego fałdowania białek i w szczególności z gromadzeniem nieprawidłowo sfałdowanych białek, wybranego spośród neuropatii Charcot Marie Tooth;

ostrego zespołu Dejerine-Sottas; chorób siatkówki, korzystnie retinopatii barwnikowej, ciliopatii siatkówki, degeneracji plamki żółtej lub retinopatii cukrzycowej, i ALS.

2. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 1, w którym

- R_1 oznacza Cl, Br, Me lub F, bardziej korzystnie, Cl;

- R_2 oznacza H;

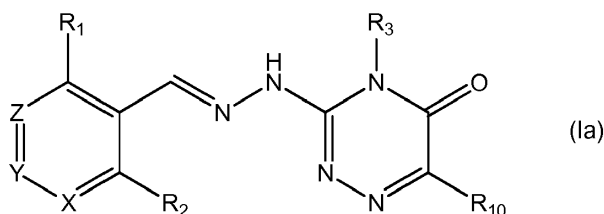
- Y oznacza CR_{11} lub Y oznacza N;

- R_3 i R_4 oba oznaczają H, albo R_3 oznacza H i R_4 oznacza $C(O)R_6$;

- R_6 oznacza Me albo OMe; i/albo

- R_4 i R_5 są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R_{10} .

3. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 1 albo 2, w którym wspomniany związek ma wzór (Ia), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,

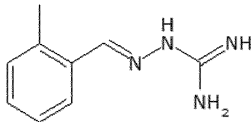
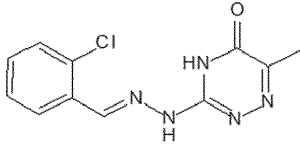
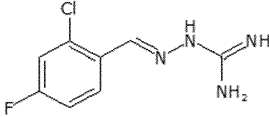
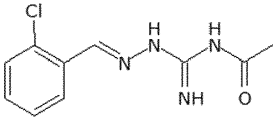
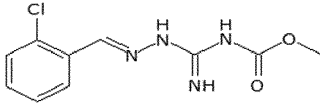
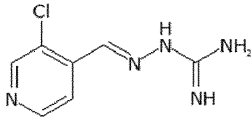
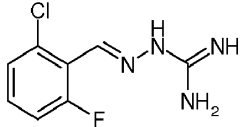
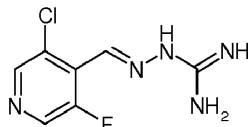


lub jego postać tautomeryczna

w którym R_1 , R_2 , R_3 i R_{10} są jak określono w zastrzeżeniu 1.

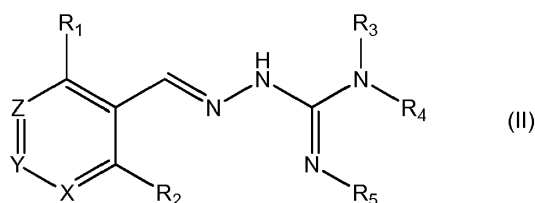
4. Związek do zastosowania według dowolnego z poprzedzających zastrzeżeń, który jest wybrany spośród następujących:

Przykład 1	
Przykład 2	
Przykład 3	

Przykład 4	
Przykład 6	
Przykład 7	
Przykład 8	
Przykład 9	
Przykład 13	
Przykład 15	
Przykład 16	

lub jego postać tautomeryczna, lub jego dopuszczalna sól.

5. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 4, który stanowi Przykład 1, lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól.
6. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 4, który stanowi Przykład 15 lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól.
7. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 4, który stanowi Przykład 16 lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól.
8. Związek do zastosowania według dowolnego z poprzednich zastrzeżeń, przy czym zaburzenie stanowi neuropatia Charcot Marie Tooth.
9. Związek o wzorze (II), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,



lub jego postać tautomeryczna

w którym:

R₁ oznacza alkil, Cl, F lub Br;

R₂ oznacza H albo F;

R₃ jest wybrany spośród H i alkilu;

R₄ jest wybrany spośród H i C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

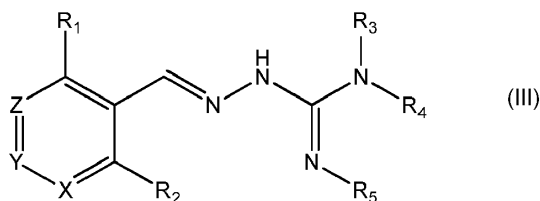
R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocykliku, arylu i heteroarylu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, NO₂, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylu, COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH₂, NH-alkilu, N(alkilu)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

X i Z każdy niezależnie oznacza CR₁₁, i Y oznacza N; i

R₁₁ oznacza H lub F.

10. Związek o wzorze (III), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,



lub jego postać tautomeryczna

w którym:

R₁ oznacza alkil, Cl, F lub Br;

R₂ oznacza H lub F;

R₃ jest wybrany spośród H i alkilu;

R₄ oznacza C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

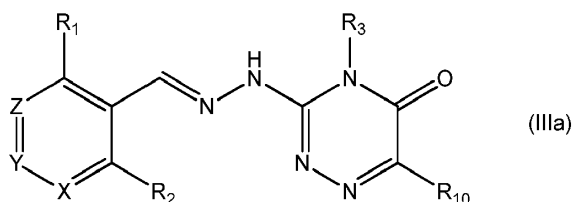
R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocykliku, arylu i heteroarylu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, NO₂, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylu, COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH₂, NH-alkilu, N(alkilu)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

X i Z każdy niezależnie oznacza CR₁₁, i Y jest wybrany spośród CR₁₁ i N; i

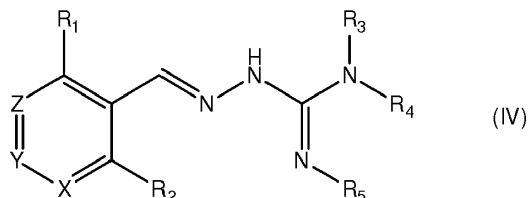
R₁₁ oznacza H lub F.

11. Związek według zastrzeżenia 10 o wzorze (IIIa), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,



w którym R₁, R₂, R₃ i R₁₀ są jak określono w zastrzeżeniu 10.

12. Związek o wzorze (IV), lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,



lub jego postać tautomeryczna

w którym:

R₁ oznacza alkil lub Br;

R₂ oznacza H;

R₃ jest wybrany spośród H i alkilu;

R₄ jest wybrany spośród H i C(O)R₆;

R₅ oznacza H;

albo R₄ i R₅ są związane do utworzenia grupy heterocyklicznej, która jest ewentualnie podstawiona przez jedną lub więcej grup R₁₀; R₆ jest wybrany spośród OR₇ i NR₈R₉;

R₆ jest wybrany spośród R₇, OR₇ i NR₈R₉;

R₇, R₈ i R₉ są niezależnie wybrane spośród alkilu, cykloalkilu, aralkilu, cykloalkenyłu, heterocykliku i arylu, przy czym każdy z nich jest ewentualnie podstawiony przez jedną lub więcej grup R₁₀;

każdy R₁₀ jest niezależnie wybrany spośród fluorowca, OH, CN, NO₂, COO-alkilu, aralkilu, SO₂-alkilu, SO₂-arylu, COOH, CO-alkilu, CO-arylu, NH₂, NH-alkilu, N(alkilu)₂, CF₃, alkilu i alkoksy;

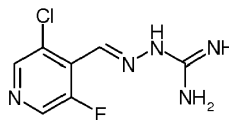
X i Z każdy oznacza CH i Y oznacza CR₁₁;

R₁₁ oznacza H lub F.

13. Związek wybrany spośród następujących, i jego farmaceutycznie dopuszczalna sól,

Przykład 7	
Przykład 8	
Przykład 9	
Przykład 13	

Przykład 16



lub jego postać tautomeryczna.

14. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca związek według dowolnego z poprzednich zastrzeżeń od 9 do 13 z domieszką farmaceutycznie dopuszczalnego rozcieńczalnika, substancji pomocniczej lub nośnika.

15. Połączenie zawierające związek według dowolnego z poprzednich zastrzeżeń od 9 do 13 i drugi środek czynny.

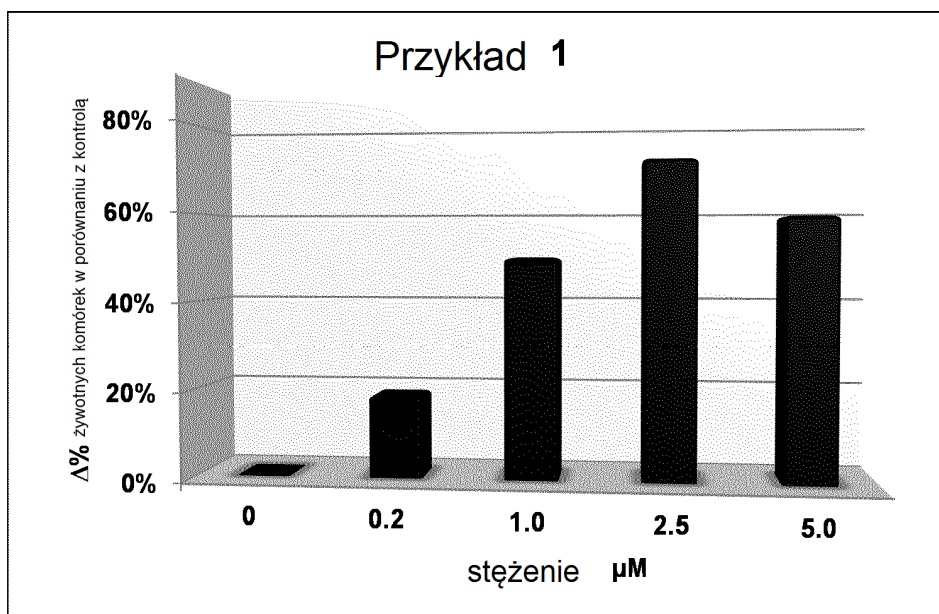


Fig.1

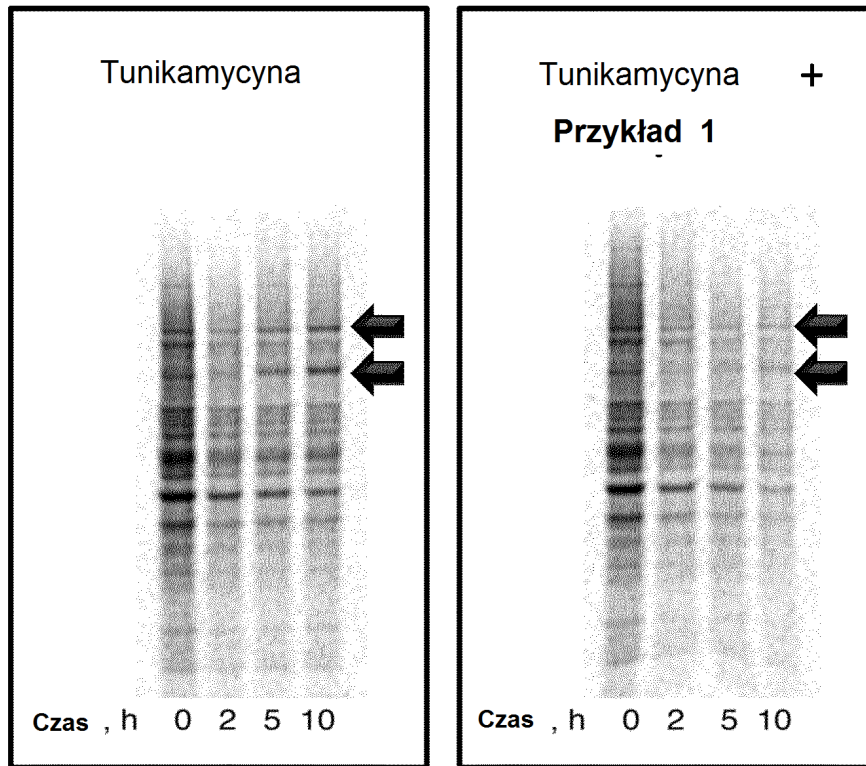


Fig.2

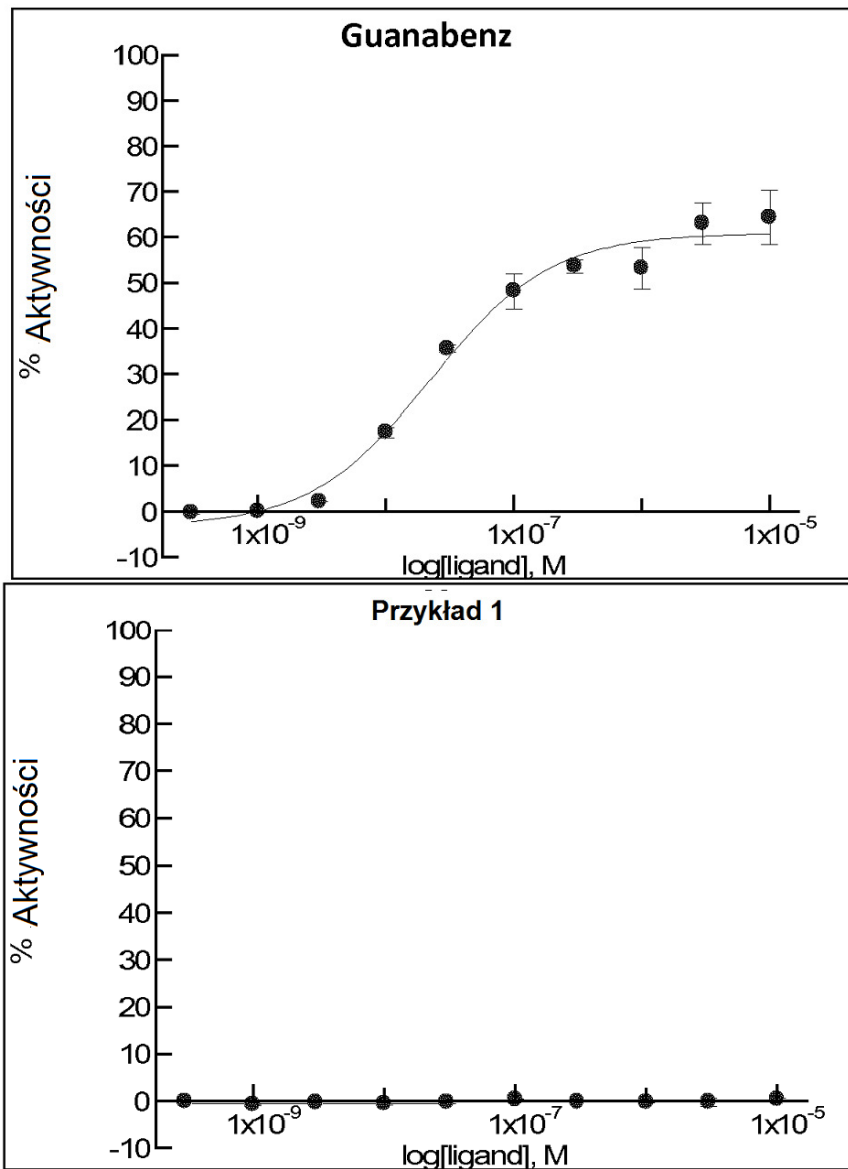


Fig.3

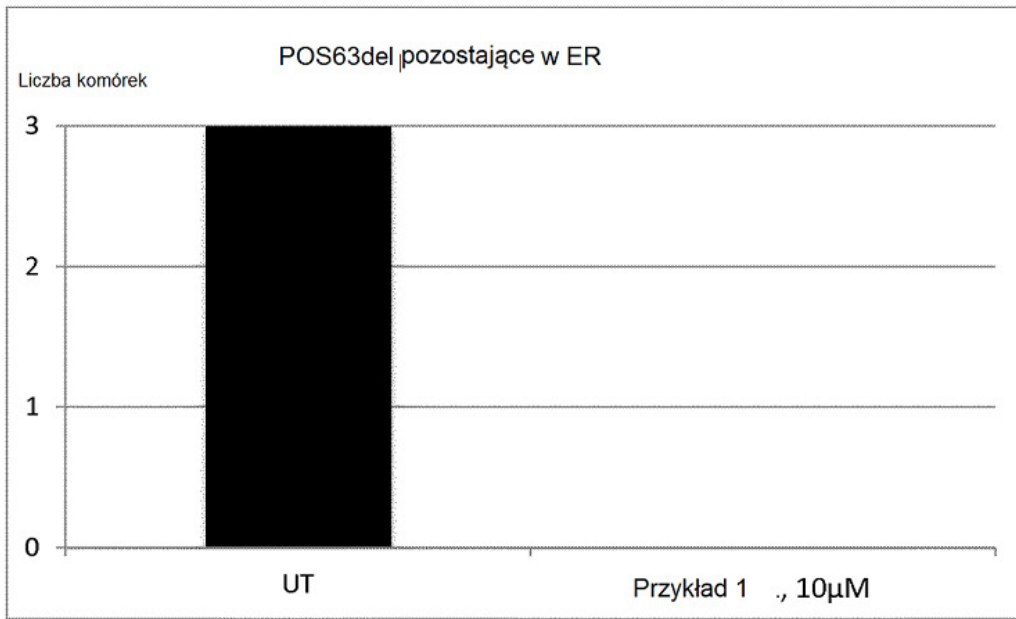


Fig.4

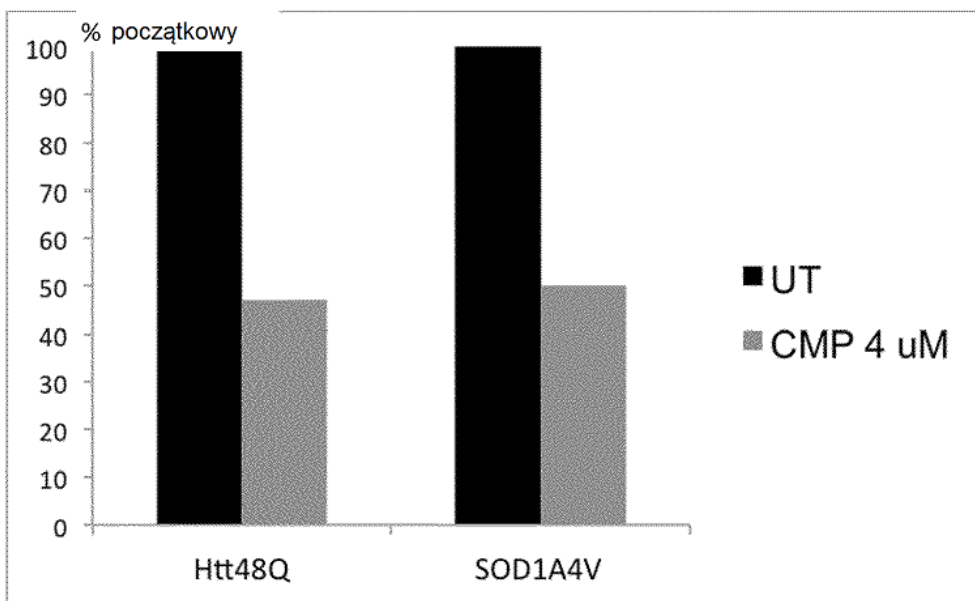


Fig.5

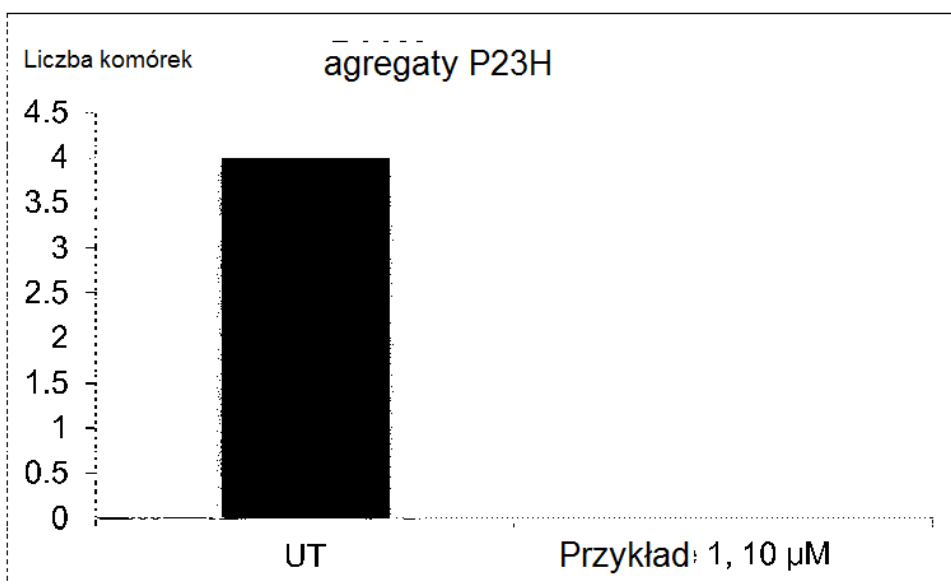


Fig.6

ODNOŚNIKI CYTOWANE W OPISIE

Poniższa lista odnośników cytowanych przez zgłaszającego ma na celu wyłącznie pomoc dla czytającego i nie stanowi części dokumentu patentu europejskiego. Pomimo, że dołożono największej staranności przy jej tworzeniu, nie można wykluczyć błędów lub przeoczeń i EUP nie ponosi żadnej odpowiedzialności w tym względzie.

Dokumenty patentowe cytowane w opisie

- US 3982020 A [0003]
- US 20040068017 A [0003]
- WO 2008061647 A [0003]
- WO 2005031000 A [0003]
- EP 1908464 A [0003] [0009]
- WO 2008041133 A [0004] [0074] [0185]
- CA 958018 [0006]
- WO 9303714 A [0006]
- WO 2013124484 A [0063]
- WO 8403564 A [0140]

Literatura niepatentowa cytowana w opisie

- D. TRIBOUILLARD-TANVIER et al. PLoS One, 2008, vol. 3, e1981 [0004] [0070]
- P. TSAYTLER; H. P. HARDING; D. RON; A. BERTOLOTI. Science, 01 April 2011, vol. 332, 91-94 [0004] [0005] [0044]
- D. TRIBOUILLARD-TANVIE et al. PLoS One, 2008, vol. 3, e1981 [0009]
- HARDING et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, vol. 106, 1832-1837 [0044]
- BROWN et al. Frontiers in Physiology, 2012, vol. 3, 263 [0050]
- VOERMANS et al. J Peripher New Syst, 2012, vol. 17 (2), 223-5 [0050] [0058]
- NAIDOO et al. J Neurosci, 2008, vol. 28, 6539-48 [0053] [0079]
- D'ANTONIO et al. J Neurosci Res, 2009, vol. 87, 3241-9 [0060] [0183]
- PENNUTO et al. Neuron, 2008, vol. 57, 393-405 [0060]
- D'ANTONIO et al. J.Exp. Med, 2013, 1-18 [0060]
- BOYCE et al. Science, 2005, vol. 307, 935-939 [0060] [0071]
- SAPORTA et al. Brain, 2012, vol. 135, 2032-2047 [0060]
- COLBY et al. Neurobiol.Disease, 2000, vol. 7, 561-573 [0060]
- KLEOPA et al. J. Neurosci. Res., 2002, vol. 68, 522-534 [0060]
- YUM et al. Neurobiol. Dis., 2002, vol. 11, 43-52 [0060]
- Gorbatyuk et Gorbatyuk 2013 - Retinal degeneration: Focus on the unfolded protein response. Molecular Vision, vol. 19, 1985-1998 [0061]
- JING et al. Exp Diabetes Res, 2012, 589589 [0065]
- DRYJA et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, vol. 88, 9370-4 [0065]
- PALCZEWSKI. Annu Rev Biochem, 2006, vol. 75, 743-67 [0065]
- VALENTINE et al. Annu Rev Biochem, 2005, vol. 74, 563-93 [0065]
- GRICIUC et al. Trends Mol Med, 2011, vol. 17, 442-51 [0065]

- SHEN et al. Effect of Guanabenz on Rat AMD Models and Rabbit Choroidal Blood, 2011, vol. 5, 27-31 **[0066]**
- COLLA et al. J. of Neuroscience, 2012, vol. 32 (10), 3306-3320 **[0071]**
- SAXENA et al. Nature Neuroscience, 2009, vol. 12, 627-636 **[0073]**
- NISHITOH et al. Genes Dev, 2002, vol. 16, 1345-55 **[0074]**
- ROUSSEAU et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, vol. 101, 9648-53 **[0074]**
- DUENNWALD; LINDQUIST. Genes Dev, 2008, vol. 22, 3308-19 **[0074]**
- SCHEPER; HOOZEMANS. Curr Med Chem, 2009, vol. 16, 615-26 **[0074]**
- BACK; KAUFMAN. Annu Rev Biochem, 2012, vol. 81, 767-93 **[0076]**
- SONG et al. J Clin Invest, 2008, vol. 118, 3378-89 **[0076]**
- TSAYTLER et al. Science, 2011, vol. 332, 91-4 **[0076]**
- DONZE et al. EMBO J, 1995, vol. 14, 3828-34 **[0078]**
- PERVIN et al. Cancer Res, 2008, vol. 68, 4862-74 **[0078]**
- CHEN et al. Nat Chem Biol, 2011, vol. 7, 610-6 **[0078]**
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. 1994 **[0081]**
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1985 **[0082]**
- BERGE et al. J Pharm Sci, 1977, vol. 66, 1-19 **[0104]**
- Advanced Organic Chemistry. John Wiley and Sons, 1985 **[0107]**