

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 571**

51 Int. Cl.:

A61K 31/155 (2006.01)

C07C 281/18 (2006.01)

C07D 253/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2016** **PCT/GB2016/050991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016** **WO16162689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2016** **E 16717688 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021** **EP 3280405**

54 Título: **Inhibidores y sus usos**

30 Prioridad:

08.04.2015 GB 201505975

08.04.2015 GB 201505971

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2021

73 Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND
INNOVATION (100.0%)**

**Polaris House, North Star Avenue
Swindon SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

**BERTOLOTTI, ANNE;
DAS, INDRAJIT;
KRZYZOSIAK, AGNIESZKA;
ROUSSEAU, ADRIEN;
SCHNEIDER, KIM y
SIGURDARDOTTIR, ANNA GUDNY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 886 571 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores y sus usos

5 La presente invención se refiere a inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B y su uso en terapia.

Antecedentes de la invención

10 La fosforilación reversible de proteínas controla prácticamente todos los aspectos de la función celular y del organismo, lo que permite que las células se adapten a cambios repentinos a través de la acción antagonista de quinasas y fosfatasas. En consecuencia, la fosforilación dirigida ofrece una amplia gama de oportunidades terapéuticas y las quinasas han surgido como las dianas farmacológicas más prevalentes en la investigación farmacéutica actual con más de 3000 fármacos experimentales y aprobados. Sin embargo, aunque las fosfatasas dirigidas deberían ser en principio tan atractivas como las quinasas, se ha pasado por alto el potencial terapéutico de las fosfatasas. La mayor parte de la fosforilación de las proteínas se produce en la serina y la treonina, y la desfosforilación selectiva de la serina y la treonina se lleva a cabo mediante cientos de holoenzimas diméricas o triméricas diferentes ensambladas a partir de una de las pocas subunidades catalíticas combinadas con una entre cientos de subunidades reguladoras distintas (Heroes y col., FEBS Journal, 280, 584-595, 2012). Por tanto, la inhibición del componente catalítico de la holoenzima como PP1c da como resultado la inhibición de centenares de fosfatasas y es tóxica. Dado que la selectividad es una propiedad importante para el desarrollo de fármacos, la promiscuidad de las fosfatasas catalíticas ha hecho que adquieran la reputación de ser indiscutibles.

25 La fosforilación de la subunidad α de eIF2 α es la primera línea de defensa contra una variedad de tensiones y, por lo tanto, es un componente central de dos vías de señalización parcialmente superpuestas: la respuesta de proteína desplegada (UPR) y la respuesta integrada al estrés (ISR). Para revertir la fosforilación de eIF2 α , las células de mamífero tienen dos fosfatasas de eIF2 α . Las eIF2 α fosfatasas son holoenzimas diméricas que comparten una subunidad catalítica PP1c con aproximadamente otras 200 fosfatasas y están unidas a una de dos subunidades reguladoras relacionadas: PPP1R15A (Novoa y col., The Journal of Cell Biology, 153, 1345-1355, 2001), una proteína inducible por estrés o PPP1R15B, que se expresa constitutivamente (Jousse y col., The Journal of Cell Biology, 163, 767-775, 2003).

30 Recientemente, se ha demostrado la viabilidad de inhibir selectivamente una serina/treonina fosfatasa. Guanabenz (Tsaytler y col., Science, 332, 91-94, 2011; Tsaytler y Bertolotti, FEBS Journal, 280, 766-770, 2012) y sus derivados, algunos de los cuales se describen en el documento WO2014108520 (Medical Research Council), inhiben selectivamente PPP1R15A/GADD34, una subunidad reguladora inducida por estrés de la serine/threonine proteína fosfatasa 1, y se propuso como tratamiento para enfermedades asociadas con el estrés por plegamiento incorrecto de proteínas.

40 La inhibición de PPP1R15A inhibe selectivamente la eIF2 α fosfatasa inducida por estrés compuesta de PPP1R15A y PP1, mientras que evita la fosfatasa PPP1R15B-PP1 estrechamente relacionada y constitutiva. La inhibición de PPP1R15A prolonga la fosforilación de eIF2 α en células estresadas y esto da como resultado una prolongación de la atenuación de la traducción en células estresadas. Como consecuencia, la disponibilidad de chaperones aumenta en las células estresadas porque las chaperonas que normalmente se dedican a ayudar al plegamiento de proteínas recién sintetizadas se vuelven disponibles cuando se reduce la traducción. Esto favorece el plegamiento de proteínas y rescata a las células de los defectos de proteostasis de proteínas. Por tanto, en principio, los inhibidores de PPP1R15A podrían tratar enfermedades de mamíferos que implican estrés por plegamiento incorrecto de proteínas. La inhibición de la PPP1R15A en mamíferos tiene un atractivo potencial terapéutico porque se prevé que la inhibición de la PPP1R15A es segura, ya que los ratones knock-out de la PPP1R15A/GADD34 son prácticamente indistinguibles de los ratones de tipo salvaje (Marciniak y col., Genes & Development, 18, 3066-3077, 2004). Sin embargo, se prevé que el número de indicaciones terapéuticas que pueden tratarse con inhibidores de PPP1R15A está restringido a enfermedades en las que se expresa PPP1R15A y en las que PPP1R15A se encuentra en el modo de acción de la enfermedad. Por tanto, la inhibición de PPP1R15A puede ser potente y segura, pero estará restringida a enfermedades que involucran a PPP1R15A.

55 Independientemente de las limitaciones asociadas con la inhibición de PPP1R15A, el enfoque de restaurar la proteostasis al ajustar la traducción para aumentar la disponibilidad de chaperones es en teoría convincente, sencillo y aplicable para corregir una amplia gama de enfermedades que involucran proteínas mal plegadas. Como se indicó anteriormente, el uso de inhibidores de PPP1R15A estará restringido a enfermedades en las que se expresa PPP1R15A y en las que PPP1R15A se encuentra en el modo de acción de la enfermedad. Esto representa una limitación seria. Por tanto, se necesitan enfoques alternativos, de amplio potencial terapéutico, y la presente invención busca proporcionarlos.

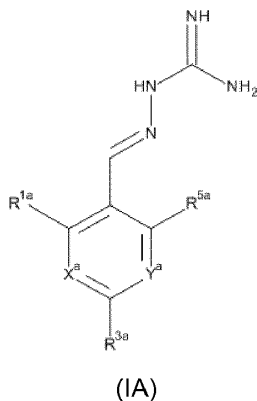
Nguyen y col., ACS Chem. Neurosci., 5, 1075-1082, 2014 describen un estudio de relación estructura-actividad alrededor de guanabenz basado en cambios de las posiciones del cloro en el resto del benceno y luego en las

modificaciones del grupo guanidina. El documento WO2005031000 describe compuestos que interactúan selectivamente con el subtipo de receptor de neuropéptido FF que media la nocicepción aguda y el dolor neuropático crónico. Gardner y col., J. Org. Chem., 20, 976-908, 1955 describe la síntesis de nicotinaldehído diclorhidrato de guanilhidrazona. El documento DE2700561 describe derivados de hidrazina que incluyen N- (2-cloro-3-piridilmetiliden)N'-amidinohidrazina. Bairwa y col. Biorg. Medicina. Chem. Letts, 20, 1623-1625, 2010 describen derivados de fenilacrilamida que incorporan guanilhidrazonas como posibles agentes antituberculares. El documento US3982020 describe bencilidenhidrazinas sustituidas y su uso como agentes hipoglucémicos-antihiperoglucémicos, agentes anti-obesidad y agentes antiinflamatorios. El documento WO0211715 describe compuestos de bencilidenoaminoguanidina e hidroxiguanidina como ligandos para receptores de melanocortina y para el tratamiento de trastornos en el sistema de melanocortina. Ring et al. Biorg. Medicina. Chem. Letts, 21, 1764-1774, 2013 describe una serie de análogos de arilidenaminoguanidina como moduladores inhibidores del complejo receptor de N-metil-D-aspartato. El documento GB1223491 describe derivados de aminoguanidina sustituidos, un proceso para su preparación y composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos.

Resumen de la invención

Los compuestos que inhiben PPP1R15A y PPP1R15B pueden usarse ventajosamente para tratar una gama más amplia de enfermedades que los compuestos que inhiben selectivamente PPP1R15A.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de la fórmula IA:



o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde:

X^a es CR^{2a} ;

Y^a es CR^{4a} ;

R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan cada uno independientemente H, F o Cl;

donde:

dos de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan Cl, uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa F, y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H;

dos de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan F, uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa Cl, y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H; o

el compuesto es seleccionado de entre:

2- (3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida;

2- (2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida;

2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

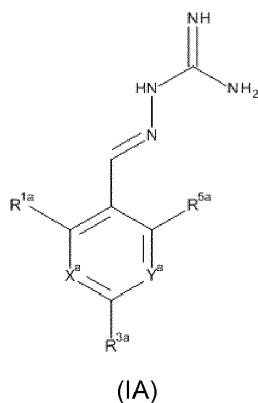
o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mismos.

En una realización, R^{5a} es H.

En una realización, el compuesto de fórmula IA está en forma de isómero E.

Otro aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula IA para uso en terapia.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula IA:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia, donde:

- 5 X^a es CR^{2a} ;
 Y^a es CR^{4a} ;
 R^{1a} , R^{2a} y R^{4a} son seleccionados independientemente de entre H, F y Cl, donde dos de entre R^{1a} , R^{2a} y R^{4a} son
 seleccionados de entre F y Cl y uno de entre R^{1a} , R^{2a} y R^{4a} representa H;
 R^{3a} es F o Cl;
 10 R^{5a} es H.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a compuestos de fórmula IA para uso en el tratamiento de un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B.

- 15 También se describe el uso de un compuesto de fórmula IA en la preparación de un medicamento para tratar un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B.

También se describen procedimientos para tratar un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B en un sujeto que lo necesite, y dicho procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula IA.

En una realización, el estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B es un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o un trastorno de proteostasis.

- 25 En una realización adicional, la enfermedad es la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, una tauopatía, una enfermedad por tráfico de proteínas o un trastorno de la mielina.

En otra realización, la enfermedad es cualquier trastorno por poliglutamina.

- 30 En una realización adicional, la enfermedad es la neuropatía motora distal hereditaria con mutaciones en la chaperona HSP1.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula IA como se describió anteriormente, mezclado con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.

Breve descripción de las figuras

- 40 Determinadas realizaciones de la presente invención se describirán ahora, por medio de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra la unión selectiva de un inhibidor de R15B del Ejemplo 1 a R15B-PP1 sobre R15A-PP1.

- 45 La Figura 2 muestra que un inhibidor selectivo de R15B del Ejemplo 1 induce una fosforilación transitoria de eIF2α en células en ausencia de estrés e induce la expresión de R15A en células.

La Figura 3 muestra que un inhibidor selectivo de R15B del Ejemplo 1 protege a las células del estrés.

- 50 La Figura 4 muestra los efectos de un inhibidor selectivo de R15B sobre la fosforilación de eIF2α después del estrés. El compuesto del Ejemplo 1 prolonga la fosforilación de eIF2α después del estrés en momentos en los que aún no se expresa R15A.

La Figura 5 muestra la distribución tisular de un compuesto del Ejemplo 1 que presenta una distribución tisular extensa.

La Figura 6 muestra que el tratamiento de ratones con un compuesto del Ejemplo 1 (10 mg/kg) no es tóxico.

La Figura 7 muestra que el tratamiento de ratones con un compuesto del Ejemplo 1 (10 mg/kg) no es tóxico.

La Figura 8 muestra la inducción de R15A en un mamífero después del tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 9 muestra la eficacia de un inhibidor de R15B del Ejemplo 1 para prevenir enfermedades en un mamífero. El ejemplo usado en la Figura 8 es la enfermedad de Huntington y se usa el modelo de ratón HD82Gln (Schilling y col., Hum. Mol. Genet., 8, 387-407, 1999). WT: ratones de tipo salvaje. Tg: HD82Gln.

La Figura 10 muestra los entrenudos de mielina en rojo (en forma de varilla) de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) cultivados y los núcleos en azul (en forma de 'gota' esférica) del genotipo indicado tratado con el vehículo o compuesto del Ejemplo 1. Los entrenudos de mielina en ratones mutantes para PMP22 son más cortos. El tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1 aumentó la longitud de los entrenudos de mielina en los DRG de los mutantes, revelando que mejoró la mielinización.

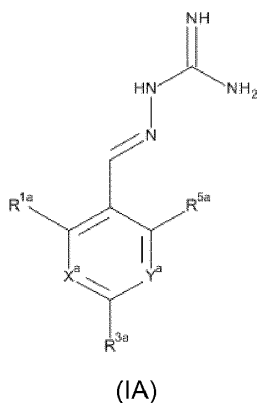
La Figura 11 muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones obesos db/db (n=5 por condición) después del tratamiento con el compuesto del Ejemplo 1.

La Figura 12 muestra las tasas de síntesis de proteínas para un inhibidor selectivo de R15A (1ª columna - guanabenz (GBZ)), un inhibidor selectivo de R15B (2ª columna - compuesto 16 (TST3)), una combinación de GBZ y TST3 (3ª columna), y un inhibidor de R15A/B (4ª columna - compuesto 10). La Figura muestra que un inhibidor selectivo de R15A no inhibe la síntesis de proteínas en células no estresadas. Un inhibidor selectivo de R15B inhibe transitoriamente la síntesis de proteínas en células no estresadas. La combinación de un inhibidor de R15A y R15B da como resultado una inhibición persistente de la síntesis de proteínas. Asimismo, un inhibidor de R15A/B inhibe persistentemente la síntesis de proteínas. El eje Y muestra las tasas relativas de síntesis de proteínas. El eje X muestra el tiempo que sigue a la adición de los compuestos (10 µM), en horas (h).

La Figura 13 muestra una inmunotransferencia que muestra que un inhibidor de R15A/B (compuesto 10 a 20 µM) induce la expresión de ATF4, lo que confirma que el compuesto tiene un efecto sobre la diana. El tiempo después de la adición del compuesto a las células en cultivo se muestra debajo de la inmunotransferencia de ATF4 (0, 2, 5, 7,5 h).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona compuestos de la fórmula IA:



o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde:

X^a es CR^{2a};

Y^a es CR^{4a};

R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} y R^{5a} representan cada uno independientemente H, F o Cl; donde:

dos de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} y R^{5a} representan Cl, uno de entre R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} y R^{5a} representa F, y dos de entre R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} y R^{5a} representan H;

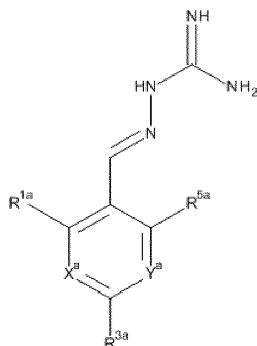
dos de R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} y R^{5a} representan F, uno de entre R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} y R^{5a} representa Cl, y dos de entre

R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H; o
el compuesto es seleccionado de entre:

- 5 2- (3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida;
2- (2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida;
2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mismos.

- 10 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula IA:



(IA)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia, donde:

- 15 X^a es CR^{2a} ;
 Y^a es CR^{4a} ;
 R^{1a} , R^{2a} y R^{4a} son seleccionados independientemente de entre H, F y Cl, donde dos de entre R^{1a} , R^{2a} y R^{4a} son
20 seleccionados de entre F y Cl y uno de entre R^{1a} , R^{2a} y R^{4a} representa H;
 R^{3a} es F o Cl;
 R^{5a} es H.

En una realización, R^{1a} es F o Cl.

En otra realización, R^{3a} es F o Cl.

- 25 En otra realización, R^{5a} es H.

En una realización, cuando X^a representa CR^{2a} e Y^a representa CR^{4a} , dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan Cl.

En una realización, cuando X^a representa CR^{2a} e Y^a representa CR^{4a} , uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa Cl y uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa F.

- 30 En una realización, R^{1a} y R^{3b} representan ambos Cl.

En una realización, cuando X^a representa CR^{2a} e Y^a representa CR^{4a} , tres de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan Cl y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H.

- 35 En una realización, cuando X^a representa CR^{2a} e Y^a representa CR^{4a} , dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan Cl, uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan F, y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H.

En una realización, cuando X^a representa CR^{2a} e Y^a representa CR^{4a} , dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan F, uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa Cl y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H.

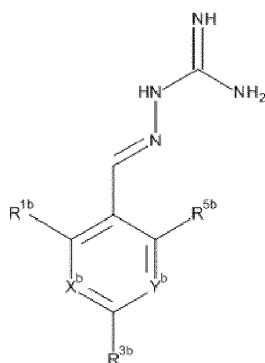
- 40 En una realización, tres de R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan Cl o F y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H, opcionalmente en donde al menos uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} es F.

En una realización, cuando X^a representa CR^{2a} e Y^a representa CR^{4a} , R^{3a} es Cl o F, dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{4a} y R^{5a} son seleccionados de entre F y Cl y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{4a} y R^{5a} representan H.

- 45 En una realización, el compuesto de fórmula IA está en forma de isómero E.

También se describen compuestos de fórmula IB para su uso en el tratamiento de un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B:

- 50



(IB)

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, donde:

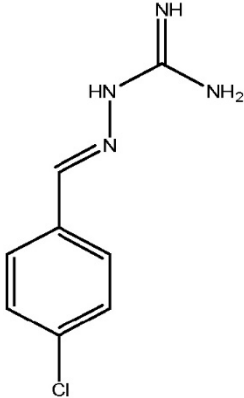
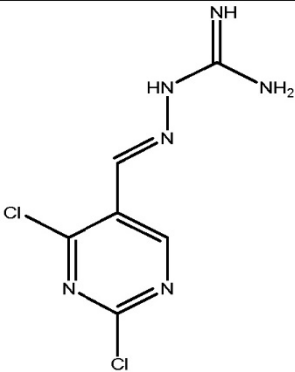
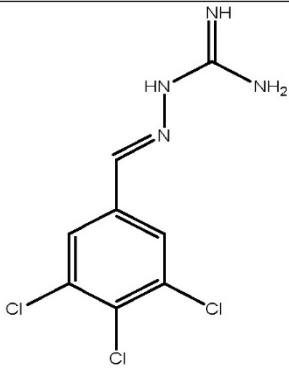
X^b es N o CR^{2b} ;
 Y^b es N o CR^{4b} ;
 R^{1b} es H, F, Cl o Br;
 R^{2b} , R^{3b} , R^{4b} , R^{5b} representan cada uno independientemente H, F o Cl;
 con las condiciones de que:

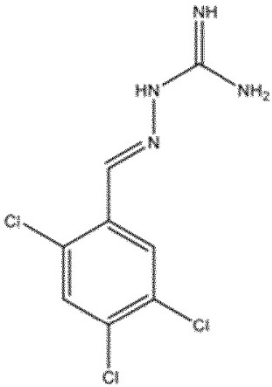
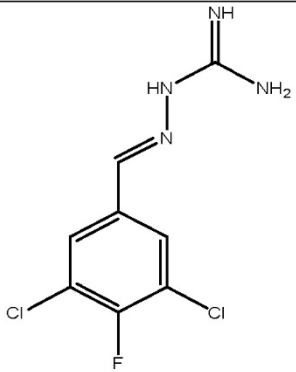
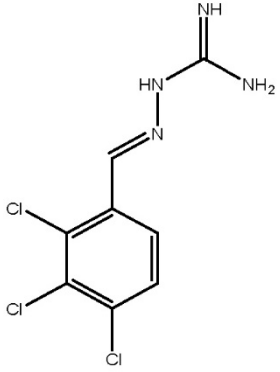
cuando X^b e Y^b representan ambos N, R^{1a} y R^{3b} no son ambos Cl;
 R^{1b} no es Br cuando X^b es CR^{2b} y R^{2b} es Cl;
 cuando R^{3b} y R^{4b} son ambos H, R^{1b} y R^{2b} no son ambos Cl;
 cuando X^b es CR^{2b} y R^{2b} y R^{3b} son ambos H, R^{1b} no es Cl cuando Y^b es CR^{4b} y R^{4b} es F;
 cuando X^b es CR^{2b} e Y^b es CR^{4b} , R^{1b} , R^{2b} , R^{3b} , R^{4b} y R^{5b} no son todos H;
 cuando X^b es CR^{2b} e Y^b es CR^{4b} y R^{2b} , R^{3b} , R^{4b} y R^{5b} son H, R^{1b} no es Cl;
 cuando X^b es CR^{2b} e Y^b es CR^{4b} y R^{2b} , R^{3b} y R^{4b} son H, R^{1b} no es Cl cuando R^{5b} es F;
 cuando X^b es CR^{2b} donde R^{2b} es Cl e Y^b es CR^{4b} donde R^{4b} es H, R^{1b} no es Cl cuando R^{3b} , R^{4b} y R^{5b} son H, o cuando R^{3b} y R^{4b} son H y R^{5b} es Cl.

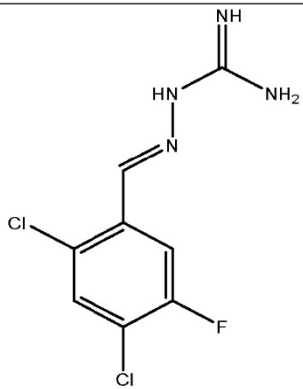
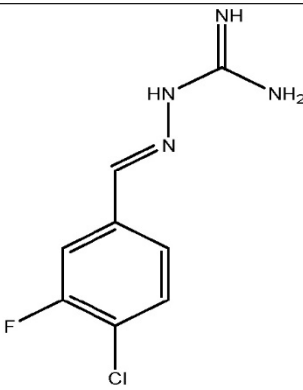
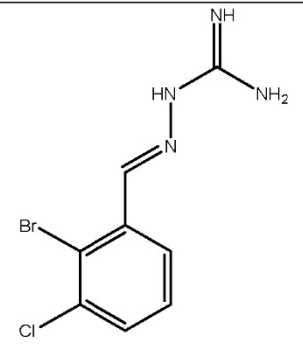
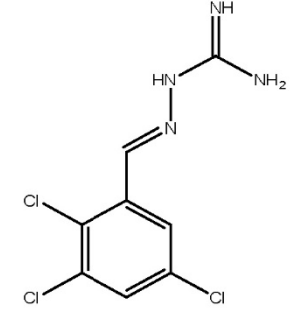
Los compuestos de fórmula IB son inhibidores de R15A y R15B.

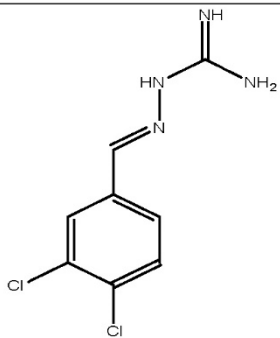
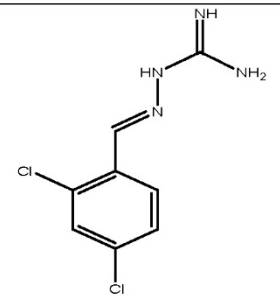
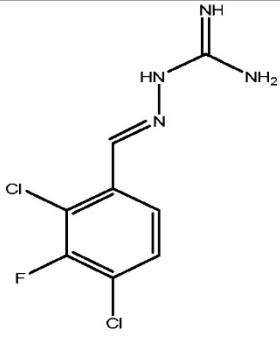
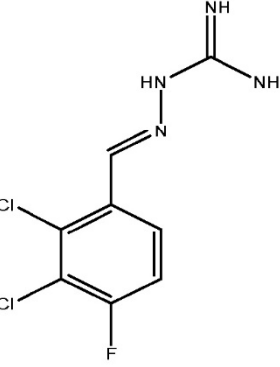
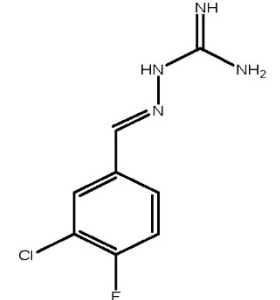
El término "PPP1R15A" se usa de manera intercambiable con el término "R15A" y el término "PPP1R15B" se usa de manera intercambiable con el término "R15B". Un inhibidor de PPP1R15A y PPP1R15B puede denominarse "R15A/B", "R15AB" o "AB" en todas partes.

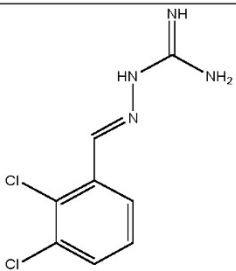
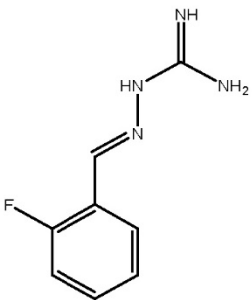
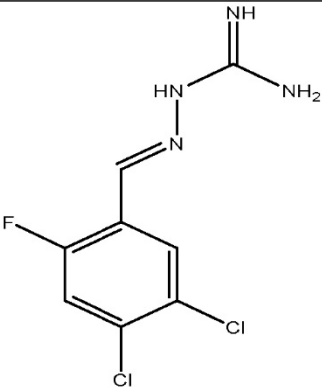
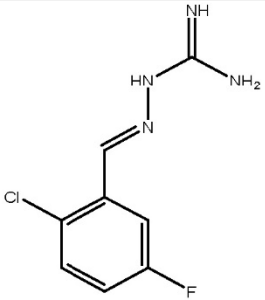
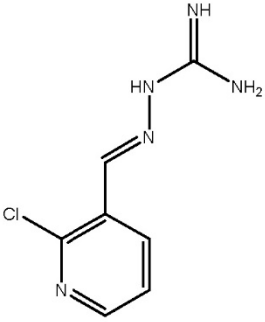
Los compuestos descritos en este documento incluyen:

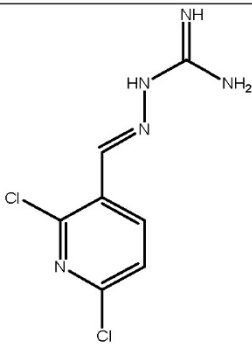
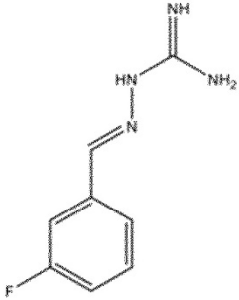
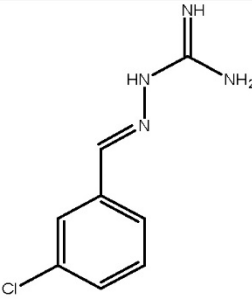
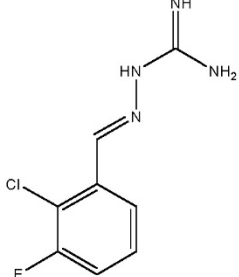
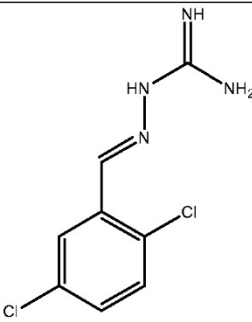
Compuesto 1	
Compuesto 2	
Compuesto 3	

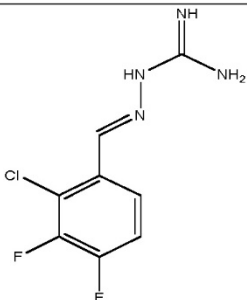
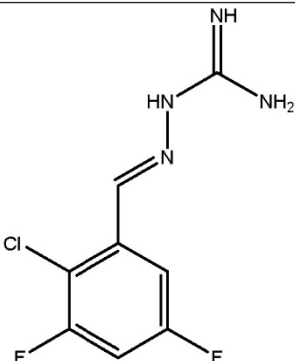
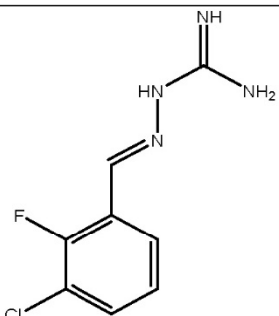
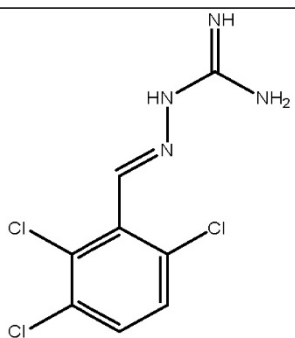
Compuesto 4	
Compuesto 5	
Compuesto 6	

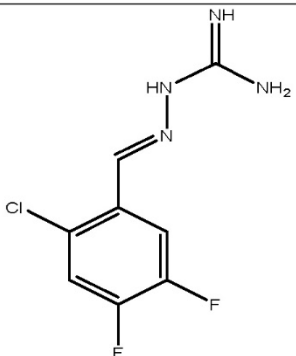
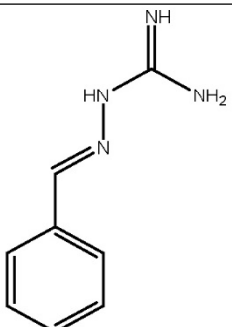
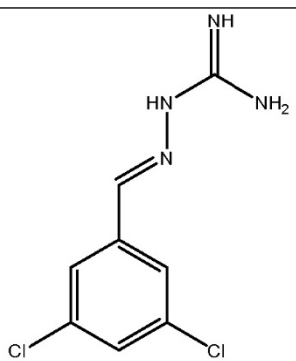
Compuesto 7	
Compuesto 8	
Compuesto 9	
Compuesto 10	

Compuesto 11	
Compuesto 12	
Compuesto 13	
Compuesto 14	
Compuesto 15	

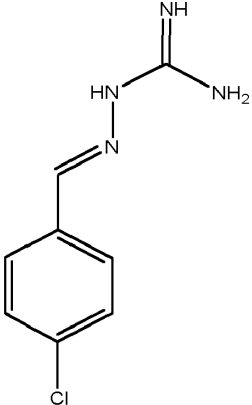
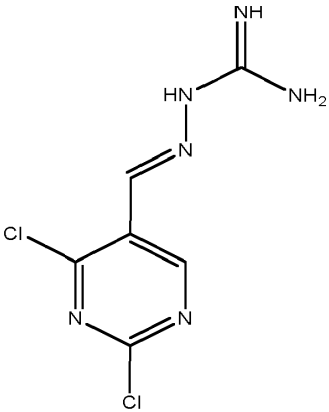
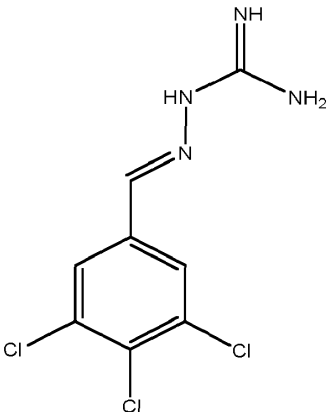
Compuesto 16	
Compuesto 17	
Compuesto 18	
Compuesto 20	
Compuesto 21	

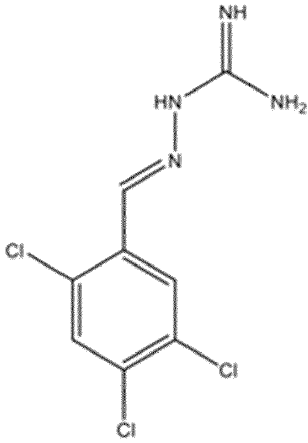
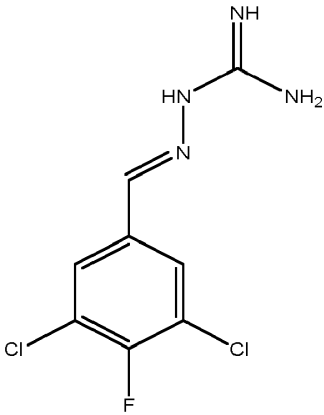
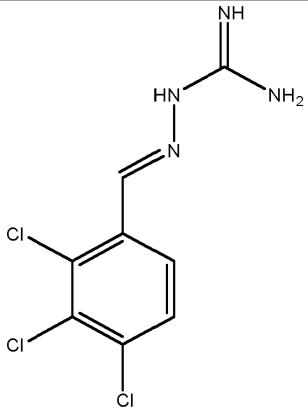
Compuesto 22	
Compuesto 23	
Compuesto 24	
Compuesto 25	
Compuesto 26	

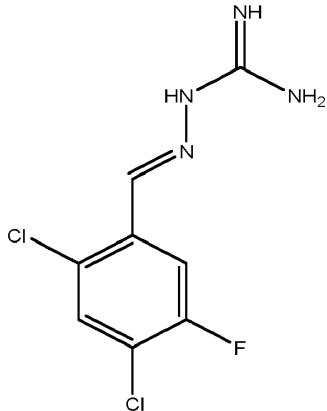
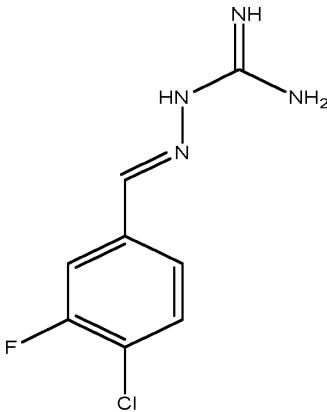
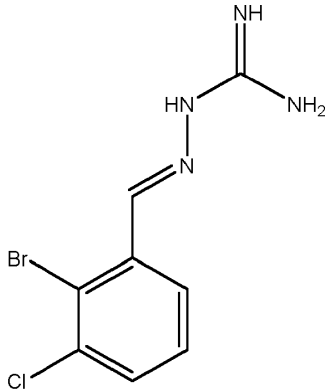
Compuesto 27	
Compuesto 29	
Compuesto 30	
Compuesto 31	

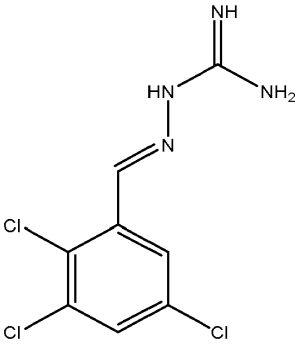
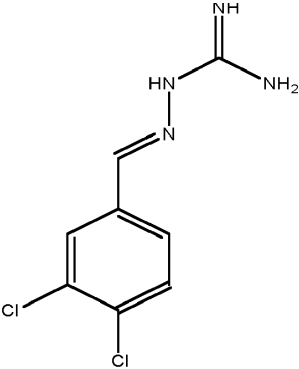
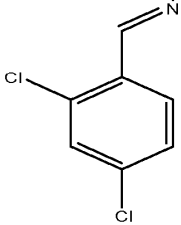
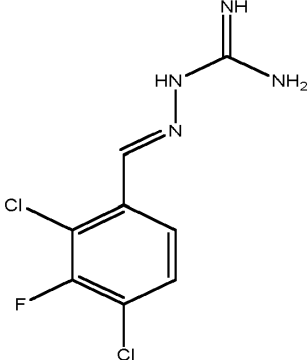
Compuesto 32	
Compuesto 33	
Compuesto 34	

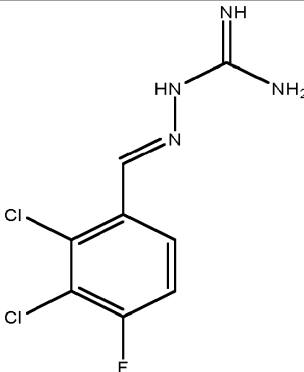
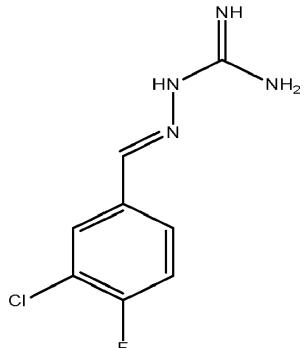
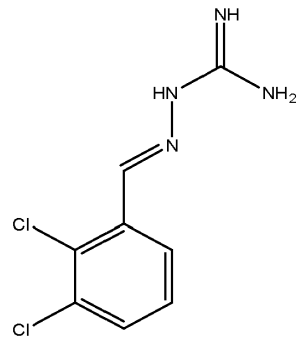
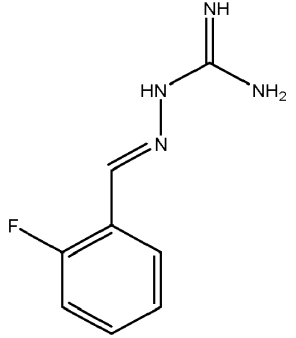
Las formas del isómero E de los compuestos enumerados anteriormente son particularmente preferidas:

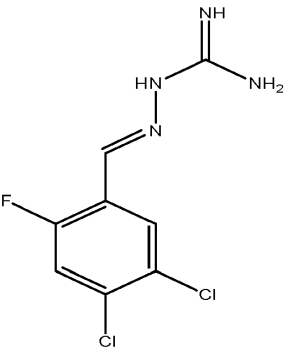
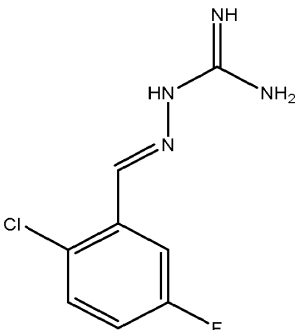
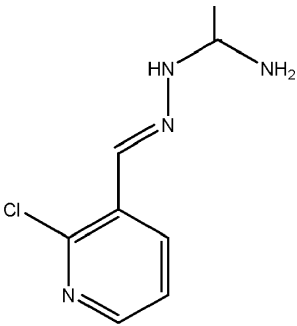
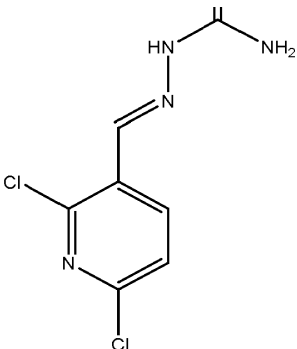
Compuesto 1 (E)	 (E)-2-((4-clorofenil)metileno)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 2 (E)	 (E)-2-((2,4-dicloropirimidina-5-il)metileno)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 3 (E)	 (E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

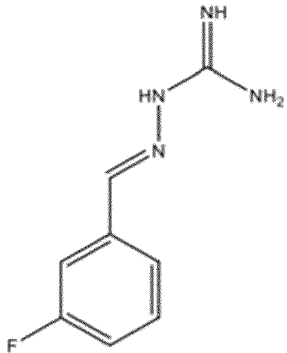
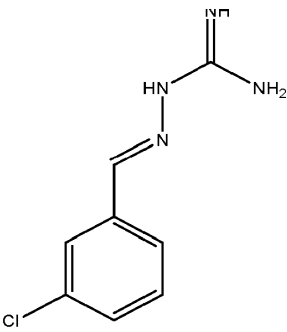
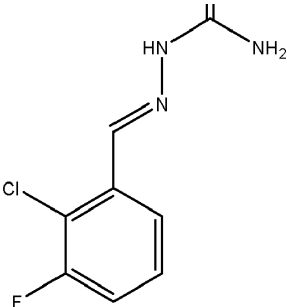
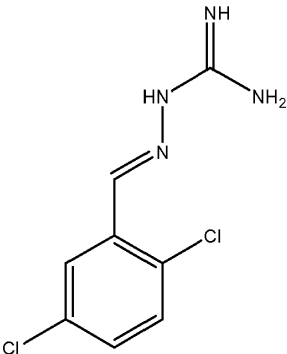
Compuesto 4 (E)	 (E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 5 (E)	 (E)-2-(3,5-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 6 (E)	 (E)-2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

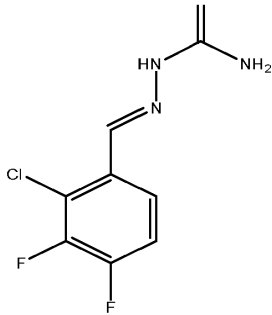
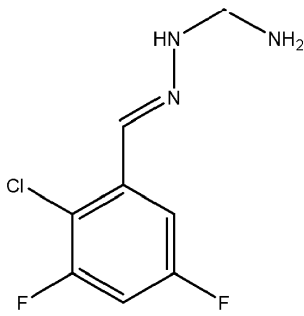
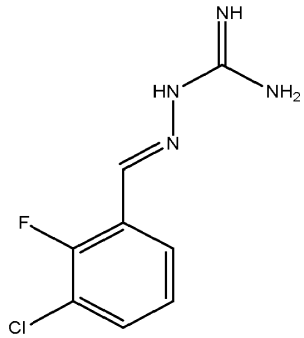
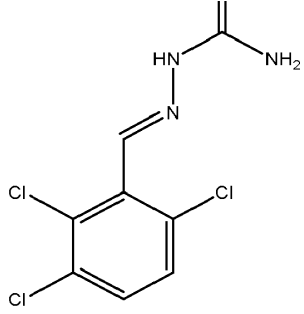
Compuesto 7 (E)	 (E)-2-(2,4-dicloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 8 (E)	 (E)-2-(4-cloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 9 (E)	 (E)-2-(2-bromo-3-clorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

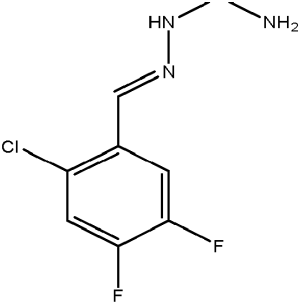
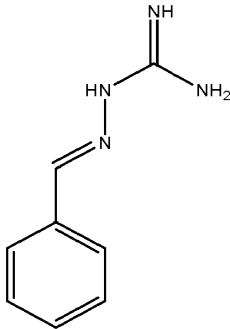
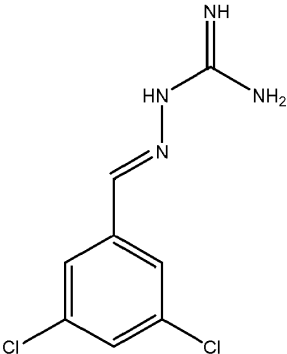
Compuesto 10 (E)	 (E)-2-(2,3,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 11 (E)	 (E)-2-(3,4-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 12 (E)	 (E)-2-(2,4-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 13 (E)	 (E)-2-(2,4-dicloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 14 (E)	

	 (E)-2-(2,3-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 15 (E)	 (E)-2-(3-cloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 16 (E) (Ejemplo 1)	 (E)-2-(2,3-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 17 (E)	 (E)-2-(2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 18 (E)	

	
	(E)-2-(4,5-dicloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 20 (E)	
	(E)-2-(2-cloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 21 (E)	
	(E)-2-((2-cloropiridina-3-il)metileno)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 22 (E)	
	(E)-2-((2,6-dicloropiridina-3-il)metileno)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 23 (E)	

	
	(E)-2-(3-fluorobenziliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 24 (E)	
	(E)-2-(3-clorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 25 (E)	
	(E)-2-(2-cloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 26 (E)	
	(E)-2-(2,5-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 27 (E)	

	
	(E)-2-(2-cloro-3,4-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 29 (E)	
	(E)-2-(2-cloro-3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 30 (E)	
	(E)-2-(3-cloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 31 (E)	
	(E)-2-(2,3,6-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 32 (E)	

	
	(E)-2-(2-cloro-4,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 33 (E)	
	(E)-2-bencilidenhidrazina-1-carboximidamida
Compuesto 34 (E)	
	(E)-2-(3,5-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Los nuevos compuestos de fórmula IA incluyen:

- 5 Compuesto 3: 2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 4: 2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 5: 2-(3,5-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 6: 2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 7: 2-(2,4-dicloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 10 Compuesto 13: 2-(2,4-dicloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 14: 2-(2,3-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 18: 2-(4,5-dicloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 27: 2-(2-cloro-3,4-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 29: 2-(2-cloro-3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 15 Compuesto 32: 2-(2-cloro-4,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Los nuevos compuestos de fórmula IA se pueden seleccionar de las siguientes formas de isómeros E:

- 20 Compuesto 3(E): (E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 4(E): (E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 5(E): (E)-2-(3,5-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Compuesto 6(E): (E)-2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 7(E): (E)-2-(2,4-dicloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 13(E): (E)-2-(2,4-dicloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 14(E): (E)-2-(2,3-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 18(E): (E)-2-(4,5-dicloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 27(E): (E)-2-(2-cloro-3,4-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 29(E): (E)-2-(2-cloro-3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 32(E): (E)-2-(2-cloro-4,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
 Compuesto 34(E): (E)-2-(3,5-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

En una realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula IA es seleccionado del compuesto 3, es decir, 2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida, y el compuesto 4, es decir, 2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida, en particular el compuesto de fórmula IA es seleccionado de entre (E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida y (E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida.

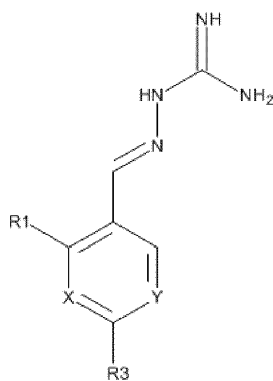
En una realización, el compuesto de fórmula IA es (E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida.

En otra realización, el compuesto de fórmula IA es (E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida.

En una realización, los compuestos de fórmula IA inhiben PPP1R15A y PPP1R15B. La inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B se puede determinar a partir de análisis de unión. Por ejemplo, la unión se puede analizar usando SPR (resonancia de plasmón superficial) para obtener valores K_D . Un inhibidor de PPP1R15A y PPP1R15B puede definirse como un compuesto en el que la diferencia en los valores de K_D entre R15A y R15B no es más de aproximadamente 3 veces. En particular, la diferencia en los valores de K_D entre R15A y R15B no es más de aproximadamente 2 veces. Por ejemplo, la afinidad por una diana sobre la otra es inferior a aproximadamente 3 veces, en particular, inferior a aproximadamente 2 veces. Un "inhibidor selectivo" se puede definir como un compuesto en el que la diferencia en los valores K_D entre R15a y R15b es superior a 3 veces, o incluso más preferentemente 10 o 20 veces.

En las células, los compuestos de fórmula IA inhiben la síntesis de proteínas. A diferencia de guanabenz, un inhibidor de R15A que no inhibe la síntesis de proteínas en células no estresadas (Tsaylor y col., Science, 332, 91-94, 2011), o un inhibidor de R15B que inhibe transitoriamente la síntesis de proteínas, la combinación de un inhibidor de R15A y R15B conduce a una inhibición persistente de la síntesis de proteínas (Figura 12). Asimismo, un inhibidor de R15A y R15B (compuesto 10) inhibe persistentemente la síntesis de proteínas (Figura 12). El gen ATF4 es inducido por el inhibidor de R15A y R15B, lo que confirma que los compuestos están en la diana (Figura 13).

En esta invención se describe el uso de compuestos de fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como inhibidores selectivos de PPP1R15B:



(I)

donde

X es N o CR²;

Y es N, CR⁴;

R¹, R², R³ y R⁴ son seleccionados independientemente de entre H, Cl o F;
 con las condiciones de que:

cuando X es CR² e Y es CR⁴ el compuesto de fórmula I está al menos monosustituido;

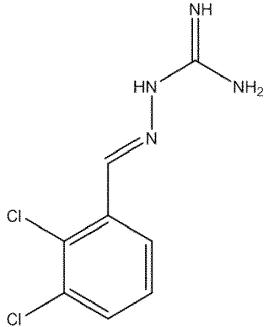
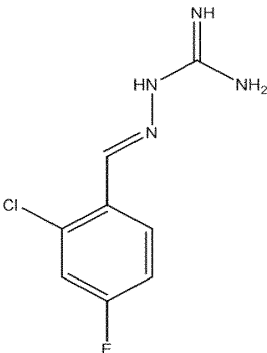
cuando R³ es Cl, R² no es Cl;

cuando ambos R¹ y R⁴ son Cl, R² no es Cl;

cuando el compuesto de fórmula I está disustituido, X es CR², Y es CR⁴ y R¹ es Cl, R³ no es Cl;
 cuando R⁴ es Cl y el compuesto de fórmula I está disustituido, R² no es Cl;
 cuando R¹ es F, R² no es Cl;
 cuando X o Y es N y el compuesto de fórmula I es monosustituido, R¹ no es Cl;
 cuando X es CR², Y es CR⁴ y el compuesto de fórmula I está monosustituido, R¹ no es F o Cl.

5

El inhibidor selectivo de PPP1R15B, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede seleccionar de entre:

Ejemplo 1 (Compuesto 16 (E))	 (E)-2-(2,3-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida
Ejemplo 2	 (E)-2-(2-cloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

10 Sales y ésteres

Los compuestos descritos en esta invención pueden estar presentes como sales o ésteres, en particular sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

15 Las composiciones pueden incluir uno o más de los compuestos descritos en esta invención o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se puede encontrar una revisión de las sales farmacéuticas adecuadas en Berge et al., J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Las sales que no son farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser valiosas como productos intermedios.

20 Los ésteres se forman utilizando ácidos orgánicos o alcoholes / hidróxidos, dependiendo del grupo funcional que se esté esterificando.

Enantiómeros/Tautómeros

25 En todos los aspectos de la presente invención analizados previamente, la invención incluye, cuando sea adecuado, todos los enantiómeros, diastereoisómeros y tautómeros de los compuestos de la invención. El experto en la materia reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse por procedimientos conocidos en la técnica. Los enantiómeros se caracterizan por la configuración absoluta de sus centros quirales y se describen mediante las reglas de secuencia R y S de Cahn, Ingold y Prelog. Tales convenciones son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, véase 'Advanced Organic Chemistry', 3ª edición, ed. March, J., John Wiley y Sons, Nueva York, 1985).

30

Isómeros estereoscópicos y geométricos

Algunos de los compuestos de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y, por lo tanto, puede existir en dos o más formas estereoisoméricas y geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de esos agentes inhibidores y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas conserven la actividad funcional adecuada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como aquella en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica que normalmente se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en compuestos de la invención y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, yodo y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Determinadas variaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radioactivo como ^3H o ^{14}C , son útiles en fármacos y/o en estudios de distribución tisular del sustrato. Se prefieren particularmente los isótopos tritiados, es decir, ^3H , y el isótopo carbono-14, es decir, ^{14}C por su facilidad de preparación y detección. Además, la sustitución con isótopos como el deuterio, es decir ^2H , puede ofrecer ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la semivida *in vivo* o los requisitos de dosificación reducida y, por lo tanto, pueden ser preferidos en algunas circunstancias. Por ejemplo, la invención incluye compuestos de fórmula I donde algún átomo de hidrógeno ha sido reemplazado por un átomo de deuterio. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas adecuadas de reactivos convenientes.

Profármacos

La invención incluye además los compuestos de la presente invención en forma de profármaco, es decir, compuestos unidos covalentemente que liberan el fármaco original activo de acuerdo con cualquiera de los compuestos ejemplificados *in vivo*. Dichos profármacos son generalmente compuestos de la invención en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de manera que la modificación puede revertirse tras la administración a un sujeto humano o mamífero. La reversión se realiza habitualmente mediante una enzima presente de forma natural en dicho sujeto, aunque es posible administrar un segundo agente junto con dicho profármaco para realizar la reversión *in vivo*. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de los descritos anteriormente), en los que la reversión puede llevarse a cabo con una esterasa, etc. Otros de dichos sistemas serán bien conocidos por los expertos en la materia.

Solvatos

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

Polimorfos

La invención se refiere además a los compuestos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas hidratadas y/o anhidricas. Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de dichas formas variando ligeramente el procedimiento de purificación y/o aislamiento de los disolventes usados en la preparación sintética de dichos compuestos.

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Los compuestos descritos en esta invención tienen aplicaciones terapéuticas potenciales para tratar y prevenir diversas enfermedades y trastornos.

Un aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula IA para uso en terapia.

También se describe un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o una alteración en la homeostasis proteica, donde el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

También se describe un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B, donde el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

También se describe un procedimiento para prevenir un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o una alteración en la homeostasis proteica en un sujeto, donde el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

5 También se describe un procedimiento para prevenir un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B en un sujeto, donde el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula IA para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o la alteración en la homeostasis proteica.

Otro aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula IA para uso en el tratamiento o prevención de un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B.

15 También se describe el uso de un compuesto de fórmula IA en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o la alteración en la homeostasis proteica.

20 También se describe el uso de un compuesto de fórmula IA en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B.

25 Las enfermedades relacionadas con PPP1R15A y PPP1R15B son enfermedades que pueden mejorarse mediante inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B. Estos incluyen trastornos asociados con la acumulación de proteínas mal plegadas o la alteración en la homeostasis proteica (proteostasis), como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, ataxias y otros trastornos de la poliglutamina, así como la degeneración de la retina, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedades priónicas; trastornos asociados con la agregación de la proteína tau asociada a los microtúbulos e incluyen la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y complejo parkinsonismo-demencia, enfermedad del grano argirofílico, encefalopatía traumática crónica, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNTC), síndrome de Down, demencia británica familiar (FBD), demencia danesa familiar (FDD), demencia frontotemporal y parkinsonismo relacionados con el cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobar frontotemporal (DLFT), enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, parkinsonismo de Guadalupe, distrofia miotónica, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de la motoneurona no guameña con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral con proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, retraso mental relacionado con SLC9A6, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo ovillos, y tauopatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares; trastornos de la mielina, como esclerosis múltiple, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de desvanecimiento de la sustancia blanca, encefalomiелitis diseminada aguda, leucomalacia periventricular, lesión de la sustancia blanca periventricular, Tabes dorsalis, enfermedad de Devic, neuritis óptica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, mielitis transversa, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía periférica anti-MAG, adrenoleucodistrofia, adrenomieloneuropatía, lesión difusa de la sustancia blanca, síndrome de Guillain-Barré, mielínolisis central pontina, enfermedades desmielinizantes hereditarias tales como leucodistrofia y enfermedad de Charcot Marie Tooth; enfermedades causadas por el mal plegamiento o defectos de tráfico de cualquier proteína producida en el retículo endoplásmico (RE), como fibrosis quística, bocio hipotiroideo congénito, diabetes neurohipofisaria familiar, trastornos de la biosíntesis de procolágeno, incluida la osteogénesis imperfecta, hipercolesterolemia, deficiencias de alfa-1 antitripsina, trastorno lisosómico, retinitis pigmentosa (RP) y enfermedad inflamatoria intestinal; enfermedades metabólicas, tales como diabetes, síndrome de Wolcott-Rallison, obesidad, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, enfermedad del hígado graso y aterosclerosis; cáncer; envejecimiento; inflamación; y otros trastornos que incluyen artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y vitiligo.

50 En una realización preferida de la invención, los compuestos descritos en esta invención son para el uso en el tratamiento de trastornos asociados con UPR o ISR patológicas y/o defectos en la homeostasis proteica.

55 Como se usa en esta invención, el término "procedimiento" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada, incluidos, pero sin limitarse a, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos que se conocen o se desarrollan fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por practicantes de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

60 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad del compuesto que se administra que logrará el objetivo del procedimiento citado, por ejemplo, aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la enfermedad, afección o trastorno que se está tratando.

65 En esta invención, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una enfermedad o trastorno, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos de una enfermedad o trastorno.

La frase "fabricación de un medicamento" incluye el compuesto descrito anteriormente directamente como medicamento además de su uso en un programa de selección de agentes activos adicionales o en cualquier etapa de la fabricación de dicho medicamento.

5 ***Enfermedades con potencial plegamiento incorrecto de proteínas o péptidos y/o agregación en su modo de acción***

Las proteínas que causan enfermedades se expresan a lo largo de la vida, pero las enfermedades degenerativas son en su mayoría de aparición tardía. Esto sugiere que las diferentes proteínas que causan enfermedades gradualmente se vuelven perjudiciales con el tiempo. Si bien ahora está bien establecido que las proteínas mal plegadas causan distintas enfermedades degenerativas, sigue sin estar claro por qué se acumulan. Las células normalmente se esfuerzan por asegurar que las proteínas estén correctamente plegadas y, de hecho, todas las células tienen sistemas de control de calidad de proteínas potentes y sofisticados que manejan de manera muy eficaz las proteínas potencialmente dañinas durante décadas. Sin embargo, los mecanismos de control de la calidad de las proteínas parecen fallar gradualmente con la edad, lo que lleva a la acumulación de proteínas mal plegadas con las consecuencias catastróficas resultantes para las células y los organismos. Estas proteínas o péptidos mal plegados/agregados pueden estar presentes dentro o fuera de la célula y pueden encontrarse en cualquier lugar. En principio, potenciar las defensas celulares naturales contra proteínas mal plegadas debería representar un enfoque genérico para reducir la patología en diversas enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas donde las proteínas mal plegadas/propensas a la agregación están presentes en la patología. La presente invención describe dicho enfoque y demuestra tanto su seguridad como su eficacia en un mamífero.

Enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), ataxias y otros trastornos poliglutaminicos, tauopatías, así como degeneración retiniana, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedades priónicas son devastadores y afectan a un número cada vez mayor de personas de la población que envejece. Estas enfermedades son clínicamente diversas pero comparten un mecanismo común. Son causadas por la disfunción progresiva y la muerte de células nerviosas específicas en regiones selectivas del cerebro debido a la acumulación de proteínas específicas de forma aberrante. Las proteínas propensas a la agregación y mal plegadas incluyen, pero no se limitan a: Aβ42, α-sinucleína, TAU, TDP-43, TLS/FUS, SOD1, Huntingtina y otras proteínas con expansión de poliglutaminas, priones y producto(s) de traducción de C9ORF72.

El solicitante ha demostrado que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe selectivamente PPP1R15B-PP1, corrigiendo una enfermedad de plegamiento incorrecto de proteínas en ratones. Por tanto, los inhibidores de PPP1R15B descritos en esta invención tienen aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de una variedad de enfermedades en las que está implicada una proteína mal plegada y, en particular, con una acumulación de proteínas mal plegadas. También se espera que los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B tengan aplicación en el tratamiento de enfermedades en las que está implicada una proteína mal plegada.

La presente invención proporciona la terapia de trastornos por poliglutaminas.

La enfermedad de Huntington pertenece a un grupo más amplio de trastornos, los "trastornos por poliglutamina", que se caracterizan por la expansión de los codones CAG traducidos en glutamina en proteínas no relacionadas. La enfermedad de Huntington es causada por una expansión en el gen que codifica Huntingtin; La atrofia muscular espinal y bulbar, la atrofia dentatorubro-pálidoluisiana y las ataxias espinocerebelosas son causadas por la expansión de genes que codifican el receptor de andrógenos, la atrofina 1, la ataxina 1, 2, 3, la subunidad del canal de calcio dependiente del voltaje α y la TBP, respectivamente. La expansión de CAG se traduce en poliglutamina y provoca la agregación de la proteína afectada. En consecuencia, la prevención y/o el tratamiento de trastornos por poliglutamina como estos están dentro del alcance de la invención.

Como ejemplo, el solicitante ha demostrado que el compuesto del Ejemplo 1 mejora la enfermedad de Huntington en un mamífero. Por tanto, sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que un inhibidor de PPP1R15B tiene un efecto protector contra diversas enfermedades causadas por proteínas mal plegadas/agregadas tales como, pero sin limitarse a, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH), ataxias y otros trastornos por poliglutaminas, así como, degeneración retiniana, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), tauopatías y enfermedades priónicas. Se espera que los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B tengan el mismo efecto.

Las enfermedades incluyen cualquier enfermedad el mal plegamiento/agregación está relacionado con las proteínas conocidas en la actualidad y descritas anteriormente, pero también será aplicable a nuevas proteínas y quizás a nuevas enfermedades en el futuro.

En una realización preferida de la invención, la invención proporciona la terapia de enfermedades de proteostasis.

En otra realización, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de una enfermedad en la que la acumulación de proteínas mal plegadas está implicada en el modo de acción.

En una realización adicional, la enfermedad o trastorno es enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (HD), ataxias u otro trastorno por poliglutaminas, degeneración retiniana, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), tauopatías o una enfermedad priónica.

En una realización particular, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

En otra realización, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En una realización, la enfermedad o trastorno está asociado con la agregación de la proteína tau asociada a microtúbulos.

El solicitante ha demostrado que el compuesto del Ejemplo 1 inhibe selectivamente PPP1R15B-PP1, corrigiendo una enfermedad de plegamiento incorrecto de proteínas en ratones. Los inhibidores de PPP1R15B también pueden ser útiles para prevenir o detener la progresión de enfermedades causadas por el mismo mecanismo: acumulación de proteínas mal plegadas. También se espera que los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B tengan esta aplicación.

Algunos ejemplos de dichas enfermedades incluyen enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y, parkinsonismo y demencia, enfermedad de granos argirófilos, encefalopatía traumática crónica, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificaciones (DNFC), síndrome de Down, demencia británica familiar (FBD), demencia danesa familiar (FDD), demencia frontotemporal y parkinsonismo relacionados con el cromosoma 17 (FTDP-17) (causada por mutaciones de MAPT), degeneración lobar frontotemporal (DLFT) (algunos casos causados por mutaciones de C9ORF72), enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, parkinsonismo de Guadalupe, distrofia miotónica, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de la motoneurona no guameña con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral con proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, retraso mental relacionado con SLC9A6, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo ovillos, tauopatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares.

En una realización, la enfermedad es un trastorno de la mielina.

La mielina es una proteína abundante tanto del sistema nervioso central como del periférico. Es producida por dos tipos de células: oligodendrocitos en el sistema nervioso central y células de Schwann en el sistema nervioso periférico. La mielina forma una vaina alrededor de los axones para asegurar la velocidad de conducción de los impulsos eléctricos a lo largo de un axón y para evitar que la corriente eléctrica se disipe del axón. La función de la mielina es esencial para el sistema nervioso.

Los trastornos de la mielina afectan a más de 2,5 millones de personas en todo el mundo y se definen como una enfermedad asociada con daños en la mielina. Los trastornos de la mielina se manifiestan por diversos síntomas que incluyen, entre otros, deficiencias motoras, deficiencias sensoriales, disfunción cognitiva, alteraciones emocionales y alteraciones de la coordinación.

Existen muchos trastornos desmielinizantes, el más común de los cuales es la esclerosis múltiple (EM). La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune que afecta el cerebro y la médula espinal y produce desmielinización en el cerebro. Además de la EM, otros trastornos desmielinizantes incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher y la enfermedad de desvanecimiento de la sustancia blanca, encefalomiелitis diseminada aguda, leucomalacia periventricular, lesión de la sustancia blanca periventricular, Tabes dorsalis, enfermedad de Devic, neuritis óptica, leucoencefalopatía multifocal progresiva, miелitis transversa, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía periférica anti-MAG, adrenoleucodistrofia, adrenomieloneuropatía, lesión difusa de la sustancia blanca, síndrome de Guillain-Barré, mielinólisis central pontina, enfermedades desmielinizantes hereditarias tales como leucodistrofia y enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT).

La enfermedad de CMT es un grupo de neuropatías de mielina causadas por mutaciones en varios genes. Las mutaciones en la proteína de mielina periférica PMP22 son las causas más comunes de la enfermedad de CMT. Una mutación en PMP22 (Trembler-J) causa el plegamiento incorrecto de PMP22 y da como resultado una enfermedad en ratones que se asemeja a la CMT en humanos debido a defectos en la mielina en el sistema nervioso periférico. Los solicitantes han demostrado que el compuesto del Ejemplo 1 puede mejorar la mielinización en explantes de ratones neuropáticos. Los solicitantes han demostrado que la mejora de la mielinización en explantes de ratones neuropáticos predice la eficacia en un mamífero (Das y col. Science, 2015). Por tanto, el compuesto del Ejemplo 1 será útil en el tratamiento de la enfermedad de CMT en mamíferos y otros trastornos de la mielina en los que se sabe que los mecanismos son similares e implican la vía eIF2 α (Lin y Popko, Nat. Neurosci., 12, 379-385, 2009) y se prevé que los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B, como los compuestos de fórmula (I), también serán útiles en el tratamiento de la enfermedad CMT.

En una realización, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de trastornos de la mielina.

En otra realización, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Charcot Marie Tooth.

En otra realización más, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de trastornos de la mielina del sistema nervioso central, por ejemplo, esclerosis múltiple. Se sabe que los mecanismos de la enfermedad de CMT y de la EM son similares a un agotamiento de las células productoras de mielina (células de Schwann en la enfermedad de CMT y oligodendrocitos en la EM) e involucran la señalización patológica de la vía de eIF2 α -RRR1R15A (Lin y Popko, Nat. Neurosci., 12, 379-385, 2009). Dado que los solicitantes han demostrado que el Ejemplo 1 es eficaz en una mielinopatía y también han demostrado la biodisponibilidad de un compuesto del Ejemplo 1 tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Figura 5), se prevé que los inhibidores de PPP1R15B y los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B serán útiles en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En una realización, la enfermedad es una enfermedad que surge como consecuencia de una mutación en una proteína que da como resultado su mal plegamiento y localización errónea o defectos de tráfico.

Los solicitantes han demostrado que el compuesto del Ejemplo 1 puede rescatar defectos causados por una proteína mal plegada, PMP22, sintetizada en el retículo endoplásmico (RE). Debido al mecanismo de acción (disminución de la traducción para aumentar el plegamiento), un inhibidor de PPP1R15B y un inhibidor de PPP1R15A y PPP1R15B también serán útiles para el tratamiento de enfermedades debidas al plegamiento incorrecto o defectos de tráfico de cualquier proteína producida en el RE, incluidas las proteínas transmembrana o secretadas.

Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen: fibrosis quística causada por mutaciones que alteran el plegamiento de la proteína transmembrana (CFTR); bocio hipotiroideo congénito con deficiencia de tiroglobulina debido al plegamiento incorrecto y/o defecto de tráfico de la hormona tiroglobulina; diabetes insípida neurohipofisaria familiar causada por plegamiento incorrecto y ausencia de arginina vasopresina circulante (esto también puede incluir determinadas formas de diabetes insípida nefrogénica heredada genéticamente); trastornos de la biosíntesis de procolágeno en los que la enfermedad está causada por un fallo en el plegado, ensamblaje y sintetización del colágeno, tal como, pero sin limitarse a, osteogénesis imperfecta; de manera más general, cualquier enfermedad genética de los tejidos conectivos en la que el plegamiento incorrecto / falta de síntesis o localización errónea de las proteínas está en el modo de acción, como la displasia de la placa de crecimiento asociada con defectos de proteínas de la matriz extracelular; hipercolesterolemia, con defectos moleculares causados por mutaciones en el receptor de LDL que causan falta de síntesis, transporte intracelular alterado o función anormal; deficiencias de alfa-1 antitripsina debido al plegamiento incorrecto de alfa 1 antitripsina; trastorno lisosómico debido al plegamiento incorrecto de proteínas asociadas con la función lisosómica, como la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Anderson-Fabry; retinitis pigmentosa (RP), que es la forma más común de degeneración retiniana hereditaria causada por el plegamiento incorrecto de las proteínas de rodopsina, su retención del RE y el estrés del RE y la muerte celular resultantes; y enfermedad inflamatoria del intestino que se asocia con estrés del RE.

Por las mismas razones, se puede usar un inhibidor de PPP1R15B o un inhibidor de PPP1R15A y PPP1R15B para tratar los siguientes trastornos, asociados con UPR patológica y/o defectos en una proteína transmembrana (Lin y Popko, Nat. Neurosci., 12, 379-385, 2009). Estos trastornos incluyen, pero no se limitan a la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher asociada con mutaciones en el gen de la proteína proteolípida de membrana (PLP) y la enfermedad de desvanecimiento de la sustancia blanca (VWM), así como la esclerosis múltiple, un trastorno común de la mielina.

En una realización, los compuestos descritos en esta invención son para uso en el tratamiento de enfermedades que surgen de una mutación en una proteína que da como resultado el plegamiento incorrecto de la proteína y defectos de localización o tráfico incorrectos.

En otra realización, la enfermedad, que surge de una mutación en una proteína que da como resultado un plegamiento incorrecto de la proteína y defectos de localización o tráfico, es seleccionada de entre fibrosis quística, bocio hipotiroideo congénito, diabetes insípida neurohipofisaria familiar, trastornos de la biosíntesis de procolágeno tales como osteogénesis, hipercolesterolemia, deficiencia de alfa-1 antitripsina, trastornos lisosomales como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Anderson-Fabry, la retinosis pigmentaria y la enfermedad inflamatoria intestinal.

En una realización, la enfermedad es una enfermedad metabólica.

Se sabe que las enfermedades metabólicas como la diabetes, la obesidad, la resistencia a la insulina, la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso y la aterosclerosis están asociadas con el estrés patológico del RE y se cree que los moduladores farmacológicos de la UPR pueden tener un beneficio terapéutico (Cao y Kaufman, 2012, Curr Biol, volumen 22 (16)). Sin embargo, como no había inhibidores de PPP1R15B previamente disponibles y se predijo que la inhibición de PPP1R15B sería perjudicial, y además, dado que inhibir las fosfatasa es un desafío, no estaba claro si PPP1R15B podría ser una diana terapéutica en enfermedades metabólicas.

Los inventores han demostrado que el compuesto del Ejemplo 1 puede mejorar un trastorno metabólico en un mamífero (Figura 11). Por lo tanto, los inhibidores de PPP1R15B serán útiles para tratar trastornos metabólicos tales como, pero sin limitarse a, diabetes, obesidad, enfermedad del hígado graso y aterosclerosis. También se espera que los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B, tales como los compuestos de fórmula (I), también sean útiles en el tratamiento de trastornos metabólicos.

En una realización, los compuestos descritos en esta invención se utilizan en el tratamiento de trastornos metabólicos.

En una realización preferida de la invención, el trastorno metabólico es seleccionado de entre diabetes, obesidad, enfermedad del hígado graso y aterosclerosis.

Los inhibidores selectivos de PPP1R15B también son útiles en el tratamiento de otros trastornos que incluyen artritis reumatoide, diabetes, síndrome de Wolcott Rallison, enfermedad inflamatoria intestinal y vitiligo, que involucran a la UPR en su mecanismo de acción (Cao y Kaufman, 2012, Curr Biol, vol. 22 (16)). También se espera que los inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B, tales como los compuestos de fórmula (I), sean útiles en el tratamiento de estos trastornos.

Cáncer

En una realización, un compuesto descrito en esta invención se utiliza en el tratamiento del cáncer.

Las células cancerosas tienen un alto requerimiento metabólico y su proliferación depende de una síntesis de proteínas eficiente. El inicio de la traducción juega un papel crucial en el control de la homeostasis, diferenciación, proliferación y transformación maligna de las proteínas. El aumento de la iniciación de la traducción contribuye a la iniciación del cáncer y, a la inversa, la disminución de la iniciación de la traducción podría reducir el crecimiento tumoral (Donze y col., 1995, EMBO J, 14, 3828-34; Pervin y col., 2008, Cancer Res, 68, 4862-74; Chen y col., 2011, Nat Chem Biol, 7, 610-6). Sin desear ceñirse a la teoría, se cree que la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B podría reducir la traducción en células tumorales y, por tanto, reducir el crecimiento tumoral.

Envejecimiento

Existe abundante bibliografía que muestra que la reducción de la síntesis de proteínas aumenta la esperanza de vida (Tavernarakis, 2008, Trends Cell Biol, 18 (5), 228-235). Por lo tanto, es razonable predecir que la reducción de la síntesis de proteínas mediante la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B aumentará la vida útil.

Inflamación

Salubrinal es un inductor de la fosforilación de eIF2a y se cree que inhibe las fosfatasa R15A y R15B por un mecanismo desconocido. Se encontró que Salubrinal suprime la inflamación (Hamamura y col., 2015, Cellular Signaling, 27 (4), 828-835). Sin embargo, Salubrinal no se puede utilizar en humanos debido a problemas de toxicidad. Es razonable anticipar que los inhibidores de R15A/B descritos aquí serán una terapia potencial para enfermedades que involucran inflamación.

Un conjunto no exhaustivo de ejemplos de enfermedades asociadas con la inflamación son: artritis, colitis ulcerosa y enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones asociadas con la inflamación, fibrosis, enfermedades neurodegenerativas asociadas con la inflamación o, en general, cualquier enfermedad humana asociada con la inflamación.

En particular, las enfermedades asociadas con la inflamación incluyen: artritis reumatoide; esclerosis múltiple; enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que es un término utilizado principalmente para describir dos afecciones, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn; diabetes; nefritis lúpica; enfermedad autoinmune del oído interno (AIED); fibrosis quística; la enfermedad de Graves; miocarditis; hepatitis autoinmune; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson; esclerodermia; enfermedad de la vesícula; tiroiditis de Hashimoto; reacción autoinmune que se origina en el intestino desencadenada por anticuerpos contra enzimas y proteínas tiroideas; Síndrome de Guillain-Barre, una agresión autoinmune al sistema nervioso a menudo desencadenado por una respuesta autoinmune a factores estresantes externos como las vacunas; polimialgia reumática; leucemia; y asma.

Agentes antivirales

Los compuestos descritos en esta invención pueden usarse como agentes antivirales. La síntesis de proteínas es necesaria para la replicación viral. Habiendo demostrado que los inhibidores de AB inhiben la síntesis de proteínas, es razonable anticipar que bloquearán la replicación viral y serán útiles para prevenir enfermedades infecciosas en humanos. De hecho, a modo de ejemplo, se ha demostrado previamente que salubrinal, un inductor de la fosforilación de eIF2a bloquea la replicación del virus Herpes simplex (Boyce, M., y col. (2005) Science 307 (5711), 935-939). Sin embargo, Salubrinal no se puede utilizar en humanos debido a problemas de toxicidad. Por lo tanto, los inhibidores de R15A/B descritos en esta invención pueden tener una ventaja terapéutica sobre otros inhibidores de la traducción.

Los solicitantes han demostrado que un inhibidor de PPP1R15B puede prevenir la enfermedad de Huntington. PPP1R15B se expresa de manera constitutiva y, por lo tanto, es una diana de la enfermedad de aplicación más amplia. Es razonable anticipar que los inhibidores de AB administrados a una dosis tal que las dianas solo se inhiban mediante pulsos cortos evitarán la mayoría (si no todas) las enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en esta invención para su uso en terapia combinado con cualquier portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "composición farmacéutica" en el contexto de esta invención significa una composición que comprende un agente activo y adicionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los expertos en la materia conocen excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables y generalmente incluyen una composición, material, portador, diluyente o vehículo aceptables adecuados para administrar un compuesto de la invención a un animal.

En una realización, el animal es un mamífero. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración por vía oral, tópica (incluida la administración cutánea, bucal y sublingual), rectal o parenteral (incluida la administración, intradérmica, intramuscular e intravenosa), nasal y pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación. La formulación se puede presentar, cuando sea adecuado, convenientemente en formas de dosificación unitarias y puede prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Sin embargo, las dosificaciones se pueden variar según los requisitos del paciente, la gravedad de la afección que se trate y el compuesto que se utilice. La determinación de la dosis efectiva está dentro del alcance del experto, sin una carga indebida. Las formas de dosificación adecuadas para la administración a mamíferos, incluidos los seres humanos, se encuentran típicamente en el intervalo de hasta 100 mg/kg peso corporal, o puede ser de 0,1mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg, 30mg/kg, por ejemplo.

En esta invención, también se describe un proceso para preparar una composición farmacéutica o veterinaria tal como se describió anteriormente, y el proceso comprende la asociación del (de los) compuesto(s) activo(s) con el vehículo, por ejemplo, mediante mezcla.

En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto. La descripción se extiende a los procedimientos para preparar una composición farmacéutica que comprende poner un compuesto descrito en esta invención en conjunto o asociación con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar un compuesto activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos en trozos o ambos y después, si es necesario, darle forma al producto hasta alcanzar la formulación deseada.

COMBINACIONES

En una realización particularmente preferida, el uno o más compuestos de la invención se administran en combinación con uno o más de otros agentes activos, por ejemplo, fármacos existentes disponibles en el mercado. En tales casos, los inhibidores de la invención se pueden administrar de forma consecutiva, simultánea o secuencial con uno o más de los otros agentes activos.

La combinación de un compuesto que es un inhibidor de R15A con un compuesto que es un inhibidor de R15B da como resultado las mismas propiedades ventajosas que un compuesto que inhibe tanto R15A como R15B. Por tanto, un aspecto de la presente invención proporciona una combinación de un compuesto inhibidor de R15A y un compuesto inhibidor de R15B. La combinación es útil en el tratamiento de un estado de enfermedad aliviado por la inhibición de PPP1R15A y PPP1R15B, por ejemplo, un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o un trastorno de proteostasis. La combinación puede ser guanabenz, un inhibidor de R15A conocido, y (E)-2-(2,3-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida (compuesto 16), un inhibidor de R15B.

Los medicamentos en general son más efectivos cuando se usan en combinación. En particular, la terapia de combinación es deseable para evitar una superposición de las principales toxicidades, mecanismo de acción y mecanismo(s) de resistencia. Además, también es deseable administrar la mayoría de los fármacos en sus dosis máximas toleradas con intervalos de tiempo mínimos entre dichas dosis. Las principales ventajas de combinar fármacos son que pueden favorecer efectos aditivos o posibles sinérgicos a través de interacciones bioquímicas y también pueden disminuir la aparición de resistencias.

Se pueden sugerir combinaciones beneficiosas mediante el estudio de la actividad inhibidora de los inhibidores de prueba con agentes de los que se sabe o se sospecha que son valiosos en el tratamiento de un trastorno en particular. Este procedimiento también se puede utilizar para determinar el orden de administración de los agentes, es decir, antes, simultáneamente o después de la administración. Dicha programación puede ser una característica de todos los agentes activos identificados en este documento.

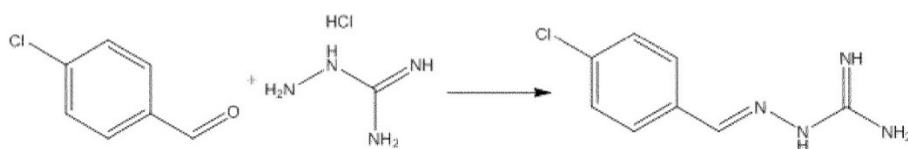
EJEMPLOS

Preparación de los compuestos de acuerdo con la presente invención

Los compuestos de acuerdo con la presente invención y descritos en esta invención se pueden preparar según los siguientes procedimientos, que se muestran con respecto a las formas isoméricas E. A partir de estos procedimientos, el experto en la materia sabrá cómo podrían obtenerse otras formas isoméricas, o el racemato.

Compuesto 1 - (E)-2-((4-clorofenil)metileno)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:



Detalles experimentales:

Cálculo:

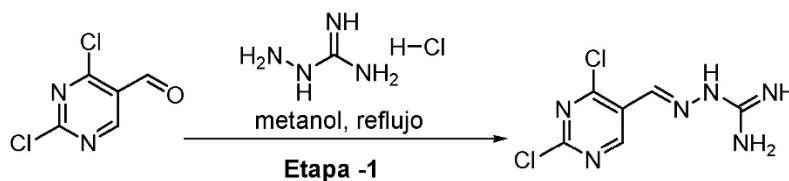
	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	4-clorobenzaldehído	0,060 g	140,57	0,00042	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,047g	110,55	0,00042	1,00
3	Acetato de sodio	0,034 g	82,03	0,00042	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

A una solución de 4-clorobenzaldehído (0,060 g , 0,00042 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,047 g, 0,00042 mol) y acetato de sodio (0,034 g, 0,00042 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,040 g, rendimiento del 47,8 %).

Compuesto 2 - (E)-2-((2,4-dicloropiridina-5-il)metileno)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de reacción



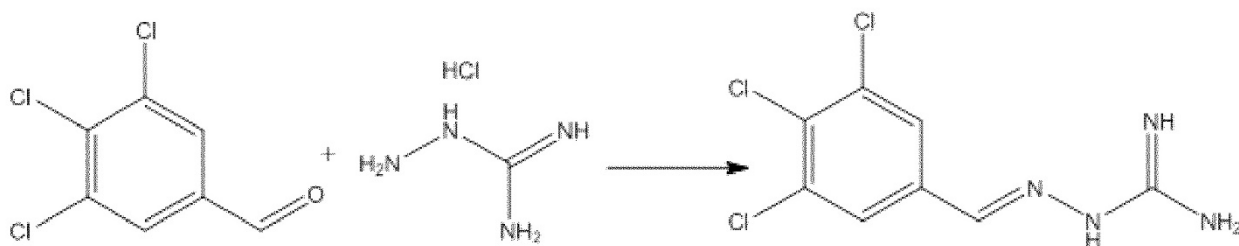
Detalles experimentales:

A una solución del Compuesto 14 (0,1 g, 0,56 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,50 g, 0,45 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 80 % en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se

agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y luego se secó al vacío. El material sólido obtenido se purificó adicionalmente mediante purificación por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (0,028 g, 27,12 %).

5 **Compuesto 3 - (E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**

Esquema de síntesis:



10 **Detalles experimentales:**

Cálculo:

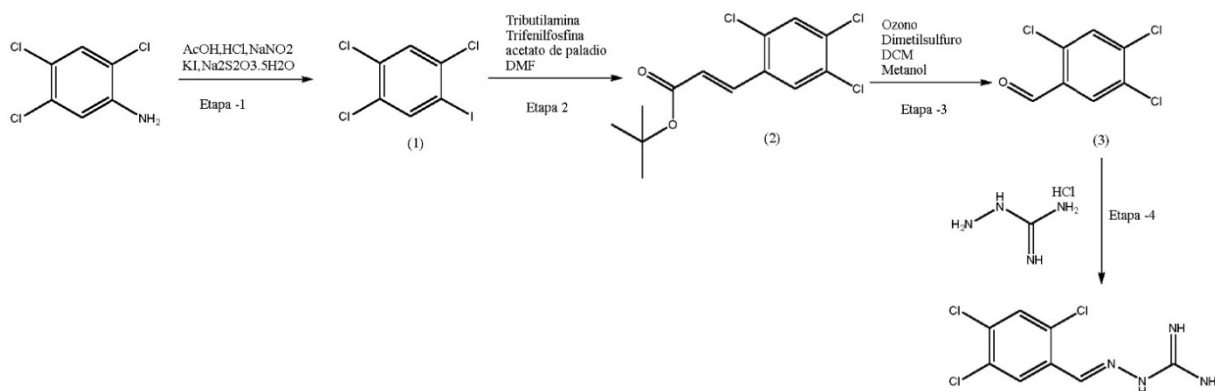
	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	3,4,5-triclorobenzaldehído	0,040 g	207,92	0,00019	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,021 g	110,55	0,00019	1,00
3	Acetato de sodio	0,015 g	82,03	0,00019	1,00
4	Etanol	1ml			

15 **Procedimiento:**

A una solución de 3,4,5-triclorobenzaldehído (0,040 g, 0,00019 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,021 g, 0,00019 mol) y acetato de sodio (0,015 g, 0,00019 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 horas siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,036 g, rendimiento del 70,88 %). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 7,96 (s, 2H); 7,89 (s, 1H); 6,20 (brs, 2H); 5,69 (brs, 2H); MS (ESI⁺): m/z = 265,1 [M+H]⁺

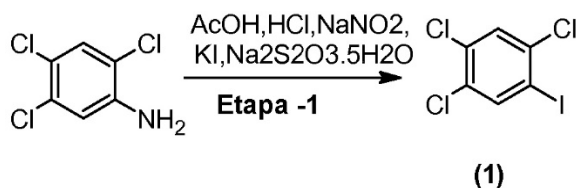
25 **Compuesto 4 - (E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**

Esquema de síntesis:



Detalles experimentales:

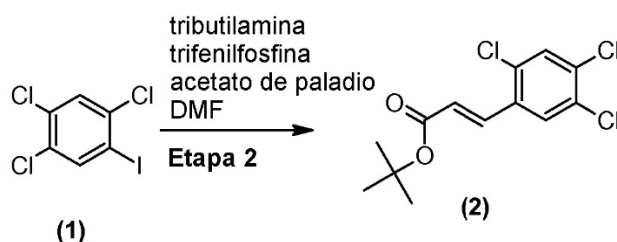
Síntesis de 1,2,4-tricloro-5-yodobenceno [Compuesto Intermedio-1]

**Cálculo:**

	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	2,4,5-tricloroanilina	4,00 g	194,94	0,02051	1,00
2	NaNO ₂	1,41 g	69	0,02051	1,00
3	KI	3,74 g	166	0,02251	1,10
4	Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	1,50 g	248,1	0,00610	0,30
5	Ácido acético	80 ml			
6	HCl conc.	4 ml			
7	Agua DM	4,8 ml			

Procedimiento:

Se calentó una suspensión de 2,4,5-tricloroanilina (4,00 g, 0,02051 mol) en ácido acético (80 ml) a 35 °C hasta que la mezcla se volvió transparente. Después de eso, la mezcla de reacción resultante se dejó enfriar a 25 °C. Se añadió HCl concentrado (4 ml) a la mezcla de reacción a 25 °C y la mezcla de reacción se agitó durante los 30 minutos siguientes a la misma temperatura. Después, una solución de NaNO₂ (1,41 g, 0,02051 mol) en agua DM (4,8 ml) se le añadió a la mezcla de reacción a 25 °C y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 30 minutos a la misma temperatura. El material insoluble se eliminó por filtración y se lavó con ácido acético (3 x 15 ml). Se añadió KI (3,74 g, 0,02251 mol) al filtrado transparente combinado a 25 °C. La mezcla resultante se agitó a 25°C durante 30 minutos, después se añadió Na₂S₂O₃.5H₂O (1,50 g, 0,00610) a la mezcla de reacción que se agitó adicionalmente a 25 °C durante 30 minutos. Los sólidos insolubles finales en el material de la mezcla de reacción se eliminaron por filtración y se lavaron con ácido acético (3 x 10 ml). El filtrado transparente combinado se evaporó a sequedad para obtener el **Compuesto Intermedio-1** (5 g, rendimiento del 79,6 %) que se usó para la siguiente etapa sin ningún procesamiento adicional.

Síntesis de (E)-3-(2,4,5-triclorofenil)acrilato de terc-butilo [Compuesto Intermedio-2]**Cálculo:**

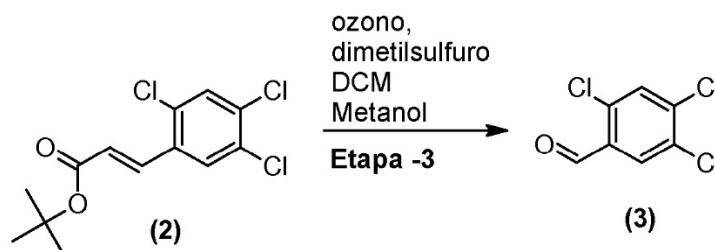
	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	Compuesto Intermedio-1	5,00 g	305,82	0,01634	1,00
2	Acrilato de terc-butilo	8,30 g	128,1	0,06539	4,00
3	Tributilamina	9,00 g	185,3	0,04904	3,00
4	Triphenilfosfina	0,42 g	262,2	0,00162	0,10
5	Acetato de paladio (II)	0,73 g	224,0	0,00325	0,20
6	DMF	30 ml			

Procedimiento:

A una solución de Compuesto Intermedio-1 (5,00 g, 0,01634 mol) en DMF (30 ml) se le añadió secuencialmente

acrilato de terc-butilo (8,30 g, 0,06539 mol), tributilamina (9,00 g, 0,04904 mol), trifenilfosfina (0,42 g, 0,00162 mol) y acetato de paladio (II) (0,73 g, 0,00325 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 3 horas siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando n-hexano/acetato de etilo (9/1) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se evaporó a sequedad. El residuo resultante se suspendió en agua DM (200 ml) y se extrajo en acetato de etilo (3 x 250 ml). La capa orgánica combinada resultante se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para obtener el **Compuesto Intermedio-2** deseado (3,3 g, rendimiento del 65,96 %) que se usó para la siguiente etapa sin ningún procesamiento adicional.

Síntesis de 2,4,5-triclorobenzaldehído [Compuesto Intermedio-3]



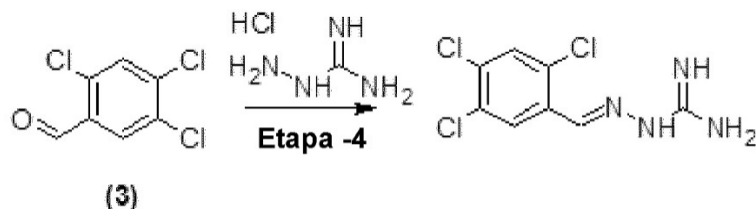
Cálculo:

	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	Compuesto Intermedio-2	0,25g	306	0,00081	1,00
2	Dimetilsulfuro	0,32ml			
3	DCM	30ml			
4	Metanol	20ml			

Procedimiento:

El Compuesto Intermedio-2 (0,25 g, 0,00081 mol) se recogió en una mezcla de metanol: diclorometano (2:3) (50 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a -78 °C con la ayuda de un baño de hielo/acetona. Se purgó gas ozono en la mezcla de reacción a -78 °C hasta que la reacción se volvió azul. A continuación, se purgó gas de oxígeno en la mezcla de reacción durante 10 minutos a -78 °C seguido de la adición de sulfuro de dimetilo (0,32 ml) a -78 °C. La mezcla de reacción resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se dejó agitar durante 10 minutos. La finalización de la reacción se controló en TLC usando n-hexano/acetato de etilo (9/1) como fase móvil. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad. El residuo resultante se suspendió en agua DM (50 ml) y se extrajo en acetato de etilo (3 x 20 ml). La capa orgánica combinada resultante se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío para obtener el **Compuesto Intermedio-3** deseado (0,25 g, cuantitativo) que se usó para la siguiente etapa sin ningún procesamiento adicional.

Síntesis de (E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

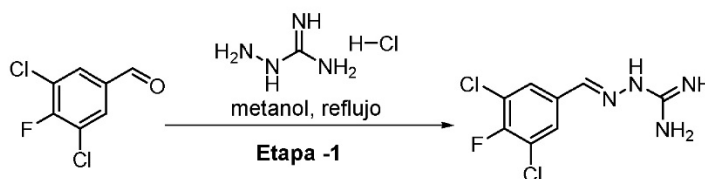


Cálculo:

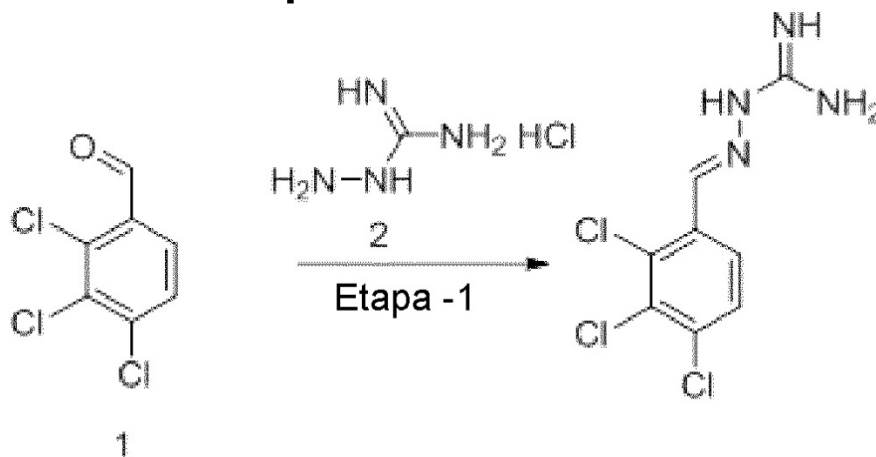
	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	Compuesto Intermedio-3	0,040g	207,92	0,00019	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,021g	110,55	0,00019	1,00
3	Acetato de sodio	0,015 g	82,03	0,00019	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

A una solución de Compuesto Intermedio-3 (0,040 g, 0,00019 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,021 g, 0,00019 mol) y acetato de sodio (0,015 g, 0,00019 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 horas siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,04 g, rendimiento del 78,76 %). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8,43 (s, 1H); 8,12 (s, 1H); 7,77 (s, 1H); 6,33 (brs, 2H); 5,83 (brs, 2H); MS (ESI⁺): m/z =265,17 [M+H]⁺

Compuesto 5 - (E)-2-(3,5-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:**

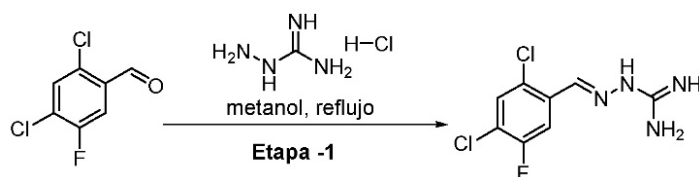
A una solución de 3,5-cloro-4-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,52 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,048 g, 0,43 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 80 % en TLC. La mezcla de reacción se enfrió y se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. El material sólido obtenido se purificó adicionalmente mediante purificación por HPLC preparativa para producir el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,056 g, 54,24 %).

Compuesto 6 - (E)-2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

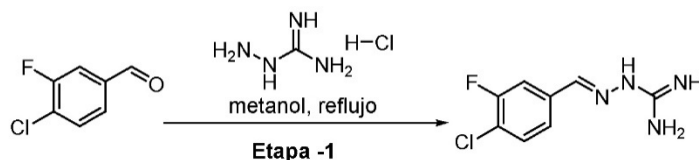
Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,1 g	209,5	0,00047	1
Compuesto Intermedio 2	0,052 g	110,5	0,00047	1
NaOAc	0,039 g	82,03	0,00047	1
Etanol	1 ml	-	-	10 V

Procedimiento

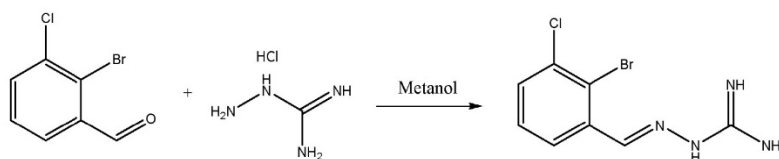
A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,1 g, 0,00047 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,052 g, 0,00047 mol) en etanol (1 ml) se le añadió NaOAc (0,039 g, 0,00047 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (5 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 10 ml) y se secó a presión reducida para obtener un producto puro que se sometió a análisis (0,097 g, rendimiento del 76,98 %).

Compuesto 7 - (E)-2-(2,4-dicloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:**

A una solución de 2,4-dicloro-5-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,52 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,046 g, 0,42 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La mezcla de reacción se enfrió y el metanol se eliminó a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se cristalizó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido. El material sólido obtenido se purificó adicionalmente mediante purificación por HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanquecino (0,1 g, 96,86 %).

Compuesto 8 - (E)-2-(4-cloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:**

A una solución de 4-cloro-3-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,63 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,056 g, 0,51 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 90% en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación adicional del material sólido obtenido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 8 % como eluyente para producir el compuesto del título como un sólido blanquecino (0,059 g, 54,48 %).

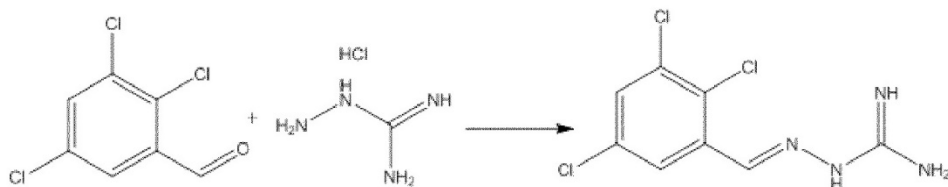
Compuesto 9 - (E)-2-(2-bromo-3-clorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:**

A una solución de 2-bromo-3-clorobenzaldehído (0,63 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,79 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 90% en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con

acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación del material sólido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 8,5 % como eluyente para producir el compuesto del título.

5 **Compuesto 10 - (E)-2-(2,3,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**

Esquema de síntesis:



Detalles experimentales:

Cálculo:

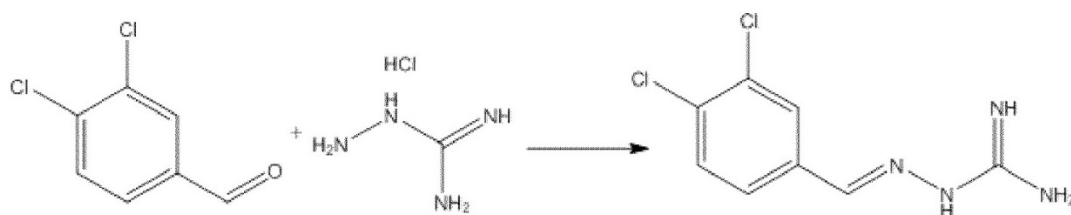
	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	2,3,5-triclorobenzaldehído	0,040 g	207,92	0,00019	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,021g	110,55	0,00019	1,00
3	Acetato de sodio	0,015 g	82,03	0,00019	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

A una solución de 2,3,5-triclorobenzaldehído (0,040 g, 0,00019 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,021 g, 0,00019 mol) y acetato de sodio (0,015 g, 0,00019 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituroó con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,036g, rendimiento del 70,88 %).

25 **Compuesto 11 - (E)-2-(3,4-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**

Esquema de síntesis:



Detalles experimentales:

Cálculo:

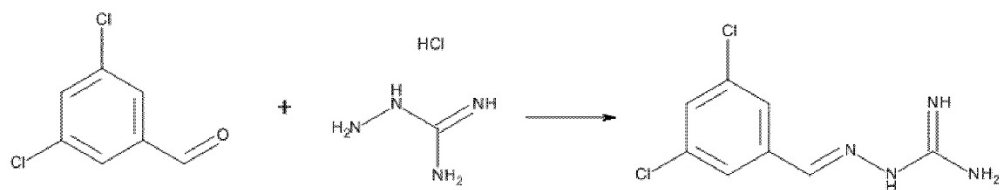
	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	3,4-diclorobenzaldehído	0,030 g	173,96	0,00017	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,019g	110,55	0,00017	1,00
3	Acetato de sodio	0,014g	82,03	0,00017	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

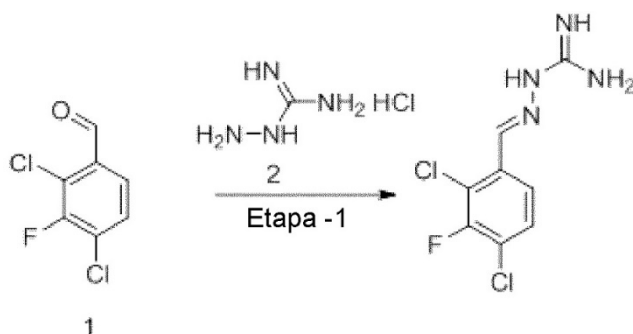
A una solución de 3,4-diclorobenzaldehído (0,030 g, 0,00017 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,019 g, 0,00017 mol) y acetato de sodio (0,014 g, 0,00017 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,035g, rendimiento del 88,2%).

Compuesto 12 - (E)-2-(2,4-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

La siguiente síntesis del compuesto 12 se describe en Nguyen y col., 2014, 5 (10), 1075-1082

Esquema de síntesis:**Protocolo:**

3,5-diclorobenzaldehído (1,0 mmol, 175 mg) y sal de clorhidrato de aminoguanidina (1,0 mmol, 110 mg) en EtOH (2 ml) se agitaron a reflujo durante 12 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el compuesto final se recuperó como un precipitado después de la filtración. El compuesto del título se recuperó en forma de un polvo blanco (210 mg, 79 %).

Compuesto 13 - (E)-2-(2,4-dicloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,1 g	193,03	0,00051	1
Compuesto Intermedio 2	0,057 g	110,5	0,00051	1
NaOAc	0,042 g	82,03	0,00051	1
Etanol	1 ml	-	-	10 V

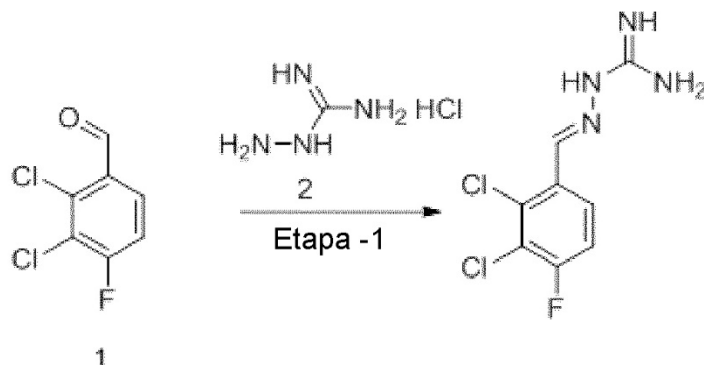
Procedimiento:

A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,1 g, 0,00051 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,057 g, 0,00051 mol) en etanol (1 ml) se le añadió NaOAc (0,042 g, 0,00051 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (5 ml) a

la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 10 ml) y se secó a presión reducida para obtener un producto puro que se sometió a análisis (0,05 g, rendimiento del 38,75 %).

5 Compuesto 14 - (E)-2-(2,3-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:



Detalles experimentales:

Cálculo:

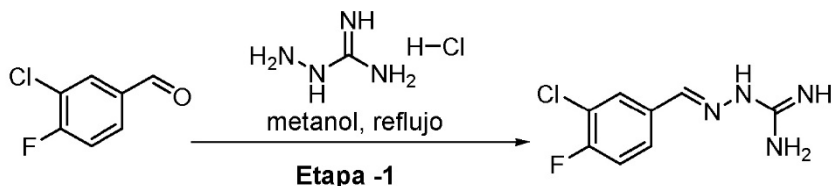
Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,05 g	193	0,00025	1
Compuesto Intermedio 2	0,028 g	110,5	0,00025	1
NaOAc	0,021 g	82,03	0,00025	1
Etanol	0,5 ml	-	-	10 V

Procedimiento:

A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,05 g, 0,00025 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,028 g, 0,00025 mol) en etanol (0,5 ml) se le añadió NaOAc (0,021 g, 0,00025 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (2,5 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 5 ml) y se secó a presión reducida para obtener un producto puro que se sometió a análisis (0,043 g, rendimiento del 67,18 %).

Compuesto 15 - (E)-2-(3-cloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:



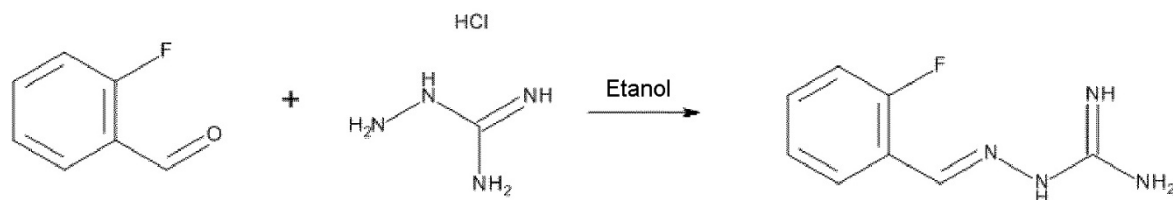
Detalles experimentales:

A una solución de 3-cloro-4-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,63 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,087 g, 0,79 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 80 % en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación adicional del material sólido obtenido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 8 % como eluyente para producir el compuesto del título como un sólido blanquecino (0,053 g, 39,15%).

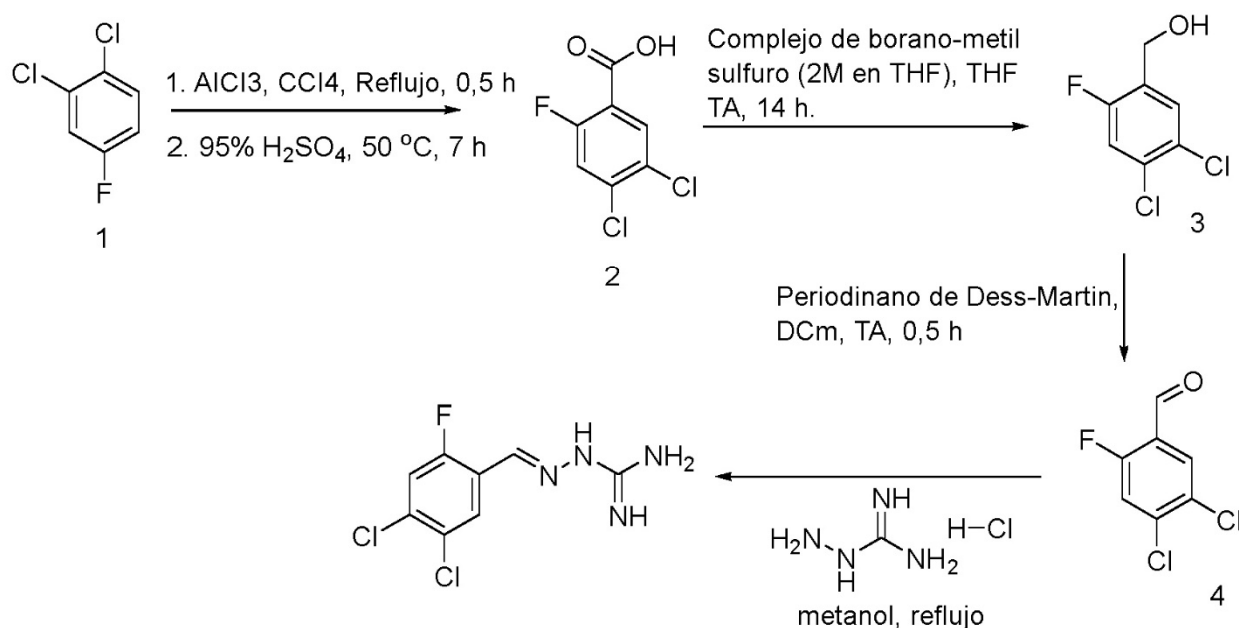
Compuesto 16 - (E)-2-(2,3-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:**Procedimiento:**

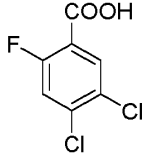
5 A una solución de 2,3-diclorobenzaldehído (1e.) en etanol (300 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (1eq.) y acetato de sodio (1eq.) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a 80 °C durante las ~6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (700ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (100ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 25 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (rendimiento del 85 %), considerando la sal monoacetato) LC-MS: m/z= 231,23 (M+H). ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 11,85 (brs, 1H); 8,35 (s, 1H); 8,19-8,21 (dd, 1H); 7,56-7,59 (dd, 1H); 7,32-7,36 (t, 1H); 7,04 (brs, 4H); 1,84 (s, 3H); MS (ESI+): m/z = 231,23 [M+H]⁺

Compuesto 17 - (E)-2-(2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Procedimiento:**

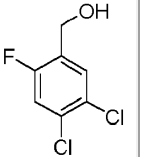
20 A una solución de 2-clorobenzaldehído (1 eq.) en etanol (300ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (1eq.) y acetato de sodio (1eq.) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a 80°C durante las ~6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (700 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (100 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 25 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título.

Compuesto 18 - (E)-2-(4,5-dicloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:**

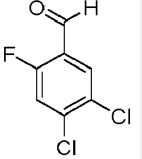
Detalles experimentales:**Etapa-1:**

 Int-2, T-3	Se suspendió cloruro de aluminio (3,22 g, 24,24 mmol) en tetracloruro de carbono (20 ml) a 0 °C y la suspensión se calentó gradualmente. Se añadió gota a gota 1,2-dicloro-4-fluorobenceno (2,0 g, 12,12 mmol) durante 2 h a reflujo y la mezcla se calentó a reflujo adicionalmente durante 0,5 h. Después de dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, la mezcla se vertió cuidadosamente en agua helada. La capa orgánica se lavó con agua, solución de NaHCO₃ al 5 % y a continuación con agua. La fase orgánica se secó en MgSO₄ y se concentró a presión reducida para dar el compuesto intermedio bruto. El compuesto intermedio bruto se suspendió en ácido sulfúrico al 95 % y la suspensión se agitó a 50 °C durante 7 h. La solución se vertió en agua helada y los cristales brutos resultantes se recogieron por filtración. Los cristales se disolvieron en una solución 1 N de NaOH y la solución se lavó con acetato de etilo. La capa acuosa se neutralizó con una solución de HCl 6N y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. Los cristales brutos así obtenidos se recogieron por filtración (0,35 g).
---	---

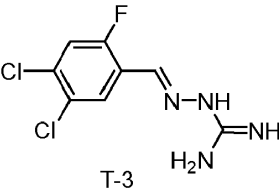
Etapa-2:

 Int-3, T-3	Se trató una solución de Int-2 de T-3 (0,35 g, 1,67 mmol) en THF (10 ml) con complejo de metilsulfuro de borano (2,51 mmol) a 0-5 °C. Se dejó que la mezcla llegara a temperatura ambiente, se agitó durante 14 h a temperatura ambiente y se inactivó con una solución saturada de NaHCO₃ y metanol (2 ml). Se extrajo la mezcla acuosa con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con HCl al 10 % y soluciones saturadas de NaHCO₃, se secó sobre MgSO₄ y se concentró para dar 0,275 g del producto en forma de un sólido blanco.
---	--

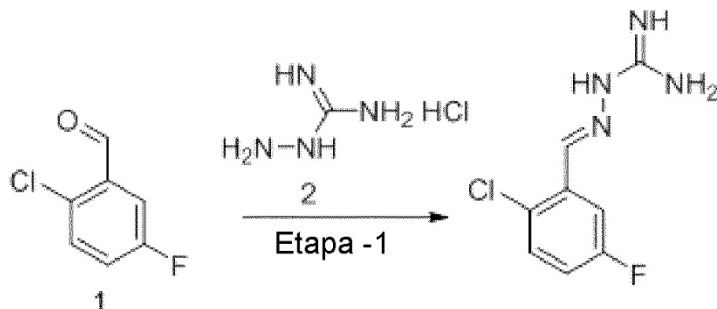
Etapa-3:

 Int-4, T-3	A una solución enfriada con hielo de Int-3 de T-3 (0,275 g, 1,41 mmol) en DCM se le añadió periodinano de Dess-Martin (0,896 g, 2,11 mmol) y a continuación se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se inactivó con una solución saturada de NaHCO₃ y la agitación se satisfizo durante 30 min. La capa orgánica se separó, se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄ y se concentró para proporcionar Int-4 de T-3 (0,17 g).
---	---

Etapa-4:

 T-3	A una solución del Compuesto-3 (0,15 g, 0,77 mmol) en metanol (3 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,069 g, 0,62 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 100% en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. El material sólido bruto se purificó adicionalmente mediante purificación por HPLC preparativa para producir el compuesto del título en forma de un sólido blanco (0,085 g, 82,33 %).
--	---

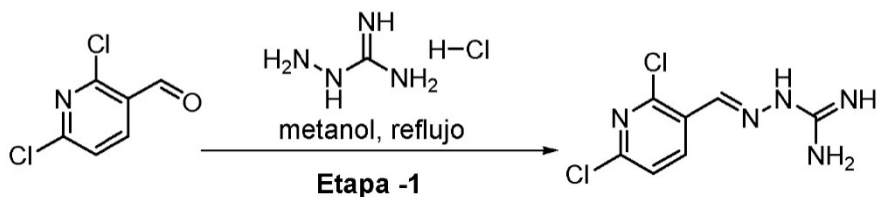
Compuesto 20 - (E)-2-(2-cloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:**Detalles experimentales:****Cálculo:**

Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,1 g	158,6	0,00063	1
Compuesto Intermedio 2	0,069 g	110,5	0,00063	1
NaOAc	0,051 g	82,03	0,00063	1
Etanol	1 ml	-	-	10 V

Procedimiento:

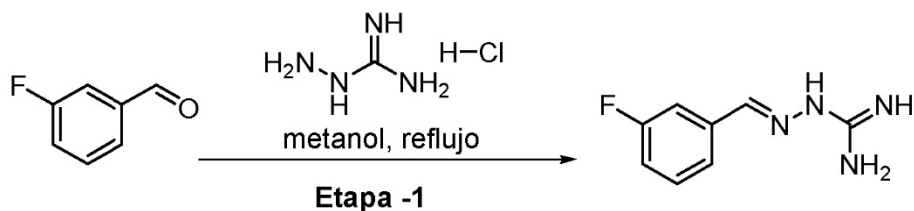
A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,1 g, 0,00063 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,069 g, 0,00063 mol) en etanol (1 ml) se le añadió NaOAc (0,051 g, 0,00063 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (5 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 10 ml) y se secó a presión reducida para obtener un producto puro (0,086 g, rendimiento del 63,07%).

Compuesto 22-(E)-2-((2,6-dicloropiridina-3-il)metileno)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:**

A una solución de 2,6-dicloronicotinaldehído (0,1 g, 0,57 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,079 g, 0,71 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C.

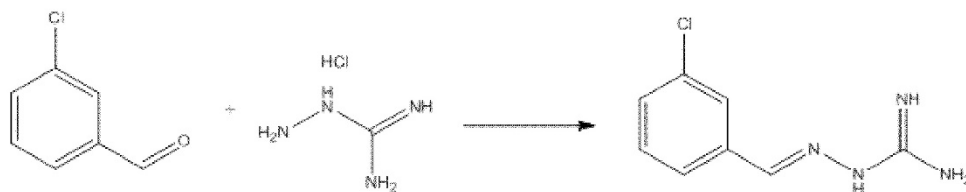
La reacción mostró una conversión del 80 % en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación adicional del material sólido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 5 % como eluyente para producir el compuesto deseado como un sólido amarillo (0,040 g, 30,99 %).

Compuesto 23 - (E)-2-(3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:**Detalles experimentales:**

5 A una solución de 3-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,81 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,047 g, 0,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 90% en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación

10 adicional del material sólido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 6,5 % como eluyente para producir el compuesto deseado como un sólido blanquecino (0,069 g, 66,83 %).

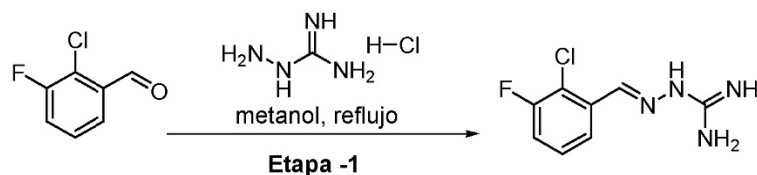
Compuesto 24 - (E)-2-(3-clorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	3-clorobenzaldehído	0,050 g	140,57	0,00035	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,039g	110,55	0,00035	1,00
3	Acetato de sodio	0,028g	82,03	0,00035	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

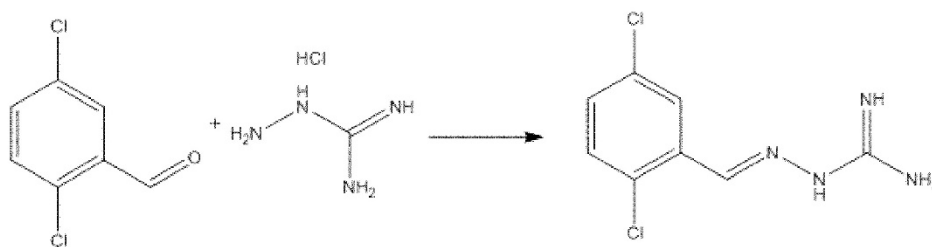
25 A una solución de 3-clorobenzaldehído (0,050g , 0,00035 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,039 g, 0,00035 mol) y acetato de sodio (0,028 g, 0,00035 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituroó con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío

30 para proporcionar el compuesto del título (0,035g, rendimiento del 50,19%).

Compuesto 25 - (E)-2-(3-cloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:**

Detalles experimentales:

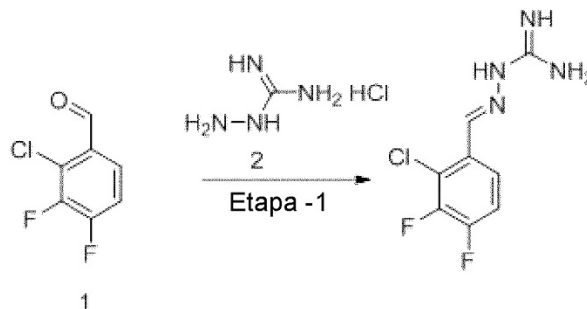
A una solución de 2-cloro-3-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,63 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,087 g, 0,79 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 90% en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación del material sólido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 8,5 % como eluyente para producir el compuesto del título como un sólido blanquecino (0,088 g, 68,19 %).

Compuesto 26 - (E)-2-(2,5-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	2,5-diclorobenzaldehído	0,045g	173,96	0,00025	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,028g	110,55	0,00025	1,00
3	Acetato de sodio	0,020g	82,03	0,00025	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

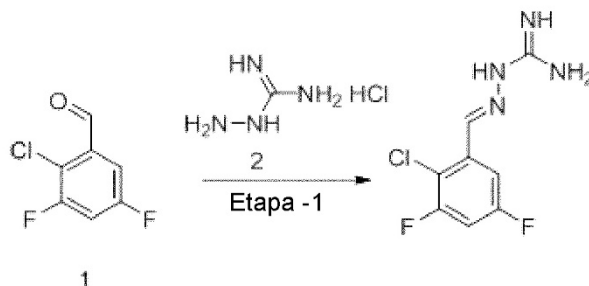
A una solución de 2,5-diclorobenzaldehído (0,045g, 0,00025mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,028g, 0,00025mol) y acetato de sodio (0,020g, 0,00025mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,039 g, rendimiento del 65,55 %).

Compuesto 27 - (E)-2-(2-cloro-3,4-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,04 g	176,55	0,00022	1
Compuesto Intermedio 2	0,025 g	110,5	0,00022	1
NaOAc	0,018 g	82,03	0,00022	1
Etolanol	0,4 ml	-	-	10 V

Procedimiento:

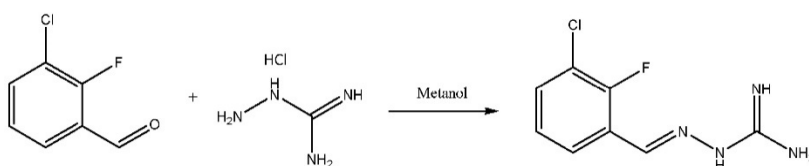
A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,04 g, 0,00022 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,025 g, 0,00022 mol) en etanol (0,4 ml) se le añadió NaOAc (0,018 g, 0,00022 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (2,5 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 5 ml) y se secó a presión reducida para obtener un producto puro que se sometió a análisis (0,063g, rendimiento del 95,43%).

Compuesto 29 - (E)-2-(2-cloro-3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,06 g	176,55	0,00033	1
Compuesto Intermedio 2	0,037 g	110,5	0,00033	1
NaOAc	0,027 g	82,03	0,00033	1
Etolanol	0,6 ml	-	-	10 V

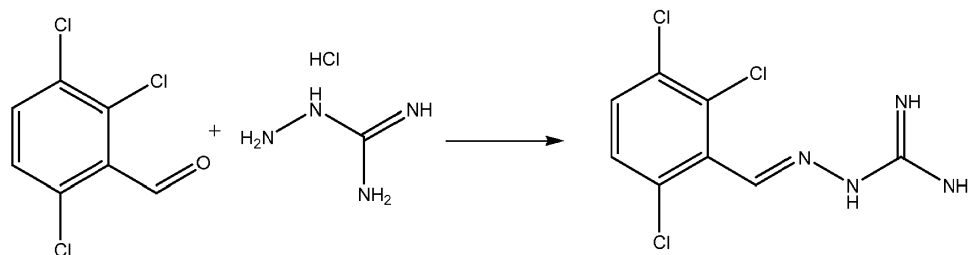
Procedimiento:

A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,06 g, 0,00033 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,037 g, 0,00033 mol) en etanol (0,6 ml) se le añadió NaOAc (0,027 g, 0,00033 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (2,7 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 2,7 ml) y se secó a presión reducida para obtener un producto puro que se sometió a análisis (0,04 g, rendimiento del 50,63 %).

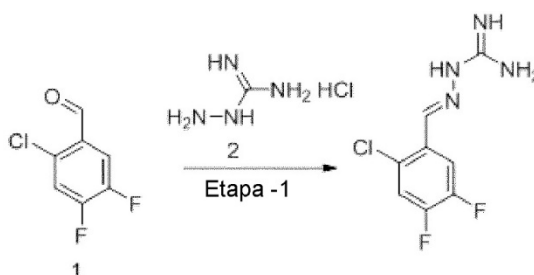
Compuesto 30 - (E)-2-(3-cloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:**

Detalles experimentales:

A una solución de 3-cloro-2-fluorobenzaldehído (0,1 g, 0,63 mmol) en metanol (2 ml) se le añadió clorhidrato de aminoguanidina (0,087 g, 0,79 mmol). La reacción se agitó durante 2 h a 65-70 °C. La reacción mostró una conversión del 90% en TLC. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar un producto bruto que se agitó con acetato de etilo (30 ml) para dar un material sólido que se filtró y se secó al vacío. La purificación del material sólido se llevó a cabo con cromatografía en columna usando gel de sílice (100-200) y MeOH/DCM al 8,5 % como eluyente para producir el compuesto del título.

Compuesto 31 - (E)-2-(2,3,6-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:**

A una solución de 2,3,6-triclorobenzaldehído (0,040 g, 0,00019 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,021 g, 0,00019 mol) y acetato de sodio (0,015 g, 0,00019 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para obtener el compuesto del título.

Compuesto 32 - (E)-2-(2-cloro-4,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida**Esquema de síntesis:****Detalles experimentales:****Cálculo:**

Productos químicos	Cantidad	Peso molecular	Mol	Relación molar
Compuesto Intermedio 1	0,1 g	176,55	0,00056	1
Compuesto Intermedio 2	0,062 g	110,5	0,00056	1
NaOAc	0,046 g	82,03	0,00056	1
Etanol	1 ml	-	-	10 V

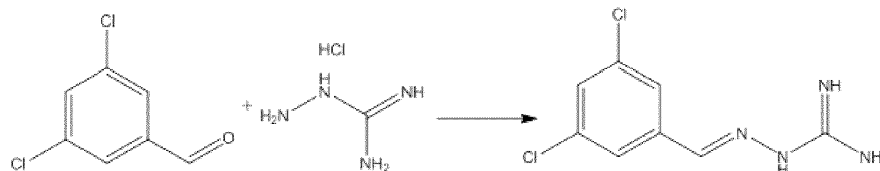
Procedimiento:

A la solución del Compuesto Intermedio 1 (0,1 g, 0,00056 mol) y del Compuesto Intermedio 2 (0,062 g, 0,00056 mol) en etanol (1 ml) se le añadió NaOAc (0,046 g, 0,00056 mol) y se calentó a 80 °C durante 4 h. El progreso de la reacción se controló por TLC usando MeOH al 20 % en DCM como fase móvil. Se añadió la solución fría de NaHCO₃ (5 ml) a la mezcla de reacción y se agitó durante 10 min. El precipitado se filtró, se lavó minuciosamente con agua (2 x 10 ml)

y se secó a presión reducida para obtener un producto puro que se sometió a análisis (0,117g, rendimiento del 89,31%).

Compuesto 34 - (E)-2-(3,5-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Esquema de síntesis:



Detalles experimentales:

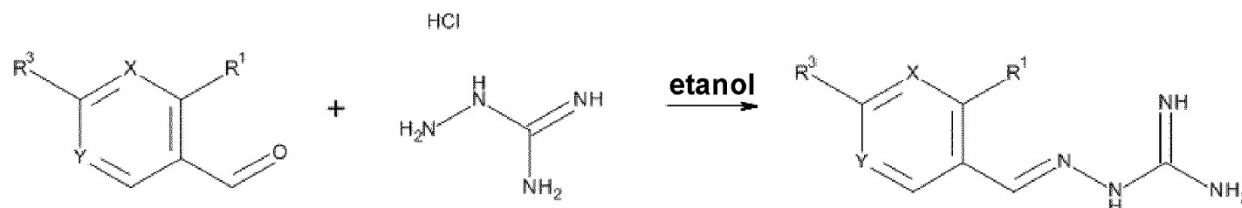
Cálculo:

	Productos químicos	Cantidad	P.M.	Mol	Relación molar
1	3,5-diclorobenzaldehído	0,030g	173,96	0,00017	1,00
2	Clorhidrato de aminoguanidina	0,019 g	110,55	0,00017	1,00
3	Acetato de sodio	0,013g	82,03	0,00017	1,00
4	Etanol	1ml			

Procedimiento:

A una solución de 3,5-diclorobenzaldehído (0,030 g, 0,00017 mol) en etanol (1 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (0,019 g, 0,00017 mol) y acetato de sodio (0,013g, 0,00017 mol) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 80 °C durante las 6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (10 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (5 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 2 ml) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0,038g, rendimiento del 95,8%).

Procedimiento general A:



A una solución de benzaldehído (1eq.) en etanol (300 ml) se le añadió secuencialmente clorhidrato de aminoguanidina (1eq.) y acetato de sodio (1eq.) a 25 °C. La mezcla de reacción resultante se agitó a 80 °C durante las ~6 h siguientes. La finalización de la reacción se controló en TLC usando diclorometano/metanol (8/2) como fase móvil. Tras completarse la reacción, la mezcla de reacción se dejó enfriar a 25 °C y se vertió en una solución saturada de NaHCO₃ (700 ml). Los precipitados resultantes se filtraron al vacío y se lavaron con agua (100 ml). El material sólido resultante se trituró con éter dietílico (2 x 25 ml) y se secó al vacío para proporcionar el derivado de aminoguanidina sustituido deseado.

Los siguientes compuestos se prepararon de acuerdo con el procedimiento general A:

Ejemplo 1 (Compuesto 16(E)): (E)-2-(2,3-diclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2,3-diclorobenzaldehído con un rendimiento del 85 % (considerando la sal monoacetato) LC-MS: m/z= 231,23 (M+H). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11,85 (brs, 1H); 8,35 (s, 1H); 8,19-8,21 (dd, 1H); 7,56-7,59 (dd, 1H); 7,32-7,36 (t, 1H); 7,04 (brs, 4H); 1,84 (s, 3H); MS (ESI⁺): m/z = 231,23 [M+H]⁺

Ejemplo 2: (E)-2-(2-cloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida

Preparado siguiendo el procedimiento general A a partir de 2-cloro-4-fluorobenzaldehído con un rendimiento del 67 %. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 5,80 (brs, 2H); 5,84 (brs, 2H); 7,19-7,34 (m, 4H); 8,16 (s, 1H); MS (ESI⁺): m/z = 215,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Los protocolos y ensayos del Ejemplo A se llevaron a cabo en relación con la inhibición de PPP1R15B. Sin embargo, se apreciará que los procedimientos descritos en esta invención son igualmente aplicables a identificación/análisis de inhibidores de PPP1R15A y PPP1R15B.

Ejemplo A**Expresión, purificación y análisis de proteínas mediante resonancia de plasmón superficial***Expresión y purificación de proteínas*

PPP1R15A³²⁵⁻⁶³⁶ y PPP1R15B^{34*-698} se expresaron y purificaron como sigue: los ADNc que codifican los aminoácidos 325-636 de PPP1R15A y 340-698 de PPP1R15B se marcaron con His y se clonaron en pMAL-c5x. Las PPP1R15A/B recombinantes se expresaron en células BL21-Gold y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en una columna HisTrap HP (GE Healthcare), seguida de una columna MBPTrap HP (GE Healthcare). Las proteínas se analizaron en geles BOLT SDS-PAGE 4-12% Bis-Tris (Life Technologies) teñidos con SimplyBlue SafeStain (Life Technologies). Se clonó el ADNc que codifica PP1y humano en el vector de transferencia de baculovirus pDW464 para añadir un péptido aceptor de biotina (BAP). El vector también codifica la holoenzima sintetasa de biotina de *E. coli* (BirA), de modo que las proteínas marcadas con BAP pueden ser biotiniladas in vivo en células de insectos *Spodoptere frugiperda* (Sf9) (Duffy y col., Anal. Biochem., 262, 122-128, 1998). Se utilizó el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Life Technologies) para generar el ADN bacmídico recombinante y se utilizaron células de insecto Sf9 para amplificar los stocks virales. Los cultivos se recogieron centrifugando a 1200 g durante 15 minutos, las pastillas de células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, Triton al 0,2 %, glicerol al 5 %, 1 comprimido de PIC (Roche) por 50 ml y 0,2 mM PMSF) y se procedió a una sonicación suave. La proteína se purificó primero en una columna HiTrap Q HP de 5 ml (GE Healthcare) seguido de un HiLoad 16/600 Columna Superdex 200 (GE Healthcare). Las fracciones positivas confirmadas por SDS-PAGE y western blot se combinaron, se concentraron hasta ~1 μM y se almacenaron a -80 °C.

Captura de bio-PP1 en el chip sensor SA

Se usó un sistema Biacore T200 (GE Healthcare) para todos los experimentos y se capturó PP1 biotinilado usando un chip sensor SA (GE Healthcare, catálogo no BR-1005-31). La superficie recubierta de estreptavidina se activó mediante una inyección de 1 min con una solución de NaOH 50 mM y NaCl 1 M. Se diluyó biotina-PP1 en el tampón de funcionamiento (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EGTA 0,1 mM, MnCl₂ 1 mM, Tween 20 al 0,05%) y se inyectó a una concentración de aproximadamente 300 nM directamente a la superficie recubierta de estreptavidina durante 100 segundos o para alcanzar el nivel de inmovilización de biotina-PP1 correspondiente a ~7000 RU. Se realizó una inmovilización en blanco para una de las superficies del chip sensor SA para utilizarla como referencia.

Determinación de las constantes de unión en estado estacionario de pequeñas moléculas a complejos de holofosfatasa eIF2 α utilizando la superficie biotina-PP1

Con pequeñas desviaciones, se usaron el mismo procedimiento y condiciones en todos los experimentos de unión. Las moléculas pequeñas se almacenaron como soluciones madre de 50 mM en DMSO al 100 %. Antes de determinar las constantes de unión, se prepararon diluciones en serie de 12 u 8 concentraciones de los compuestos en el tampón de funcionamiento en una placa de 96 pocillos. Antes de cada serie de dilución de compuesto, la subunidad reguladora, R15A o R15B, se diluyó a 15 μM en el tampón de funcionamiento y se capturó en la superficie de biotina-PP1, para formar el complejo de holofosfatasa en la superficie del chip sensor. A continuación, sin regenerar la superficie, se inyectó la serie de diluciones del compuesto en la superficie del chip. Se analizaron los sensorgramas mediante el software de evaluación Biacore T200 y se determinaron las constantes de unión en base a un modelo de estado estacionario. Se llevan a cabo experimentos cinéticos utilizando diferentes concentraciones del compuesto y se determinan sus respectivos niveles de unión en equilibrio. Estos niveles de respuesta de equilibrio (Req) se representan frente a la concentración y se ajustan mediante un ajuste global, que es capaz de determinar las constantes de afinidad de estado estacionario, es decir, la concentración al 50 % de saturación es KD (Frostell-Karlsson y col., J. Med. Chem., 43, 1986-1992, 2000).

Cultivo de células de mamíferos

Las células HeLa se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con penicilina, estreptomycin, que contiene suero bovino fetal (FBS) al 5 % y al 10 %, respectivamente. Las células MEF se cultivaron en DMEM suplementado con penicilina, estreptomycin, glutamina, β -mercaptoetanol 55 μM , 1X aminoácidos no esenciales (Sigma-Adrich) y FBS al 10 %. Donde se indica, las células se trataron con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ tunicamicina, DTT 1 mM (Sigma-Adrich) y o los compuestos indicados a las concentraciones indicadas.

Análisis de proteínas por inmunotransferencias

Para las inmunotransferencias, se sembraron células HeLa (80 000 células/ml) en placas de 12 pocillos 24 horas antes de cada experimento. Inmediatamente después de los tratamientos indicados, las células se lisaron en 75 µl de tampón Laemmli, se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos y se sonicaron. Las proteínas se separaron y analizaron tal como se describe (Tsytler y col., Science, 332, 91-94, 2011) con los siguientes anticuerpos: fosfo-elf2α [pS52] y PPP1R15A/GADD34 (10449-1-AP; Grupo ProteinTech, 1/1000 dilución) y ATF4 (Sc-200 Santa Cruz).

Evaluación de la viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 15 000 (HeLa) o 12 000 células/ml (MEFs) 24 horas antes del tratamiento. El estrés del RE se provocó mediante la adición de medios nuevos que contenían 2,5 µg/ml tunicamicina (Sigma-Aldrich). Los compuestos del Ejemplo 1 se disolvieron en DMSO y se añadieron como se indica. Se usó DMSO como tratamiento de control. La viabilidad celular se evaluó midiendo la reducción de WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] en formazán mediante el Cell viability Counting Kit-8 (Dojindo) según la recomendación del proveedor, 48 horas después del tratamiento con tunicamicina.

La toxicidad de los compuestos se evalúa mediante el kit de conteo de viabilidad celular-8 (Dojindo) o en un Incucyte (Essenbioscience) usando contraste de fase e IncuCyte™ y Cytotox Green Reagent.

Estudios en animales

Todo el cuidado y los procedimientos de los animales se realizaron de conformidad con la regulación sobre el uso de animales en la investigación (Ley de Procedimientos Científicos para Animales del Reino Unido de 1986) con aprobación ética local.

Para estudiar el efecto de un compuesto del Ejemplo 1 sobre el peso, se administraron los compuestos del Ejemplo 1 a ratones C3H/B6 por vía oral una vez al día y se registró el peso de los ratones diariamente durante 2 semanas.

Para evaluar la eficacia de un compuesto del Ejemplo 1 para mejorar el fenotipo de una enfermedad, se administró por vía oral a ratones transgénicos de 28 días de edad o al control de la camada un compuesto del Ejemplo 1 (2 mg/kg) o vehículo durante 4 semanas. La progresión de la enfermedad se evaluó pesando a los ratones durante el tratamiento y evaluando su rendimiento motor después de 4 semanas de tratamiento.

Para evaluar si un compuesto del Ejemplo 1 tuvo los efectos secundarios de guanabenz, se administraron 10 mg/kg de compuesto o guanabenz a los ratones (n>3) por vía oral. Su actividad se controló 30 minutos después de la dosificación. Los ratones tratados con guanabenz no se movieron 30 minutos después de la dosificación, debido a la actividad hipotensora de guanabenz, a diferencia de los ratones tratados con el compuesto del Ejemplo 1 que fueron tan activos como los ratones no tratados.

Los ratones HD-N171-82Q de ocho semanas de edad y sus compañeros de camada de tipo salvaje se habituaron primero durante 1 min en un rotor estático y durante 1 min a velocidad constante (4 rpm). Se repitió la habituación. La sesión de prueba consistió en cuatro ensayos con intervalos de 15 minutos entre ellos. Para cada ensayo, se colocaron 5 ratones en un rotor de aceleración (4 a 40 rpm) y se registró la latencia hasta la caída con un límite máximo para cada animal establecido en 300 s.

Para el tratamiento de un trastorno metabólico, se trataron animales Db/db (n=5 por condición) una vez al día con 1 mg/kg del compuesto del Ejemplo 1 durante tres semanas. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un medidor de glucosa en sangre (DSI) entre las 9 y las 10 de la mañana. Los datos son promedios ± error estándar del promedio.

Cuantitativo RT-PCR

El ARN del cerebro se extrajo en trizol (Life Technologies). La concentración de ARN se midió mediante un espectrofotómetro NANODROP1000 (Thermo Fisher Scientific), y se transcribió inversamente 1 µg a ADNc usando una transcriptasa inversa SuperScript (Life Technologies). La PCR cuantitativa con cebadores GAPDH (f): ACCACAGTCCATGCCATCAC, GAPDH (r): TCCACCACCCTGTTGCTGTA, PPP1R15A (f): CCTCCTGAAACTTGGGGACT; y PPP1R15A (r): GCTGTGATGTGGGATAAGCG se realizó usando SYBR® Select Master Mix (Ref 4472908, biosistemas aplicados) en un Corbett Rotor-Gene versión 6000. La expresión de cada gen se normalizó al gen de referencia GAPDH y se expresó como cambio de veces calculado mediante la ecuación de Paffl.

Culturas DRG

Los ganglios de la raíz dorsal (DRG) disecados de embriones tipo salvaje o Pmp22^{Tr-J} (mutante PMP22) (Henry y col., Neuropathol. Exp. Neurol., 42, 688-706, 1983) de 13,5 de desarrollo (E13.5) se cultivaron en cubreobjetos recubiertos de colágeno en medio neurobasal suplementado con 4 g/l glucosa, L-glutamina 2 mM, Suplemento B27 al 2 % y 50 ng/ml factor de crecimiento neuronal (NGF) durante 7 días. Para diferenciar las células de Schwann e inducir la mielinización, los DRG cultivados se mantuvieron en medio C (medio MEM suplementado con 4 g/l glucosa, L-glutamina 2 mM, FCS al 10 %, 50 ng/ml NGF). El medio C se sustituyó cada dos días con ácido ascórbico recién añadido de 50 µg/ml ± 5 nM del compuesto del Ejemplo 1 y se cultivó durante 14 días para la mielinización por células de Schwann. Los DRG cultivados se fijaron a continuación en paraformaldehído al 4 % e inmunoteñido con MBP (proteína básica de mielina de rata, dilución 1/250, ab73498).

La referencia para los ratones es Pubmed ID: 631386.

Ensayo bioquímico

Ensayo 1: Un inhibidor selectivo de PPP1R15B se une selectivamente a PPP1R15B-PP1 (Figura 1)

Se utilizó la resonancia de plasmones de superficie (SPR) para medir la afinidad de unión de los compuestos al complejo de fosfatasa PPP1R15A/B-PP1. El péptido aceptor de biotina (BAP) se fusionó con el extremo N-terminal de PP1γ, lo que permite la biotilación de la proteína marcada con BAP en células de insecto Sf9. Tras la purificación, la proteína BAP-PP1γ se capturó en un chip sensor de estreptavidina (SA-chip, GE healthcare) hasta un nivel de respuesta de -5,000 RU. El uso de biotilación controlada permite una inmovilización orientada y uniforme en la superficie del chip sensor. A continuación, se utilizó el PP1γ para capturar PPP1R15A/B y formar un complejo de holofosfatasa en la superficie del chip de estreptavidina. Este complejo puede usarse a continuación para probar la unión de compuestos. Se utilizó una concentración de proteína PPP1R15A/B de 10 µM para formar el complejo de holofosfatasa durante una inyección de 80 s. Una vez capturada la PPP1R15A/B, se inyectó una serie de concentraciones de un compuesto sobre la superficie del chip, midiendo la unión del compuesto a la holofosfatasa. Una vez completada la serie de concentraciones (8 o 12 concentraciones), la superficie se regenera con NaCl 3 M y SE PUEDE capturar R15A/B de nuevo para formar un nuevo complejo de holofosfatasa para medir la unión de otra serie de concentraciones de compuestos. El análisis del nivel de unión en equilibrio en función de la concentración da afinidades de interacción o afinidad de unión en estado estacionario (K_D).

La Figura 1 muestra los valores K_D para el compuesto del Ejemplo 1. Un K_D de 0,035 µM para PPP1R15B-PP1 y 1 µM para PPP1R15A-PP1 demuestra que el compuesto del Ejemplo 1 se une selectivamente al complejo PPP1R15B-PP1, pero esa unión al complejo PPP1R15A-PP1 es significativamente menor.

Ensayo 2: Un inhibidor selectivo de PPP1R15B induce la expresión de eIF2α en las células, en ausencia de estrés (Figura 2A y B)

La selectividad de un compuesto del Ejemplo 1 se reveló usando un ensayo de unión *in vitro* con proteínas recombinantes. Sin embargo, aunque se puede usar un ensayo de unión para cribar compuestos selectivos que se unen a PPP1R15B, las propiedades de un compuesto no se predicen necesariamente mediante un ensayo de unión. Por tanto, se necesitan otros ensayos para evaluar si el compuesto inhibe la función PPP1R15B o no.

Se trataron células humanas con un inhibidor de PPP1R15B y se controló la fosforilación de eIF2α a lo largo del tiempo. Los inventores encontraron que, en ausencia de estrés (en condiciones en las que las células no expresan PPP1R15A), el tratamiento de las células con un compuesto del Ejemplo 1 inducía la fosforilación de eIF2α. Esto se manifestó entre 1 y 7,5 horas después de la adición del compuesto del Ejemplo 1. Sin embargo, 10 horas después de la adición del compuesto del Ejemplo 1, la fosforilación de eIF2α volvió a niveles basales. Esto sugirió que había una eIF2α fosfatasa activa en este momento. De hecho, los inventores notaron que PPP1R15A se indujo en los puntos de tiempo tardíos después de la adición del compuesto del Ejemplo 1 (ver Ensayo 3). La inducción transitoria de la fosforilación de eIF2α demuestra que el compuesto es un inhibidor selectivo de PPP1R15B en las células. Además, esto establece que el compuesto del Ejemplo 1 ahorra PPP1R15A. Este ensayo puede servir para identificar otros inhibidores selectivos de PPP1R15B.

Ensayo 3: Un inhibidor selectivo de PPP1R15B induce la expresión de PPP1R15A en las células (Figura 2A y B)

Las células y los organismos suelen tener mecanismos para compensar las deficiencias. Por tanto, los inventores consideraron si las células podrían compensar la inhibición de PPP1R15B induciendo PPP1R15A. Se ha informado previamente que los niveles de PPP1R15A están aumentados en el hígado de ratones knock-out para PPP1R15B (Harding y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 1832-1837, 2009). Se desconoce si esta respuesta compensadora es específica del hígado o si puede producirse en células u otros tejidos. Además, antes de este estudio, se desconocía si se podía observar la inducción de PPP1R15A tras la inhibición farmacológica de PPP1R15B, ya que no eran inhibidores selectivos de PPP1R15B anteriormente a este estudio.

La Figura 2B demuestra que se encontró que las células tratadas con un compuesto del Ejemplo 1 inducían

PPP1R15A. Esta propiedad, la inducción de PPP1R15A, puede usarse como un procedimiento para seleccionar inhibidores de PPP1R15B, ya que los compuestos que inducen la expresión de PPP1R15A en células poseerán propiedades de inhibición de PPP1R15B. Por ejemplo, un ensayo que usa un gen PPP1R15A o un promotor fusionado a un gen indicador puede diseñarse y desarrollarse en un cribado HTS para identificar compuestos que inducen PPP1R15A.

Ensayo 4: Un inhibidor selectivo de PPP1R15B protege a las células del estrés (Figura 3)

La Figura 3 demuestra que un inhibidor selectivo de PPP1R15B protege a las células del estrés. Las células se estresaron con tunicamicina (2,5 ug/ml) en presencia de 0,2-5 μ M de un compuesto del Ejemplo 1. Se midió la viabilidad celular 3 días después del tratamiento.

El inhibidor del Ejemplo 1 protege a las células del estrés citotóxico causado por la tunicamicina. La citoprotección contra el estrés del RE se puede medir mediante un ensayo adecuado. En este caso, se midió la citoprotección en células HeLa en las que se provocó estrés en el RE mediante la adición de medio que contenía tunicamicina, un fármaco que bloquea la N-glicosilación, evitando así el plegamiento de proteínas e induciendo la respuesta de la proteína desplegada. A continuación, se detectó la viabilidad celular en presencia y ausencia de un compuesto del Ejemplo 1 después de un período de tiempo establecido, midiendo la reducción de WST-8 en formazán usando el kit estándar de viabilidad celular Cell Viability Counting Kit-8 de Dojindo. La citoprotección del estrés del RE se midió en términos del porcentaje de aumento de células viables (en relación con el control) después del estrés del RE.

Ensayo 5: Un inhibidor selectivo de PPP1R15B prolonga la fosforilación de eIF2 α durante la recuperación del estrés (Figura 4)

Los inventores razonaron que un inhibidor de PPP1R15B debería prolongar la fosforilación de eIF2 α después del estrés. Para revelar esta actividad, fue crucial buscar condiciones donde

PPP1R15A no se expresa para evitar efectos de confusión. Los inventores aprovecharon la cinética rápida y la reversibilidad de la inducción de estrés por DTT (Bertolotti y col., Nat. Cell. Biol., 2, 326-332, 2000; Jousse y col., 2003) y monitorizaron la fosforilación de eIF2 α en las células después de un tratamiento de 30 minutos con DTT 1 mM y un lavado. Los inventores encontraron que la disminución en la fosforilación de eIF2 α que se produce normalmente después del lavado de DTT se retrasa y esto se produjo antes de cualquier inducción sustancial de PPP1R15A. Por lo tanto, la monitorización cuidadosa de la cinética de la desfosforilación de eIF2 α en la fase temprana de un paradigma de recuperación del estrés como el que se describe aquí puede usarse para identificar otros inhibidores de PPP1R15B.

El compuesto del Ejemplo 1 en ratones (Figura 5) tiene una buena distribución tisular

El análisis de tejidos de ratón (plasma, cerebro, médula espinal, páncreas, hígado) en diferentes momentos después de la alimentación por sonda oral de un compuesto del Ejemplo 1 reveló que el inhibidor de PPP1R15B tiene una distribución tisular extensa y, por lo tanto, demuestra su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos que afectan a diferentes órganos.

El tratamiento de ratones con un compuesto del Ejemplo 1 no es tóxico para los ratones (Figura 6)

Los ratones se trataron con el Ejemplo 1 y se controlaron de cerca para detectar cualquier signo clínico. Se encontró que los ratones tratados durante 2 semanas con hasta 10 mg/mg una vez al día de un compuesto del Ejemplo 1 eran indistinguibles de los ratones tratados con placebo y los ratones aumentaron de peso normalmente (Figura 6). Esto demuestra que la inhibición de PPP1R15B no es tóxica. Esto fue sorprendente e inesperado, ya que antes de este estudio se habría especulado que los inhibidores de PPP1R15B serían tan perjudiciales que no tendrían potencial terapéutico.

El tratamiento de ratones con un compuesto del Ejemplo 1 no provoca los efectos secundarios provocados por guanabenz (Figura 7)

En los seres humanos, la actividad agonista adrenérgica de guanabenz tiene efectos secundarios que incluyen somnolencia y coma a dosis altas (A. H. Hall, Ann Intern Med 102; 787-788; 1985). Debido a estos efectos secundarios, el guanabenz ya no se usa en humanos. Se anticipa que los derivados de guanabenz tienen los efectos secundarios del guanabenz, asociados con la actividad adrenérgica alfa-2. Si bien la relación estructura-actividad de guanabenz con el receptor adrenérgico alfa-2 no está disponible, los inventores encontraron sorprendentemente aquí que el Ejemplo 1 carece de los efectos secundarios del guanabenz, aunque estructuralmente es muy similar.

Ensayo 6: Inducción de PPP1R15A en un mamífero después del tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1 (Figura 8)

La inducción de PPP1R15A se evaluó mediante qPCR en ARNm total extraído de cerebros de ratones tratados con las dosis indicadas del compuesto del Ejemplo 1.

De manera similar a lo que se había visto en las células, se encontró que los ratones inducían PPP1R15A después de un tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1 y que esta inducción era dependiente de la dosis. Esto explica por qué en ratones se tolera un inhibidor selectivo de PPP1R15B: la inducción de PPP1R15A desfosforila eIF2 α , asegurando que la fosforilación de eIF2 α que resulta de la inhibición de PPP1R15B por un compuesto del Ejemplo 1 es solo transitoria. Esto es importante porque una fosforilación persistente de eIF2 α es perjudicial. La inducción de PPP1R15A *in vivo* por un inhibidor de PPP1R15B es un parámetro farmacodinámico que puede usarse para evaluar la eficacia y potencia de los inhibidores de PPP1R15B en mamíferos en estudios preclínicos o clínicos.

Un compuesto del Ejemplo 1 previene una enfermedad en un mamífero (Figura 9)

El aumento del plegamiento mediante la inhibición de PPP1R15B tiene el potencial de beneficiar a una amplia gama de patologías humanas. Para probar esto, los inventores observaron la enfermedad de Huntington (EH), una enfermedad de proteostasis causada por la acumulación de una proteína mal plegada, la huntingtina mutante. Hay algunos informes que indican que la huntingtina mutante induce la UPR (Duennwald y Lindquist, *Gene & Development*, 22, 3308-3319, 2008; Nishitoh y col., *Genes & Development*, 16, 1345-1355, 2002). Sin embargo, la incapacidad de los inventores de detectar PPP1R15A en modelos de la enfermedad de Huntington sugirió que PPP1R15A no es una diana terapéutica para la EH. Como la EH no tiene cura hasta la fecha, los inventores probaron si la EH podría prevenirse mediante la inhibición de PPP1R15B. Los inventores encontraron que el tratamiento de ratones con EH con 2 mg/kg de un compuesto del Ejemplo 1 impidió el deterioro del rendimiento motor (Figura 9). Esto demuestra que PPP1R15B es una diana terapéutica válida y que, por lo tanto, la inhibición de PPP1R15B será útil en el tratamiento y prevención de enfermedades.

Como se demuestra aquí, para determinar si una enfermedad se puede prevenir o mejorar mediante la inhibición de PPP1R15B, se pueden tratar modelos de ratón o humanos con dosis tolerables del inhibidor. Para atestiguar la inhibición de la diana *in vivo*, los marcadores de la vía de PPP1R15B pueden monitorizarse y usarse como marcadores farmacodinámicos. Dichos marcadores pueden ser PPP1R15A, como se muestra aquí (Figura 8) o cualquier otra diana en la vía como los marcadores de UPR o ISR (que incluyen, entre otros, fosforilación de eIF2 α , CHOP, ATF4). Como se muestra aquí con un compuesto del Ejemplo 1, un inhibidor de PPP1R15B será útil para terapias siempre que sea seguro y esto está determinado por la selectividad del compuesto para PPP1R15B.

Mielinización en explantes de ratones neuropáticos (Figura 10).

La enfermedad de CMT es un grupo de neuropatías de mielina causadas por mutaciones en varios genes. Las mutaciones en la proteína de mielina periférica PMP22 son las causas más comunes de la enfermedad de CMT. Una mutación en PMP22 (Trembler-J) causa el plegamiento incorrecto de PMP22 y una enfermedad en ratones que se asemeja a la CMT en humanos debido a defectos en la mielina en el sistema nervioso periférico. Los explantes de ratones mutantes PMP22 recapitula la grave hipomielinización observada en las enfermedades humanas. Los inventores encontraron que el tratamiento del cultivo de ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratones mutantes PMP22 mejoró la mielinización. Se ha descubierto previamente que los cultivos de DRG de ratones mutantes son modelos útiles para predecir la eficacia terapéutica de los compuestos. Por tanto, los datos aquí presentes demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 será útil para tratar una enfermedad causada por mutación o sobreproducción de PMP22, como la enfermedad de CMT. El compuesto del Ejemplo 1 también será útil en el tratamiento de otros trastornos de la mielina.

Evaluación de la eficacia de PPP1R15B en una enfermedad metabólica (Figura 11)

Se sabe que las enfermedades metabólicas como la diabetes, la obesidad, la enfermedad del hígado graso y la aterosclerosis están asociadas con el estrés patológico del RE y se cree que los moduladores farmacológicos de la UPR pueden tener un beneficio terapéutico. Como no había inhibidores de PPP1R15B disponibles antes de este estudio, no estaba claro si PPP1R15B podría ser una diana terapéutica en enfermedades metabólicas. Los inventores probaron esta posibilidad y encontraron que el tratamiento de ratones obesos con un compuesto del Ejemplo 1 redujo el nivel patológico alto de glucosa en sangre en estos mamíferos (Figura 11). Esto demuestra que el tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1 puede mejorar un trastorno metabólico.

Habiendo demostrado en un modelo de enfermedad que el tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1 es beneficioso, es evidente que los compuestos de la invención serán beneficiosos para otros trastornos metabólicos de mamíferos tales como diabetes, obesidad, enfermedad del hígado graso y aterosclerosis.

Ejemplo B

Expresión y purificación de proteínas

MBP-R15A³²⁵⁻⁶³⁶-His y MBP-R15B^{34[°]-698}-His expresaron y purificaron como se describe anteriormente (Das y col. *Science*, 2015). Se clonó ADNc que codifica PP1y humano en el vector de transferencia de baculovirus pDW464 para añadir un péptido aceptor de biotina N-terminal (BAP). El vector también codifica la holoenzima sintetasa de biotina

de *E. coli* (BirA), de modo que las proteínas marcadas con BAP pueden ser biotiniladas (bio-PP1c) in vivo en células de insectos *Spodoptere frugiperda* (Sf9) (Duffy y col., Anal. Biochem., 262, 122-128, 1998). Se usó el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Thermo Fisher Scientific) para generar el ADN del báculo recombinante y se usaron células de insecto Sf9 para amplificar las reservas virales. La proteína se produjo utilizando células de insecto Sf9 en medio Insect-Xpress (Lonza). bio-PP1c se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare), seguida de filtración en gel (HiLoad 16/600 Columna Superdex 200, GE Healthcare). Las proteínas se analizaron en geles BOLT SDS-PAGE 4-12 % Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific) teñidos con InstantBlue (Expedeon) y la presencia de un PP1 biotinilado se confirmó mediante una transferencia de Western usando un anticuerpo Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific). Esto da como resultado una proteína parcialmente pura, la purificación completa se alcanza en etapas posteriores debido a la alta afinidad y especificidad de la biotina a la estreptavidina (en el chip SPR).

Resonancia de plasmones superficiales (SPR)

Captura de bio-GBZ o bio-PP1c en el SA Sensor Chip

Se utilizó un sistema Biacore T200 (GE Healthcare) para todos los experimentos y GBZ biotinilado (bio-GBZ) {Tsaytler:2011ji} o bio-PP1 se capturó en un Sensor Chip SA (GE Healthcare). La superficie recubierta de estreptavidina se activó mediante una inyección de 1 minuto con una solución de NaOH 50 mM y NaCl 1 M tres veces a un caudal de 10 µl/min. bio-GBZ o bio-PP1c se diluyó en el tampón de funcionamiento (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EGTA 0,1 mM, Tween 20 al 0,05 %, DMSO al 0,1 %) y se inyectó a una concentración de aproximadamente 300 nM a un caudal de 10 µl/min directamente a la superficie recubierta de estreptavidina para alcanzar el nivel de inmovilización de bio-GBZ o bio-PP1c correspondiente a ~200 y 6000 RU, respectivamente. Se realizó una inmovilización en blanco para una de las superficies del chip sensor SA para utilizarla como referencia.

Determinación de las constantes de unión en estado estacionario de pequeñas moléculas a complejos de holofosfatasa R15 utilizando la superficie bio-PP1c

Las moléculas pequeñas se almacenaron como soluciones madre de 50 mM en DMSO al 100 %. Antes de determinar las constantes de unión, se prepararon diluciones en serie de 12 u 8 concentraciones de los compuestos en el tampón de funcionamiento en una placa de 96 pocillos. Antes de cada serie de dilución de compuestos, la subunidad reguladora, MBP-R15A³²⁵⁻⁶³⁶-His o MBP-R15B^{34*-698}-His, se diluyó a 10 µM en el tampón de funcionamiento y se capturó en la superficie de bio-PP1c a un caudal de 30 µl/min durante 1 minuto para formar el complejo de holofosfatasa en la superficie del chip sensor. A esto le siguió un período de estabilización de 1 minuto, para eliminar cualquier unión inespecífica. Luego, sin regenerar la superficie, la serie de dilución del compuesto se inyectó en la superficie del chip a un caudal de 30 µl/min durante 1 minuto, seguido de 2 minutos de tiempo de disociación. Después de cada serie de diluciones, la superficie se regeneró usando NaCl 3 M durante 90 segundos. Después de la regeneración, las respuestas de SPR generalmente volvieron a los niveles básicos y la superficie de bio-PP1c estaba lista para la siguiente serie de diluciones de compuestos. Para poder corregir pequeñas variaciones en la concentración de DMSO entre muestras, se inyectaron ocho muestras de solvente que van desde DMSO al 0,06 a DMSO al 8 % cada quincuagésimo ciclo. La temperatura de la celda de flujo fue de 10 °C.

Análisis de datos

Los sensorgramas se analizaron mediante el software de evaluación Biacore T200 y las constantes de unión se determinaron en base a un modelo de estado estable. Se llevan a cabo experimentos cinéticos utilizando diferentes concentraciones del compuesto y se determinan sus respectivos niveles de unión en equilibrio. Estos niveles de respuesta de equilibrio (R_{eq}) se trazan frente a la concentración y se ajustan utilizando un ajuste global, que es capaz de determinar las constantes de afinidad en estado estacionario, es decir, la concentración al 50 % de saturación es K_D . Los valores K_D se muestran en la Tabla 1.

Medición de la citoprotección contra el estrés del RE

Las células HeLa (40 000 células/ml) se colocaron en una placa de 96 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones (0-20 µM) de un compuesto como el indicado en presencia de 250 ng/ml de tunicamicina durante 72 horas. Para monitorear la muerte celular se le añadió al medio una dilución 1/2000 del colorante verde CellTox (Promega). El crecimiento de las células se controló a lo largo del tiempo y se tomaron fotografías cada 2 horas con el sistema IncuCyte ZOOM y se analizó con el software IncuCyte ZOOM (Essen BioScience). La Tabla 1 muestra la capacidad de los compuestos para proteger las células del estrés citotóxico causado por la tunicamicina. La citoprotección contra el estrés del RE se puede medir mediante un ensayo adecuado. En este caso, se midió la citoprotección en células HeLa en las que se provocó estrés en el RE mediante la adición de medio que contenía tunicamicina, un fármaco que bloquea la N-glicosilación, evitando así el plegamiento de proteínas e induciendo la respuesta de la proteína desplegada. A continuación, se detectó la viabilidad celular en presencia y ausencia de un compuesto enumerado en la Tabla 1 después de un período de tiempo establecido, mediante el control del crecimiento celular a lo largo del tiempo. La citoprotección del estrés del RE se midió en términos del porcentaje de aumento de células viables (en relación con el control) después del estrés del RE.

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{\text{Fase de confluencia (\%)} \text{ a las } X \text{ horas}}{\text{Fase de confluencia (\%)} \text{ a las } 0 \text{ horas}}$$

$$\% \text{ de células muertas} = \frac{\text{Confluencia verde (\%)} \text{ a las } X \text{ horas}}{\text{Fase de confluencia (\%)} \text{ a las } X \text{ horas}} \times 100$$

5

EC50

Las EC50 se extrapolaron de experimentos de respuesta a dosis sobre muerte celular. Los datos de IncuCyte se representaron y analizaron en Prism. El "% de muerte celular" para cada punto de datos. Para cada concentración hay un % de la muerte celular frente al tiempo, se tomó el área bajo la curva y se representó frente a la concentración logarítmica => EC50 (análisis en Prism).

10

Evaluación de tasas de traducción

Las células (90 000 células/ml) se plaquearon en placas de 12 pocillos, se trataron como se indica, se marcaron con 100 µCi/ml de 35S-metionina (Hartmann Analytic) durante 10 minutos a 37 °C, se lavaron con PBS frío y se lisaron en 120 µl de tampón Laemmli. Los lisados se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos, se sonicaron y se resolvieron en geles Bolt Bis-Tris Plus al 4-12 % (Thermo Fisher Scientific). A continuación, los geles se tiñeron con InstantBlue (Expedeon) y se analizaron mediante imágenes de fósforo y se cuantificaron mediante ImageJ.

20

Al monitorear las tasas de traducción tal como se describió anteriormente, las actividades de los inhibidores de R15A, R15B y R15A/B se pueden definir de la siguiente manera (también se muestra en la Figura 12). Un inhibidor de R15A no tiene ningún efecto sobre la traducción en células no estresadas, pero prolonga la atenuación de la traducción después del estrés. Un inhibidor selectivo de R15B atenúa transitoriamente la síntesis de proteínas porque R15A compensa la inhibición de R15B. Un inhibidor de R15A/B inhibe persistentemente la síntesis de proteínas.

25

La traducción se puede inhibir en muchos niveles. Para asegurarse de que los inhibidores de R15A y B están en la diana, se monitorean los niveles de ATF4 en las células tratadas con compuestos. Un inhibidor de R15A/B induce persistentemente la fosforilación de eIF2α y la fosforilación de eIF2α da como resultado la traducción de ATF4. Se muestra aquí que un inhibidor de A/B de hecho induce ATF4, lo que confirma la participación de la diana en las células.

30

Tabla 1

Compuesto (E)	R15A	R15B	PP1	Unión selectiva hacia R15A o R15B (basado en SPR)	Citoprotección de T _m (en comparación con GNB)	⇒ máximo en[μM]	Efecto sobre la muerte celular	⇒ EC50 [μM]	Efecto sobre la traducción	⇒ Inhibe
1	8,32 ± 0,14	7,33 ± 1,79	6,28	R15AB	0%	--	Sí	4,9		R15A/B
2	46,45 ± 18,28	9,222	--	R15B	0%	--	Sí	7,709		R15B
3	4,49 ± 1,47	0,149	10,32	R15AB	52%	2,5	Sí	9,166	Persistente	R15A/B
4	0,457 ± 0,13	0,022 ± 0,02	331,6	R15AB	80%	20	No	--	Persistente/ Transitorio	R15A/B
5	8,45 ± 0,41	2,67 ± 0,40	30,59	R15AB	48%	5	Sí	9,458		R15A/B
6	5,427 ± 1,10	9,094 ± 1,37	--	R15AB	61%	2,5	Sí	9,653	Persistente	R15A/B
7	10,20 ± 2,57	4,336 ± 2,35	12,98	R15AB	46%	5	Sí	11,5		R15AB
8	6,37 ± 1,03	11,34	10,59 ± 3,82	R15AB	0%	--	Sí	11,68		R15AB
9	13,6 ± 0,8	39,6 ± 5,9	14,7 ± 1,4	R15A	67%	5	Sí	11,98		Fuera de la diana

(continuación)

Compuesto (E)	R15A	R15B	PP1	Unión selectiva hacia R15A o R15B (basado en SPR)	Citoprotección de Tm (en comparación con GNB)	⇒ máximo en[μM]	Efecto sobre la muerte celular	⇒ EC50 [μM]	Efecto sobre la traducción	⇒ Inhibe
10	0,391 ± 0,14	0,440 ± 0,09		R15AB	85%	0,62 5	Sí	12,5 2	Persistente	R15A/B
11	16,2 ± 2,1	13,38 ± 0,47		R15AB	34%	5	Sí	12,7		R15AB
12	7,24 ± 0,5	11,7 ± 0,3	30,7 ± 1,5	R15AB	51%	5	Sí	15,1 3	Persistente	R15A/B
13	4,624 ± 0,59	6,684 ± 2,343	--	R15AB	73%	5	Sí	15,4 8	Persistente	R15AB
14	5,446 ± 1,48	5,434 ± 1,26	--	R15AB	100%	2,5	Sí	18,4	Persistente	R15A/B
15	11,17	7,681 ± 2,18	6,143 ± 0,28	R15AB	46%	10	Sí	19,5		R15A/B
16	1,05 ± 0,013	0,035 ± 0,02	--	R15B	92%	2,5	Sí	20,7 6	Transitorio	R15B
17	13,0 ± 0,5	18,1 ± 1,8	12,0 ± 0,8	R15AB	66%	20	No	--	(No)	(R15A/B)
18	10,20 ± 1,62	4,850 ± 0,14	10,17 ± 0,14	R15AB	54%	2,5	Sí	23,8		R15A/B
20	5,666 ± 0,72	5,173 ± 0,69	--	R15AB	88%	5	Sí	37,8 3		R15AB

(continuación)

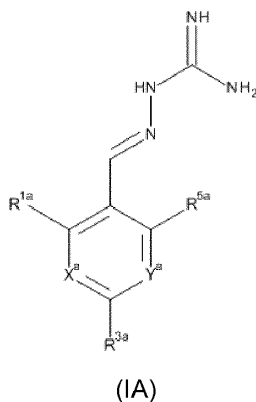
Compuesto (E)	R15A	R15B	PP1	Unión selectiva hacia R15A o R15B (basado en SPR)	Citoprotección de T _m (en comparación con GNB)	⇒ máximo en[μM]	Efecto sobre la muerte celular	⇒ EC50 [μM]	Efecto sobre la traducción	⇒ Inhibe
21	0,832	0,537	(--)	R15AB	41%	20	No	--	Transitorio	R15B
22	7,622	12,35	--	R15AB	48%	20	No	--		R15AB
23	1,424	1,048 ± 0,32	--	R15AB	53%	20	No	--		R15AB
24	18,13 ± 7,57	18,67	6,267	R15AB	62%	20	No	--		R15AB
25	6,18 ± 3,31	9,223 ± 0,19	3,65	R15AB	54%	20	No	--		
26	23,1 ± 0,9	30,0 ± 2,3		R15AB	57%	10	No	--		R15AB
27	10,56	?	--		57%	10	No	--		R15AB
29	7,873 ± 1,48	4,057	--	R15AB	62%	10	No	--		R15AB
30	5,15 ± 1,7	12,3 ± 0,6	12,8 ± 0,08	R15AB	85%	10	No	--	No	R15A/B
31	11,1 ± 1,6	14,3 ± 0,7	12,6 ± 1,4	R15AB	99%	10	No	--	No	R15A

(continuación)

Compuesto (E)	R15A	R15B	PP1	Unión selectiva hacia R15A, o R15B (basado en SPR)	Ciloprotección de Tm (en comparación con GNB)	⇒ máximo en[μM]	Efecto sobre la muerte celular	⇒ EC50 [μM]	Efecto sobre la traducción	⇒ Inhibe
32	4,813 ± 0,26	17,26	---		100%	5	No	--	Persistente	R15A/B
34	17,2 ± 1,9	31,3 ± 2,0		R15A/B	57%	5	No	---		R15A/B
GBZ + 16					100%	1,25	Si	12,6	Persistente	R15A/B

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula IA:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

X^a es CR^{2a} ;

Y^a es CR^{4a} ;

R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan cada uno independientemente H, F o Cl;

donde:

dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan Cl, uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa F, y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H;

dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan F, uno de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representa Cl, y dos de entre R^{1a} , R^{2a} , R^{3a} , R^{4a} y R^{5a} representan H; o

el compuesto es seleccionado de entre:

2- (3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida;

2- (2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida;

2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mismos.

2. El compuesto según la reivindicación 1, donde R^{1a} y R^{3a} representan ambos Cl.

3. El compuesto según la reivindicación 1, donde R^{1a} es F o Cl.

4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto está en forma de isómero E.

5. Un compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto es seleccionado de entre:

(E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(3,5-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2,4-dicloro-5-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2,4-dicloro-3-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2,3-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(4,5-dicloro-2-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2-cloro-3,4-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

(E)-2-(2-cloro-3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida, o

(E)-2-(2-cloro-4,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida,

o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los mismos.

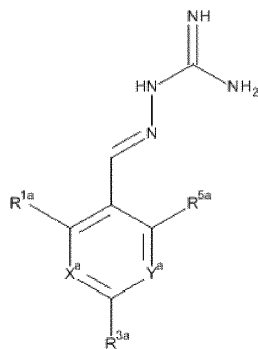
6. El compuesto según la reivindicación 5, que es (E)-2-(3,4,5-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El compuesto según la reivindicación 5, que es (E)-2- (2,3,4-triclorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto según la reivindicación 5, que es (E)-2-(2,3-dicloro-4-fluorobenciliden)hidrazina-1-carboximidamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Un compuesto de Fórmula IA:



(IA)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

X^a es CR^{2a};

Y^a es CR^{4a};

R^{1a}, R^{2a} y R^{4a} son seleccionados independientemente de entre H, F y Cl, donde dos de entre R^{1a}, R^{2a} y R^{4a} son seleccionados de entre F y Cl y uno de entre R^{1a}, R^{2a} y R^{4a} representa H;

R^{3a} es F o Cl;

R^{5a} es H.

11. Una composición farmacéutica para uso en terapia que comprende un compuesto para uso según la reivindicación 10 en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. El compuesto para su uso según la reivindicación 10 o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, donde el uso es en el tratamiento de un trastorno asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas o un trastorno de proteostasis.

13. El compuesto o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, donde el trastorno es seleccionado de entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, otros trastornos de poliglutamina y tauopatías.

14. El compuesto o composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en combinación con uno o más de otros agentes activos.

Figura 1 Un inhibidor selectivo de R15B (compuesto del Ejemplo 1) se une selectivamente a R15B-PP1

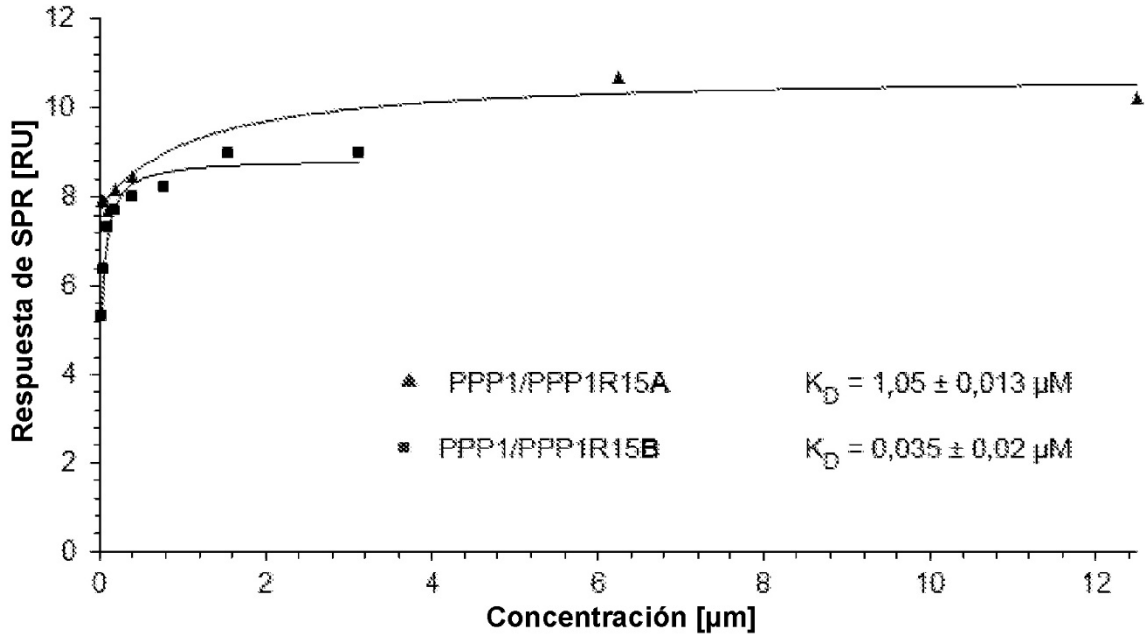


Figura 2 Un inhibidor selectivo de R15B (compuesto del Ejemplo 1) induce una fosforilación transitoria de eIF2 α en las células y la expresión de R15A en las células, en ausencia de estrés

A

Inhibición de R15B (10 μM)

0 1 2 5 7,5 10 (h)



B

← Inhibición de R15B →

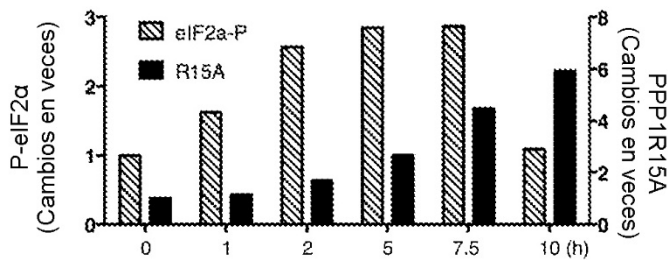


Figura 3 Un inhibidor selectivo de R15B (compuesto del Ejemplo 1) protege a las células del estrés

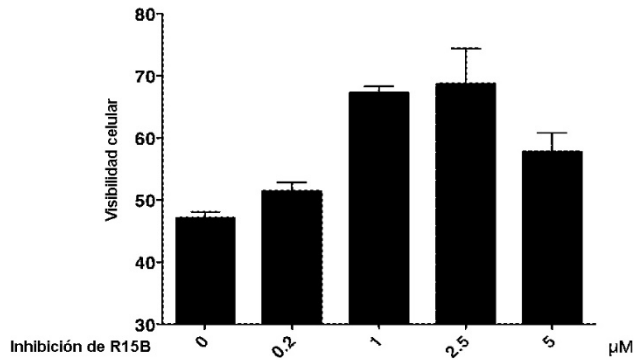
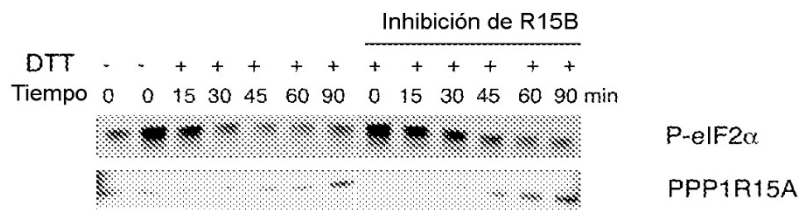


Figura 4 Un inhibidor selectivo de R15B prolonga la fosforilación de eIF2α durante la recuperación del estrés

A



B

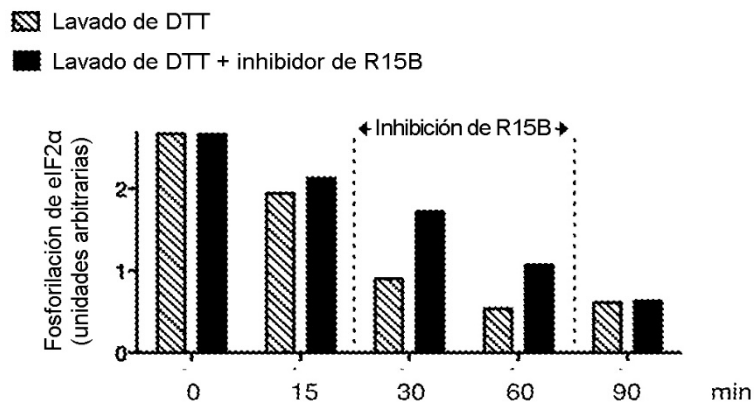


Figura 5 Distribución tisular del Ejemplo 1 en ratones 1 h después de la administración por vía oral (2 mg/kg)

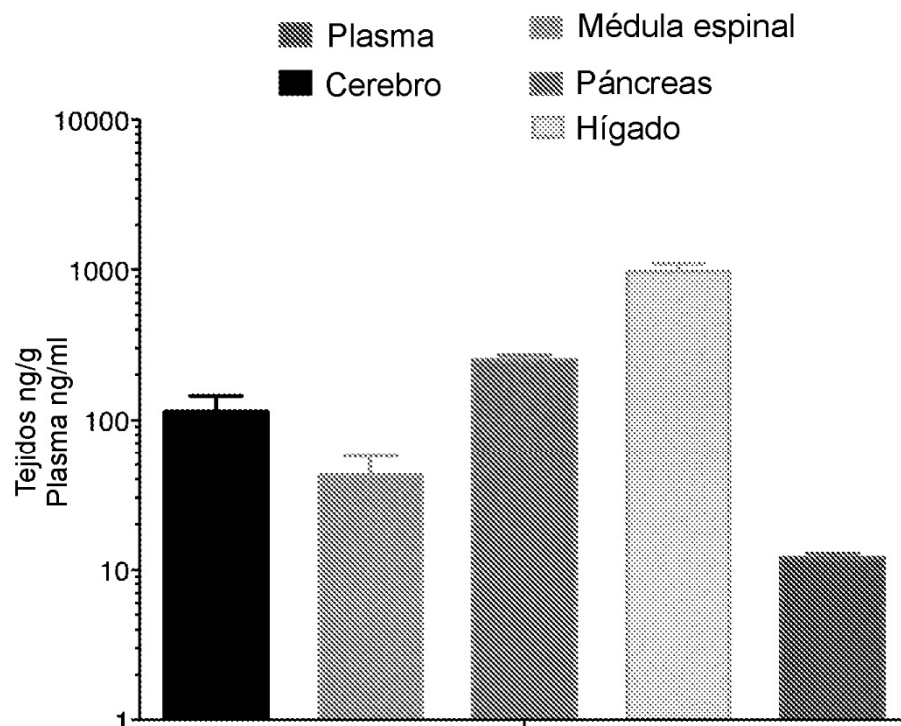


Figura 6 El tratamiento de ratones con un compuesto del Ejemplo 1 (10 mg/kg) no es tóxico para los ratones

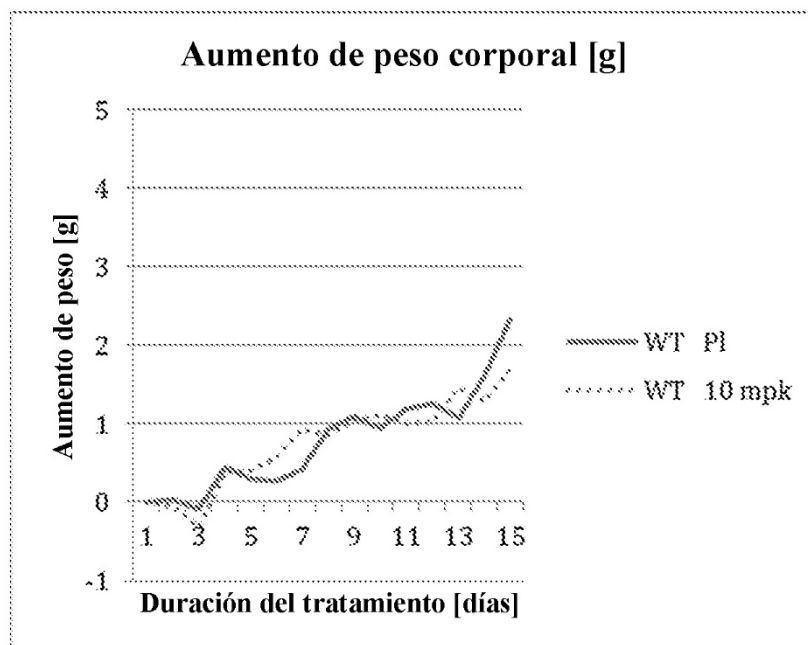


Figura 7 El tratamiento de ratones con un compuesto del Ejemplo 1 no provoca los efectos secundarios provocados por Guanabenz

Los ratones fueron tratados con Guanabenz (10 mg/kg) o con el compuesto del Ejemplo 1 por vía oral y 30 minutos después de la dosis, se midió su actividad

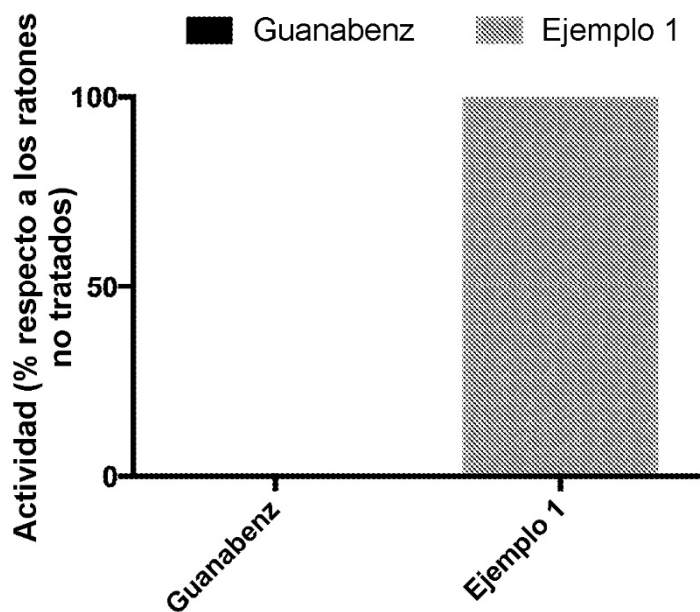


Figura 8 Inducción de R15A en un mamífero después del tratamiento con un compuesto del Ejemplo 1

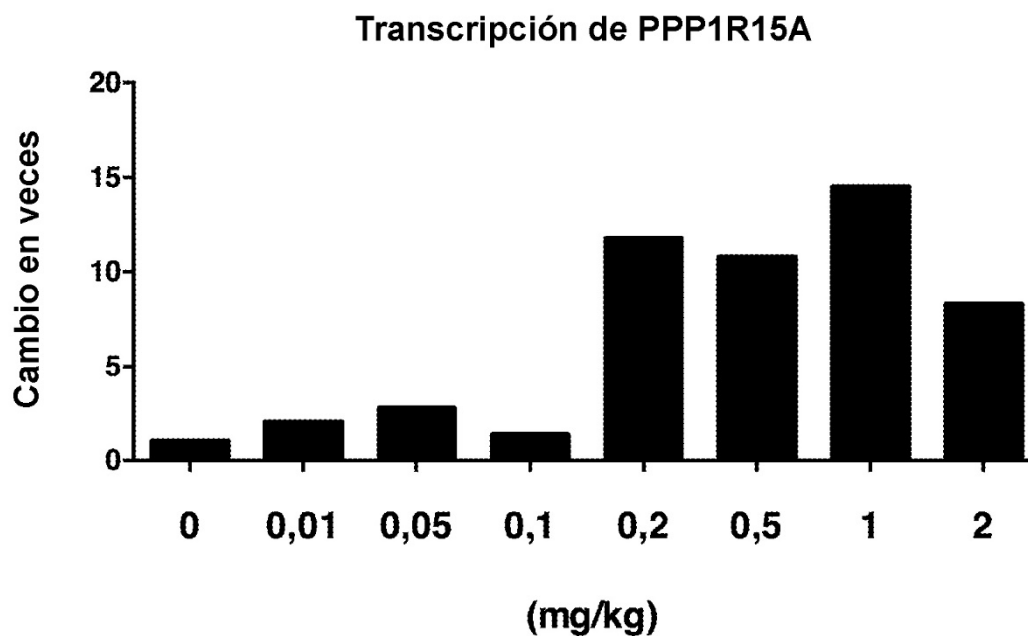


Figura 9 Un compuesto del Ejemplo 1 previene una enfermedad en un mamífero

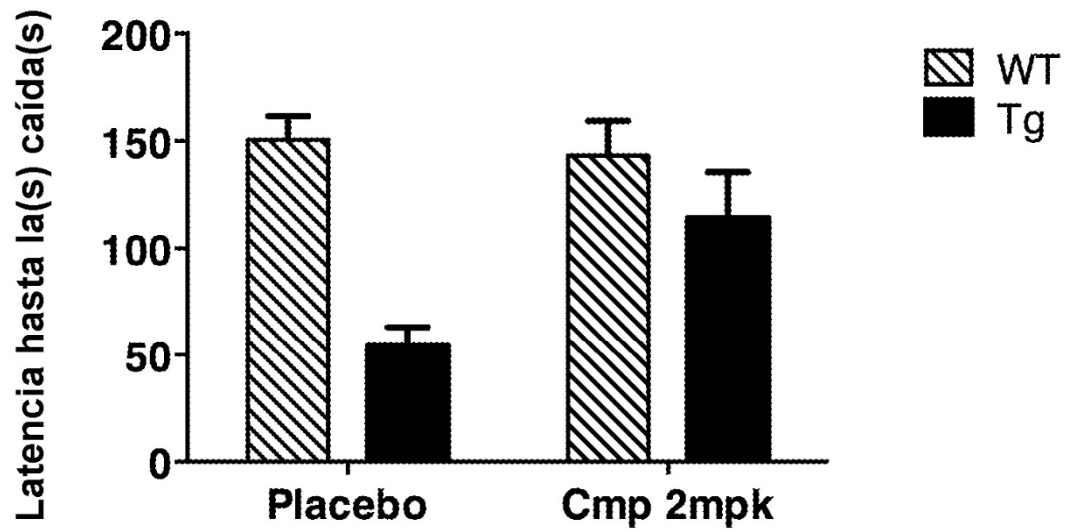


Figura 10 Un compuesto del Ejemplo I mejora la mielinización en cultivos de explantes de ratones neuropáticos

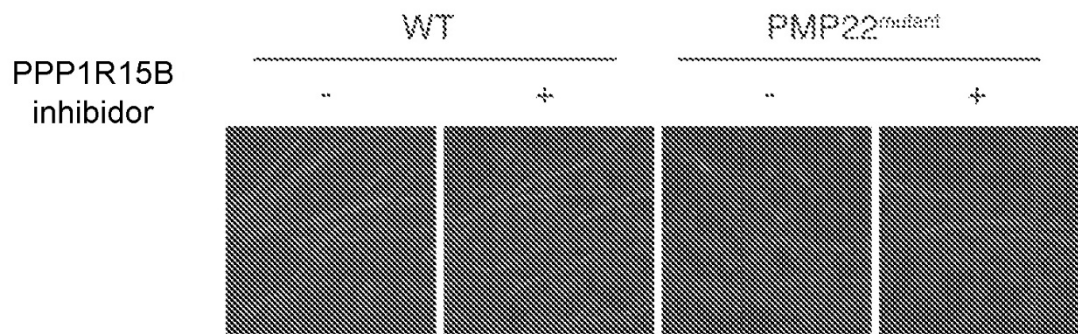


Figura 11 El compuesto del ejemplo I reduce un trastorno metabólico
Glucosa

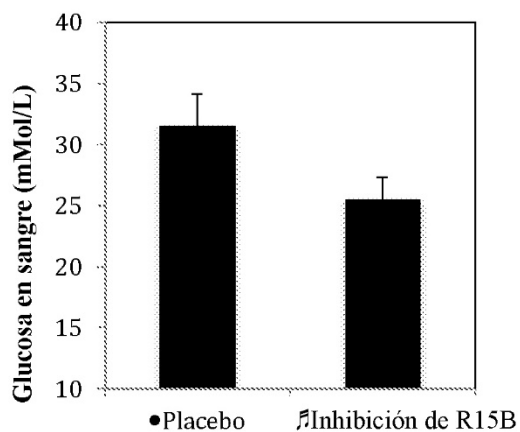


Figura 12 El control de las tasas de síntesis de proteínas distingue los inhibidores R15A, R15B y R15A/B

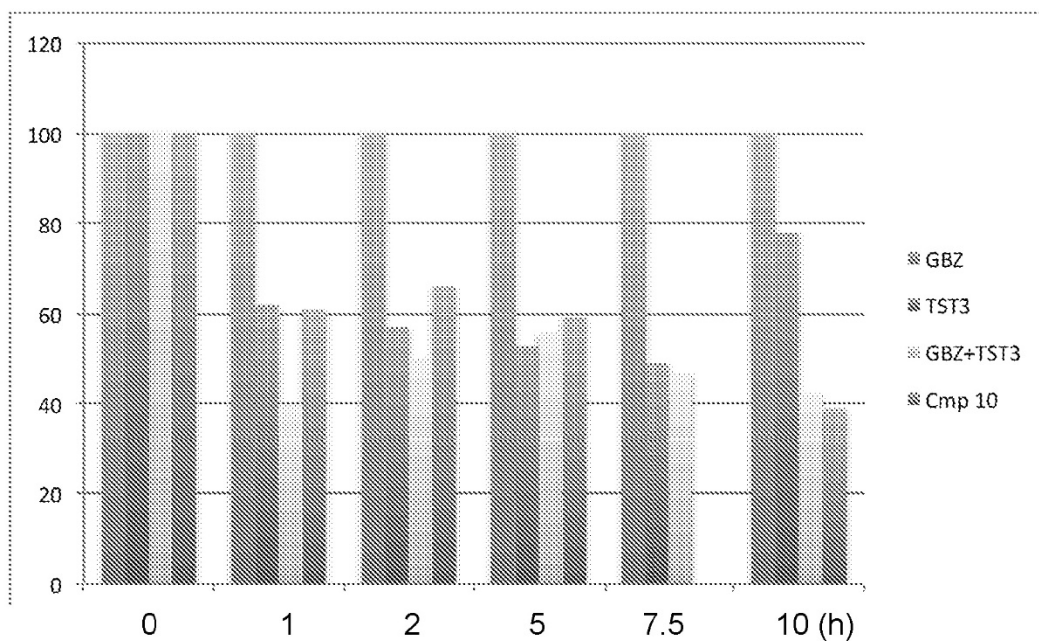


Figura 13 Inmunotransferencia que muestra que un inhibidor de R15A/B (compuesto 10 a 20 μ M) induce la expresión de ATF4 y confirma su efecto sobre la diana

