



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2010 062 810.7**

(22) Anmeldetag: **10.12.2010**

(43) Offenlegungstag: **08.03.2012**

(51) Int Cl.: **A61K 31/5415 (2006.01)**  
**A61P 25/28 (2006.01)**

(66) Innere Priorität:  
**10 2010 044 561.4 07.09.2010**

(71) Anmelder:  
**Universität Rostock, 18055, Rostock, DE**

(74) Vertreter:  
**Wablat-Lange-Karthus, 14129, Berlin, DE**

(72) Erfinder:  
**Pahnke, Jens, 18147, Rostock, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

**DE 44 30 091 A1**  
**WO 96/ 04 915 A1**  
**WO 2008/ 133 884 A2**

**Römpf Lexikon Chemie, Stichwort: „Acetyl-  
,,, Version 3.15. URL: <http://www.roempp.com>  
[recherchiert am 10.8.2011].**

**Römpf Lexikon Chemie, Stichwort: „Acyl-  
,,, Version 3.15. URL: <http://www.roempp.com>  
[recherchiert am 10.8.2011].**

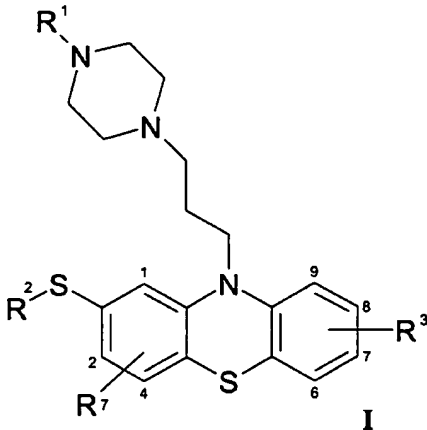
**Stephan LORENZEN; Mathias DUNKEL;  
Robert PREISSNER: In silico screening of drug  
databases for TSE inhibitors. In: BioSystems 80  
(2), 2005, 117-122; ISSN: 0303-2647.**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

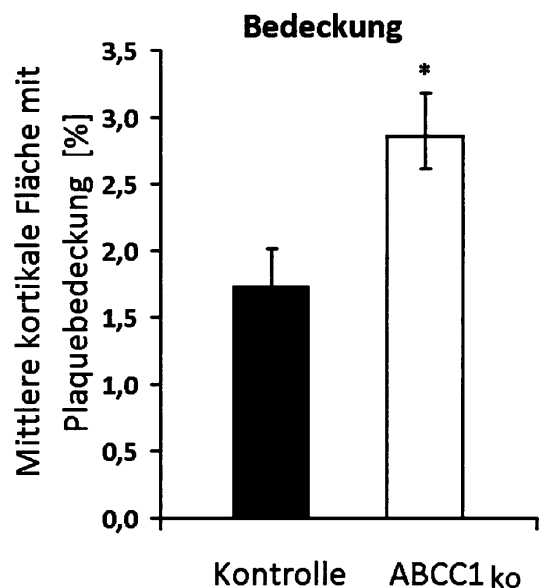
**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine gemäß der allgemeinen Formel I



zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.



## Beschreibung

**[0001]** Die Akkumulation von Proteinen oder Proteinfragmenten (Peptiden) im Gehirn ist ein signifikantes Merkmal von altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen. Bei der Alzheimer Demenz (Alzheimer disease, AD) und der zerebralen  $\beta$ -Amyloidangiopathie (CAA) ist die Aggregation von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden ( $A\beta$ ) krankheitsauslösend, wobei der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt ist. Die  $A\beta$ -Proteostase, d. h. das Gleichgewicht von Produktion und Abbau/Abtransport mittels Rezeptoren oder Proteasen, ist bei der AD und CAA gestört. Der Entfernung der  $A\beta$ -Peptide durch zelluläre Transporter (ABC Transporter) wurde jedoch bisher wenig Beachtung beigemessen.

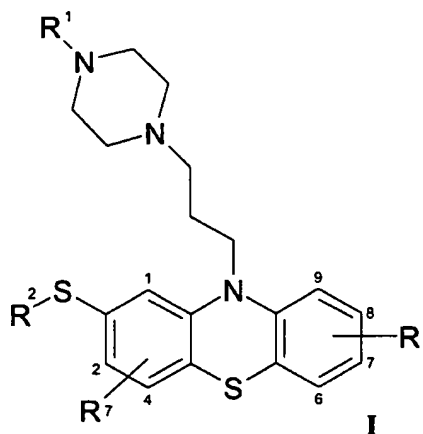
**[0002]** Mittels verschiedener gentechnisch veränderter Mausmodelle konnte durch uns gezeigt werden, dass der ATP-Transporter (gemeinsames Strukturelement der ATP-Transporter ist eine ATP-bindende Kasette) ABCC1, welcher im Plexus choroideus besonders stark exprimiert wird, ein wichtiger  $A\beta$ -Transporter ist, der außergewöhnliche funktionelle Auswirkungen auf die zerebrale  $A\beta$ -Akkumulation hat.

**[0003]** Zur Bestimmung der ABCC1-Aktivität in vivo wurde bei APP-exprimierenden, transgenen Mäusen jeweils der ABCB1-, der ABCG2- oder der ABCC1-Transporter gentechnisch entfernt (knock out Mäuse). Dabei wurde gefunden, dass:

- i) die Menge von  $A\beta$  in den Mäusen, denen der ABCC1 Transporter fehlte, um das 12-fache gesteigert war,
- ii) der ABCB1-Transporterverlust nur zu einer 3-fachen Erhöhung führt und
- iii) der ABCG2-Verlust keine  $A\beta$ -akkumulierende Auswirkung hat.

**[0004]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Substanzen bereit zu stellen, welche den ABCC1-Transporter in geeigneter Weise beeinflussen, um so neurodegenerative Erkrankungen behandeln zu können. Diese Aufgabe wurde mit 2-( $R^2$ -Thio)-10-[3-(4- $R^1$ -piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazinen gemäß Anspruch 1 gelöst. Weitere bevorzugte Ausführungsformen ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

**[0005]** In anderen Worten wurde die Aufgabe durch 2-( $R^2$ -Thio)-10-[3-(4- $R^1$ -piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine gemäß der allgemeinen Formel I gelöst,



wobei die Reste  $R^1$  und  $R^2$  gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander  $C_1$ - $C_6$ -Alkylgruppen sind, welche unabhängig voneinander gegebenenfalls einen weiteren Substituenten ausgewählt aus Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio-, Alkylthio-Gruppe und Halogenatom aufweisen, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen und der Rest  $R^3$  sich an einer der Positionen 6–9 des Phenothiazin-Ringsystems befindet und ein Wasserstoffatom oder eine Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthio-Gruppe oder ein Halogenatom ist, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen, oder eine  $NR^4R^5$ - oder  $OR^6$ -Gruppe ist, wobei  $R^4$ ,  $R^5$  und  $R^6$  gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff und  $C_1$ - $C_3$ -Alkylgruppe und der Rest  $R^7$  sich an einer der Positionen 1, 2 oder 4 des Phenothiazin-Ringsystems befindet und ein Wasserstoffatom oder eine Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthio-Gruppe oder ein Halogenatom ist, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen, oder eine  $NR^8R^9$ - oder  $OR^{10}$ -Gruppe ist, wobei  $R^8$ ,  $R^9$  und  $R^{10}$  gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff und  $C_1$ - $C_3$ -Alkylgruppe, zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

**[0006]** Sowohl die Mausmodelle als auch die pharmakologische Beeinflussung des ABCC1 zeigen, dass dieser ein wichtiger zellulärer Transmembrantransporter für das  $A\beta$ -Protein ist und implizieren, dass der Plexus choroideus eine Schlüsselposition für die  $A\beta$ -Ausscheidung aus dem Gehirn einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die selektive pharmakologische Aktivierung des ABCC1-Transporters die zerebrale Belastung mit  $A\beta$  signifikant verringert und so therapeutisch zur Behandlung von Erkrankungen mit gestörter Proteostase verwendbar ist.

**[0007]** Veränderungen von Exportmechanismen, welche in Zusammenhang mit ABC-Transporter stehen, können das temporale Aggregationsprofil von A $\beta$  und anderen Hirnproteinen substantiell beeinflussen. Demzufolge wirkt sich eine Beeinflussung der Funktion des ABCC1-Transporters auf das Risiko an neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere an Alzheimer, zu erkranken positiv aus. „Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen“ umfasst in diesem Sinne die Prophylaxe als auch die Behandlung bereits bestehender Erkrankungen.

**[0008]** Die Rolle der ABC-Transporter bei der A $\beta$ -Ausscheidung wurde zuerst derart untersucht, dass nachgewiesen wurde, dass ABCC1 in der Lage ist, A $\beta$  zu transportieren. Hierzu wurden in vitro Transwell-Assays mit Endothelzellen (endothelial cell transwell assay, ECTA) von primären, kultivierten, Kapillarendothelzellen aus Mausgehirnen verwendet (Zellkulturansatz):

Primäre Kulturen von Endothelzellen aus Gehirnkapillaren von ABCB1-defizienten, ABCC1-defizienten (knock out) Mäusen und von Kontrollmäusen (C57 Bl/6, FVB/N) wurden genutzt, um die A $\beta$ -spezifische Transportaktivität zu untersuchen. Der Transport von A $\beta$ 42 aus dem abluminalen (Gehirn) in das luminal (Blut)-Kompartiment ist bei ABCB1-defizienten und ABCC1-defizienten Endothelien beeinträchtigt. Die mittlere A $\beta$ 42-Transportrate während der ersten sechs Stunden nach Gabe von A $\beta$ 42-Peptiden betrug 2,2 pg/min für die Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu erreichten die ABCC1-defizienten Zellen nur die halbe Transportkapazität (1,0 pg/min). In den ABCB1-defizienten Zellen war der A $\beta$ 42-Transport nahezu nicht vorhanden (0,3 pg/min). Weitere Untersuchungen an Kapillarendothelien und Zellen aus dem Plexus choroideus ergaben, dass der Transporter ABCB1 stark in Gehirnkapillarendothelien exprimiert wird, wohingegen die endotheliale ABCC1-Expression in Hirnkapillaren viel geringer ist.

**[0009]** Anhand neu generierter ABC-Transporter-defizienter Alzheimer Mausmodelle wurde dann die relative Signifikanz von Mitgliedern der ABC-Transporterfamilie in vivo untersucht. Die gentechnisch veränderten Mäuse weisen jeweils eine Defizienz (knock out) an spezifischen ABC-Transporter ABCG2, ABCB1 oder ABCC1 auf.

**[0010]** Die A $\beta$ -Immunohistochemie von Gehirnschnitten zeigte:

- i) signifikante Anstiege in der kortikalen Anzahl und der Größe A $\beta$ -positiver Plaques in ABCC1-defizienten Mäusen verglichen zu Kontrollmäusen (siehe Fig. 1 und Fig. 2a–c).

- ii) ABCB1-defiziente Mäuse zeigten einen geringeren Anstieg der Anzahl und Größe von A $\beta$ -Plaques als ABCC1-defiziente Mäuse.

- iii) Zwischen Kontrollmäusen und ABCG2-defizienten Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Fig. 2a–c).

**[0011]** Zur Bestimmung der Menge an pufferlöslichem A $\beta$  (größtenteils Monomere und kleinere Oligomere) und an Guanidin-löslichem A $\beta$  (größtenteils fibrilläres bzw. aggregiertes Material) wurden enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay, ELISAs) für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 verwendet.

**[0012]** In Übereinstimmung mit den morphologischen Ergebnissen aus der Immunohistochemie zeigten die ABCC1-defizienten Mäuse einen signifikanten Anstieg bei aggregiertem A $\beta$ 42 im Vergleich zu den Kontrollmäusen zu allen Messungszeitpunkten. Die zerebrale Belastung mit A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 war in einem Alter von 25 Wochen am stärksten. Zu diesem Zeitpunkt waren die A $\beta$ -Werte 12-mal höher als bei den Kontrollmäusen. Pufferlösliches A $\beta$  stieg mit dem Alter ebenfalls an, aber nach 25 Wochen, zum Zeitpunkt der höchsten Plaques-Belastung, fielen die Werte des löslichen A $\beta$ s in der ABCC1-defizienten Gruppe stark ab.

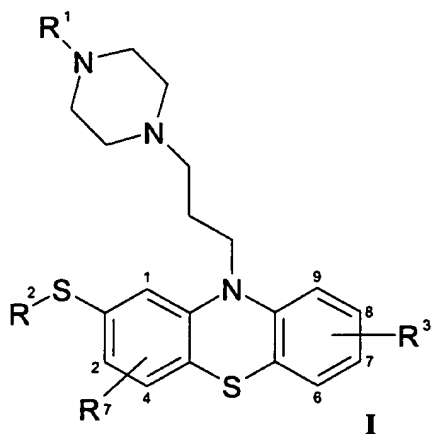
**[0013]** Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, welche weitere Belege für den Zusammenhang zwischen dem ggf. fehlenden Abtransport durch ABCC1 und der Aggregation von A $\beta$  lieferten.

**[0014]** Die Transportkinetiken von ABC-Transporter hängen unter anderem von spezifischen Protein-/Peptidcharakteristika wie der Ladung ab. Die Dutch-type-Variante des APP (holländische Mutante, APP<sub>dt</sub>), welche eine zusätzliche negative Ladung nahe der Schnittstelle der alpha-Sekretase des APP einführt und so zu einer schweren zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) führt, beeinflusst die Eliminierung des A $\beta$ <sub>dt</sub> über die Blut-Hirn-Schranke. Die Western-blot-Analysen von angereicherten Gehirnkapillaren und von Plexus choroideus (CP) aus Kontrollmäusen zeigten eine starke Expression von ABCB1 in zerebralen Kapillarendothelien (BC) und von ABCC1 im CP (Fig. 3d). Da ABC-Transporter eine wichtige Rolle bei der Eliminierung des A $\beta$  spielen, wurde angenommen, dass ABC-Transporter-defiziente (an der Blut-Hirn-Schranke und an der Blut-Plexus choroideus-Schranke) APP<sub>dt</sub>-transgene Mäuse eine verstärkte Akkumulation von A $\beta$ <sub>dt</sub> in meningealen Gefäßen aufweisen. Der Grad der CAA in den ABC-defizienten APP<sub>dt</sub>-Mäusen wurde im Alter von 24 Monaten quantifiziert. In Übereinstimmung mit der Annahme waren 51% der Gefäße schwer beeinträchtigt (> 75% der Gefäßwand mit A $\beta$  beladen) bei den ABCC1-defizienten Tieren gegenüber 23% bei den Kontrollen (Fig. 3c).

**[0015]** Auf Basis dieser Ergebnisse wurde untersucht, inwieweit der Gehalt an löslichem A $\beta$  im Gehirn durch wirkstoffvermittelte Aktivierung von ABC-Transporter verringert/beeinflusst werden konnte. Mäuse mit Amyloidablagerungen wurden für 30 Tage mit dem anti-emetischen Thiethylperazin (Torecan<sup>®</sup>, 2-(Ethylthio)-10-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazin) behandelt. Zweimal täglich wurden 3 mg/kg Körpergewicht intramuskulär verabreicht. Die prophylaktische Behandlung begann bereits bevor die Mäuse senile Plaques ausbilden. Thiethylperazin induziert ABCC1 und hemmt jedoch geringfügig die Funktion von ABCB1. ELISA-Messungen der behandelten Tiere zeigten eine Reduktion der A $\beta$ 42-Menge von 31% bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu mit Vehikel-behandelten Tieren (Vehikel = Wasser) (Fig. 3e). Die Ergebnisse sind graphisch in Fig. 3 wiedergegeben.

**[0016]** Die Fähigkeit zur Entfernung von A $\beta$  erwies sich als ein Schlüsselfaktor bei der Regulation der intrazerebralen Akkumulation von A $\beta$ .

**[0017]** Als besonders effizienter Aktivator des ABCC1-Transporters erwies sich Thiethylperazin (Torecan<sup>®</sup>). Weitere Derivate ausgehend vom selben Grundgerüst zeigten ebenfalls gute Ergebnisse bei der Aktivierung des ABCC1-Transporters. Die entsprechenden Derivate sind in der allgemeinen Formel I dargestellt



wobei die Reste R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylgruppen sind, welche unabhängig voneinander gegebenenfalls einen weiteren Substituenten ausgewählt aus Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio-, Alkylthio-Gruppe und Halogenatom aufweisen, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen und der Rest R<sup>3</sup> sich an einer der Positionen 6–9 des Phenothiazin-Ringsystems, vorzugsweise an Position 6, 7 oder 8, befindet und ein Wasserstoffatom oder eine Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthio-

Gruppe oder ein Halogenatom ist, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen, oder eine NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>- oder OR<sup>6</sup>-Gruppe ist, wobei R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe und der Rest

R<sup>7</sup> sich an einer der Positionen 1, 2 oder 4 des Phenothiazin-Ringsystems, vorzugsweise an Position 2 oder 4, befindet und ein Wasserstoffatom oder eine Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthio-Gruppe oder ein Halogenatom ist, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen, oder eine NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>- oder OR<sup>10</sup>-Gruppe ist, wobei R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> und R<sup>10</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe. Diese Derivate sind entsprechend gut geeignet zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wobei Behandlung wie oben erwähnt sowohl die Prophylaxe als auch die Behandlung bereits bestehender Erkrankungen umfasst.

**[0018]** Das Halogenatom/die Halogenatome sind vorzugsweise ausgewählt aus Fluor und Chlor.

**[0019]** In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Reste R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden und jeweils unabhängig voneinander eine C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe. Weiterhin ist es bevorzugt, dass die Reste R<sup>3</sup> und R<sup>7</sup> Wasserstoff sind.

**[0020]** Besonders bevorzugt ist es, wenn der Rest R<sup>1</sup> eine Methylgruppe, der Rest R<sup>2</sup> eine Ethylgruppe und die Reste R<sup>3</sup> und R<sup>7</sup> Wasserstoff sind (Thiethylperazin, Torecan<sup>®</sup>).

**[0021]** Bei der Verwendung zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, den 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazinen weitere Wirkstoffe, vorzugsweise 1-Benzhydrylpiperazine, höchst bevorzugt 1-Benzhydryl-4-cinnamyl-piperazin (Cinnarizin), zuzusetzen.

**[0022]** Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen können mit den erfindungsgemäßen 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazin-Derivaten behandelt werden.

**[0023]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die neurodegenerative Erkrankung eine  $\beta$ -Amyloidopathie, insbesondere Alzheimer Demenz (AD).

**[0024]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung die Huntington'sche Erkrankung (HD) ist.

**[0025]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung eine alpha-Synucleinopathie, insbesondere Parkinson'sche Erkrankung (PD) oder Lewy-Körperchen-Demenz (LBD), ist.

**[0026]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung eine Pron-Erkrankung, insbesondere Creutzfeld-Jacob-Erkrankung (CJD) oder Fatale Familiäre Insomnie (FFI), ist.

**[0027]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung eine Tauopathie, insbesondere Cortico-Basale-Degeneration (CBD), Steel-Richardson-Olszewski-Syndrom (PSP, progressive supranuclear palsy, progressive supranukleäre Blickparese), Alzheimer Demenz (AD) oder Pick'sche Erkrankung (PiD), ist.

**[0028]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung eine Frontotemporale Degeneration (FTLD), insbesondere Ubiquitin-positive Degeneration, TDP43-positive Degeneration oder für Ubiquitin- und TDP43-negative Degenerationen, ist.

**[0029]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung amyloptrophe Lateralsklerose (ALS) ist.

**[0030]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative Erkrankung eine spinocerebelläre Ataxie (SCA) oder spastische Paraparese (SPG) ist.

**[0031]** Eine andere Ausführungsform betrifft den Fall, dass die neurodegenerative/neuroimmunologische Erkrankung Multiple Sklerose (MS) oder ein MS-verwandtes Syndrom, insbesondere ADEM oder Devic-Syndrom, ist.

#### Beschreibung der Abbildungen

**[0032]** Es zeigen

**[0033]** [Abb. 1a](#) dass die kortikale Dichte neuritischer Plaques bei ABCC1-defizienten Mäusen (ABCC1ko) um ~75% erhöht ist;

**[0034]** [Abb. 1a, c](#) dass die mittlere Plauegröße erhöht ist (+34%) aufgrund der größeren Anzahl an Plaques (+63%) mit einer Größe von mehr als 700  $\mu\text{m}^2$  und einer geringeren Häufigkeit kleinerer Plaques (-24%). Fehlerbalken, Standardfehler ( $n \geq 3$ );

**[0035]** [Abb. 1d](#) dass die IHC-Färbung bei ABCG2-defizienten (ABCG2ko)-, ABCB1-defizienten (ABCB1ko)-, ABCC1-defizienten (ABCC1ko)-Mäu-

sen und bei Kontroll-Mäusen eine höhere Flächen-dichte an A $\beta$  bei ABCC1-defizienten Tieren zeigt. Typische Plaques derselben Größe sind im Ausschnitt dargestellt, Skalierungsbalken stellen 500  $\mu\text{m}$  (Übersicht) und 50  $\mu\text{m}$  (Ausschnitt) dar (\* $p < 0,05$ );

**[0036]** [Abb. 2a](#) dass die Plaue-dichte im Kortex (Bedeckung) und die Größe bei spezifischen ABC-Transporter-knockout-Mäusen erhöht ist. Insbesondere ABCC1-defiziente (ABCC1ko) Mäuse zeigen eine erhöhte A $\beta$ -Amyloidbelastung (hellgraue Balken, jeweils rechts außen in den einzelnen Gruppierungen), w = Woche auf der Abszisse;

**[0037]** [Abb. 2b](#) dass die Gesamtplauegröße bei ABCC1-defizienten (ABCC1ko) und ABCB1-defizienten (ABCB1ko) Mäusen im Alter von 25 Wochen erhöht ist, w = Woche auf der Abzisse;

**[0038]** [Abb. 2c](#) dass der Gesamtanstieg in der Plauegröße mit dem Auftreten weniger kleiner Plaques und mehr größerer Plaques (> 700  $\mu\text{m}^2$ ) assoziiert ist, wohingegen die Anzahl mittelgroßer Plaques auf dem selben Wert bleibt, Fehlerbalken, Standardfehler ( $n \geq 5$ ), \* $p < 0,05$ ;

**[0039]** [Abb. 3](#) dass die Defizienz von ABCC1 die Akkumulierung von A $\beta$  und A $\beta_{\text{dt}}$  fördert und dass die Aktivierung von ABCC1 (durch Gabe von Torecan) die A $\beta$ -Werte senkt; wobei

**[0040]** [Abb. 3a](#) zeigt, dass in einem Alter von 25 Wochen ABCC1-Defizienz zu einem markanten Anstieg (~12fach) bei unlöslichem A $\beta$  führt; und

**[0041]** [Abb. 3b](#) zeigt, dass die Menge an pufferlöslichem A $\beta_{42}$  in einem Alter von 25 Wochen merklich reduziert ist im Vergleich zu 22 Wochen (-56%). Dies beruht wahrscheinlich auf der Ablagerung in unlöslichen Depots. Im selben Alter ist die von A $\beta$ -Ablagerungen belegte Fläche, welche in der Immunohistochemie gemessen wird, um 83% erhöht (Fehlerbalken Standardfehler  $n \geq 5$ ,  $p < 0,05$ );

**[0042]** [Abb. 3c](#) zeigt, dass 53% der Blutgefäße schwer durch CAA beeinträchtigt sind (> 75% der Gefäßwände weisen A $\beta$  auf). Dies betrifft ABCC1-defiziente Mäuse (ABCC1ko) im Vergleich zu 23% bei den Kontrollen ( $n = 3$ );

**[0043]** [Abb. 3d](#) zeigt, dass die Expression von ABCC1 predominant im Plexus choroideus (CP) zu sehen ist, wohingegen ABCB1 hauptsächlich in den Kapillaren des Gehirns (BP) exprimiert ist;

**[0044]** [Abb. 3e](#) zeigt, dass die Aktivierung von ABCC1 durch Thiethylperazin (Torecan) die A $\beta$ -Werte bei Mäusen senkt (-28%), Fehlerbalken, Standardfehler ( $n = 4$ , \* $p < 0,05$ ).

## Beispiele

## Western Blots

## Tiere

**[0045]** APP-transgene Mäuse (APP, APP<sub>dt</sub>) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) und der Universität Tübingen (Tübingen, Deutschland) bezogen. Die NEP-defizienten Mäuse waren ein Geschenk vom Riken Brain Research Institute (Saitama, Japan). ABCG2-, ABCB1-, und ABCC1-defiziente Mäuse wurden von Taconic Farms (Dänemark) bezogen. Alle transgenen und knockout Mauslinien wurden für mindestens 9 Generationen in den genetischen FVB-Hintergrund eingekreuzt. Die Mäuse wurden in 12 h/12 h Licht/Dunkelheit-Zyklus bei 23°C gehalten mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser.

## Methoden

## Gewebepräparation

**[0046]** Zur Gewebepräparation wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und transkardial mit PBS (Phosphat-gepufferte, physiologische Kochsalzlösung) perfusioniert. Das Gehirn wurde entfernt und eine Hemisphäre in gepuffertem, 4%-igem Paraformaldehyd für Parafineinbettung und Immunohistochemie gelagert. Die andere Hemisphäre wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für biochemische Analysen gelagert.

## ELISA

**[0047]** ELISA-Kits (TH40HS, TK42HS-hochsensitiv) von The Genetics Company (Schlieren, Schweiz, aktuell eine Abteilung von Merck/Millipore) wurden für die Quantifizierung von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 verwendet. Gehirnhemisphären wurden unter Verwendung von Pre-Cellys24 (12 s, 6.500 rpm) homogenisiert. Nach Zusatz von Carbonatpuffer (pH 8,0) wurden die Homogenisate unter Verwendung von Pre-Cellys gemischt (5 s, 5.000 rpm) und 90 min zentrifugiert bei 4°C und 24.000 g, um unlösliche von löslichen A $\beta$ -Spezies zu trennen. Der verbleibende Überstand (pufferlösliche Fraktion) wurde mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid in einem Verhältnis von 1:1,6 gemischt. Zur Extraktion der aggregierten A $\beta$ -Spezies wurde das Pellet in 8 Volumen von 5 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst, bei Raumtemperatur 3 h geschüttelt und bei 24.000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der verbleibende Überstand stellte die Guanidin-lösliche Fraktion dar (GuaHCl). Proteingehalte aller Proben wurden dreifach gemessen, wobei ein Nanodrop 1000 Spektrophotometer verwendet wurde (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Die ELISAs wurden gemäß Herstelleranweisung unter Verwendung passender Verdünnungen durchgeführt.

**[0048]** Für die Western Blots wurden Gewebehomogenisate hergestellt. Die Gesamtproteinkonzentrationen der Extrakte wurden unter Verwendung eines BOA-Assays bestimmt (Pierce, Teil von Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA). Nach der Elektrophorese von 10  $\mu$ g Gesamtprotein pro Spur wurden die Proteine auf PVDF-Membranen geblottet. Nach Blockade in 5% Trockenmilch in TBST-Puffer (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) für 1 h bei Raumtemperatur, wurden die Blots entweder auf ABCB1 (1:500, D-11, Santa Cruz), ABCC1 (1:200, Alexis Bio) oder  $\beta$ -Actin (1:20.000, Sigma) über Nacht bei 4°C untersucht. Als Detektionsantikörper wurden Anti-Maus-HRP, Anti-Ratte-HRP bzw. Anti-Hase-HRP verwendet. Für die Visualisierung wurden ein Amersham ECL Plus Detektionskit und eine Roper CoolSnap HQ<sup>2</sup>-Kamera verwendet.

## Immunohistochemie (IHC)

**[0049]** Formalin-fixierte Gehirne wurden in Parafin eingebettet und in 4  $\mu$ m-dicke Sektionen geschnitten. Nach Entfernung des Parafins wurden die Sektionen mit einem BondMax Autostainer (Menarini/Leica, Deutschland) weiter behandelt. Immunofärbung wurde initiiert nach Blockade endogener Peroxidase (5 min) und Epitop-Wiederfindung (epitope retrieval) für 5 min mit 95% Ameisensäure (für 6F3D (Dako, Deutschland) und A $\beta$ 42-Antikörper, 70% Ameisensäure (für Antikörper 4G8, Millipore, Deutschland)). Primäre Antikörper wurden routinemäßig bei Raumtemperatur für 30 min mit folgenden Verdünnungen inkubiert: Dako-Clone 6F3D (1:100), 4G8 (1:500); A $\beta$ 42 (1:800). Primäre Antikörper wurden mit dem BondMax<sup>TM</sup> Bond Polymer Refine Detektionskit und nach dem Standardprotokoll DAB R30 detektiert. Die Schnitte wurden vollständig digitalisiert mit einer Auflösung von 230 nm unter Verwendung eines MiraxDesk/MiraxMidi-Scanners und anschließend automatisch analysiert unter Verwendung des AxioVision-Softwarepakets (Zeiss, Deutschland).

## Bewertung des Schweregrades der CAA

**[0050]** Gehirnschnitte von APP<sub>dt</sub>-Mäusen wurden mit 4G8-Antikörper angefärbt. Zumindest zwei nicht aufeinander folgende Sektionen wurden auf CAA der Hirnhautgefäße in verblindeter Weise untersucht. Alle Hirnhautgefäße wurden manuell gezählt und der Schweregrad der CAA wurde wie folgt kategorisiert: Kategorie I: nicht beeinträchtigt  
Kategorie II:  $\leq$  25% der Peripherie positiv eingefärbt  
Kategorie III:  $\leq$  50% der Peripherie positiv eingefärbt  
Kategorie IV:  $\leq$  75% der Peripherie positiv eingefärbt  
Kategorie V:  $\leq$  100% der Peripherie positiv eingefärbt



**[0051]** Die mittlere Anzahl an Gefäßen zu jeder Kategorie wurde relativ zur Gesamtzahl aufgefundener Gefäße kalkuliert.

#### Endothelzellen-Transwell-Assay (ECTA)

**[0052]** Endothelzellen von Mausgehirnkapillaren wurden wie bei Coisne et al. beschrieben hergestellt (Coisne, C. et al. Mouse syngenic in vitro blond-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in zerebral endothelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85, 734–746 (2005)). Mindestens zehn 3–4 Wochen alte Mäuse wurden enthauptet und die Gehirne entfernt. Nach Dissektion des Hirnstamms, der weißen Substanz und der Hirnhaut wurde das Gewebe in zwei Volumen Waschpuffer B homogenisiert (WBB) (Hanks buffered salt solution (HBBS), 10 mM HEPES, 0,1% BSA) unter Verwendung eines 15 ml Glassdouncers (Wheaton industries, Millville, NJ; USA). Ein Volumen von 30% Dextranlösung wurde dem Homogenisat zugegeben. Es wurde zweimal bei 3.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet, welches die Gefäße enthielt, wurde in WBB resuspendiert und große Gefäße wurden manuell durch harsches Pipetieren der Lösung aufgebrochen. Vakuumfiltration durch 60 µm-Membranen (SEFAR, Schweiz) wurde eingesetzt um große Gefäße von den Kapillaren zu trennen. Nach kombinierter Behandlung mit Kollagenase/Dispase (HBSS, 10 mM HEPES, 0,15 µg/ml TCLK, 10 µg/ml DNase-I, 1 mg/ml Kollagenase/Dispase (Roche) wurde Einzelzellsuspension durch weiteres harsches Pipetieren der Lösung erreicht. Endothelzellen wurden in Matrigel-beschichtete Transwellinserts eingebracht (0,4 µm Poren, Greiner Bio-One, Deutschland) mit einer Dichte von 120.000 Zellen pro Insert und wachsen gelassen auf einer unterstützenden Glialkultur.

**[0053]** Schwefelgelb wurde zur Bestimmung des parazellulären Flusses während der Assays verwendet. Das Kulturmedium des abluminalen Kompartments wurde ersetzt mit einer Lösung, welche 10 ng Aβ42 enthielt (1,6 nM Endkonzentration). Anschließend wurden Proben aus dem luminalen Kompartiment nach 2 h, 6 h bzw. 24 h entnommen und der Aβ-Gehalt wurde mit ELISA bestimmt (TK42-highsense, TGC, Schweiz). Die Transportrate wurde wie bei Coisne et al. beschrieben bestimmt (Coisne, C. et al. Mouse syngenic in vitro blond-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in zerebral endothelium. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85, 734–746 (2005)).

#### ELISA-Statistiken

**[0054]** Der Lilliefors godness-of-fit-Test ( $\alpha = 0,05$ ) wurde auf die ELISA-Daten und auf die log-transformierten ELISA-Daten angewandt, um zwischen der Annahme von normal verteilten Probandaten und

der Annahme log-normal verteilter Probandaten zu unterscheiden. Trotz der geringen Probengröße wurde für beiden Datensätze die Nullhypothese abgelehnt für 5 von 44 Proben. In Übereinstimmung mit der Beobachtung überwiegend positiven Versatzes (skew) und strikt positiver Probandaten wurde die Annahme normal verteilter Daten verworfen. Mittelwerte und Konfidenzintervalle wurden unter der Annahme einer zugrunde liegenden log-normal Verteilung berechnet. Der Wilcoxon-Rank-sum-Test wurde angewandt, um die ELISA-Daten der verschiedenen Mausstränge für jeden Zeitpunkt zu vergleichen.

## ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

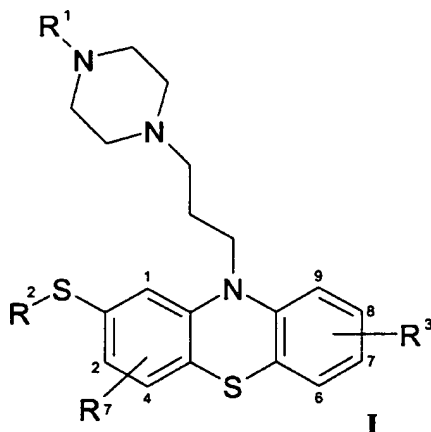
### Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Coisne, C. et al. Mouse syngenic in vitro blond-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in zerebral endothelium. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 85, 734–746 (2005) [\[0052\]](#)
- Coisne, C. et al. Mouse syngenic in vitro blond-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in zerebral endothelium. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 85, 734–746 (2005) [\[0053\]](#)



### Patentansprüche

1. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine gemäß der allgemeinen Formel I



wobei die Reste

R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylgruppen sind, welche unabhängig voneinander gegebenenfalls einen weiteren Substituenten ausgewählt aus Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio-, Alkylthio-Gruppe und Halogenatom aufweisen, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen und der Rest R<sup>3</sup> sich an einer der Positionen 6–9 des Phenothiazin-Ringsystems befindet und ein Wasserstoffatom oder eine Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthio-Gruppe oder ein Halogenatom ist, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen, oder eine NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>- oder OR<sup>6</sup>-Gruppe ist, wobei R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe und der Rest R<sup>2</sup> sich an einer der Positionen 1, 2 oder 4 des Phenothiazin-Ringsystems befindet und ein Wasserstoffatom oder eine Alkyl-, Aryl-, Acyl-, Acetyl-, Amino-, Nitro-, Sulfonyl-, Hydroxyl-, Alkoxy-, Aryloxy-, Arylthio- oder Alkylthio-Gruppe oder ein Halogenatom ist, wobei die jeweiligen Alkylgruppen gegebenenfalls mindestens ein weiteres Halogenatom aufweisen, oder eine NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>- oder OR<sup>10</sup>-Gruppe ist, wobei R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> und R<sup>10</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff und C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe, zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

2. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Halogenatom/die Halogenatome ausgewählt sind aus Fluor und Chlor.

3. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig voneinander eine C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylgruppe sind.

4. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste R<sup>3</sup> und R<sup>7</sup> Wasserstoff sind.

5. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Rest R<sup>1</sup> eine Methylgruppe, der Rest R<sup>2</sup> eine Ethylgruppe und die Reste R<sup>3</sup> und R<sup>7</sup> Wasserstoff sind.

6. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass weitere Wirkstoffe, vorzugsweise 1-Benzhydrylpiperazine, höchst bevorzugt 1-Benzhydryl-4-cinnamylpiperazin, zugesetzt werden.

7. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung eine beta-Amyloidopathie, insbesondere Alzheimer Demenz, ist.

8. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung die Huntington'sche Erkrankung ist.

9. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung eine alpha-Synucleinopathie, insbesondere Parkinson'sche Erkrankung oder Lewy-Körperchen-Demenz, ist.

10. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung eine Prion-Erkrankung, insbesondere Creutzfeld-Jacob-Erkrankung oder Fatale Familiäre Insomnie, ist.

11. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung eine Tauopathie, insbesondere Cortico-Basale-Degeneration, Steel-Richardson-Olszewski-Syndrom, Alzheimer Demenz oder Pick'sche Erkrankung, ist.

12. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung eine Frontotemporale Degeneration, insbesondere Ubiquitin-positive Degeneration, TDP43-positive Degeneration oder für Ubiquitin- und TDP43-negative Degeneration, ist.

13. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung amyotrophe Lateralsklerose ist.

14. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative Erkrankung spinocerebelläre Ataxie oder spastische Paraparese ist.

15. 2-(R<sup>2</sup>-Thio)-10-[3-(4-R<sup>1</sup>-piperazin-1-yl)propyl]-10H-phenothiazine zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die neurodegenerative/neuroimmunologische Erkrankung Multiple Sklerose oder verwandte Syndrome, insbesondere ADEM oder Devic-Syndrom, ist.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abb. 1a

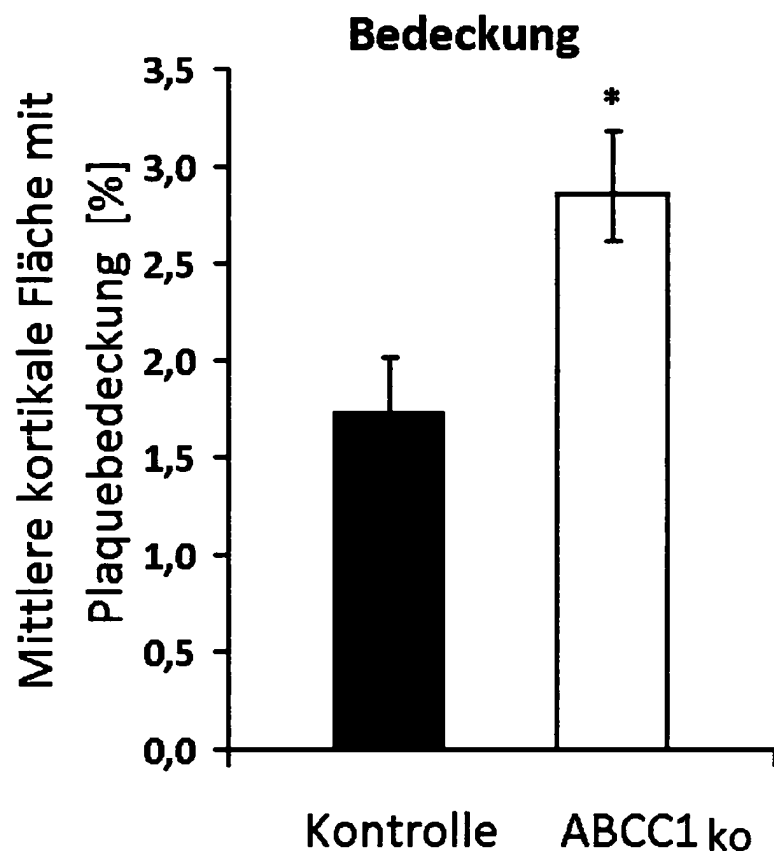


Abb. 1b

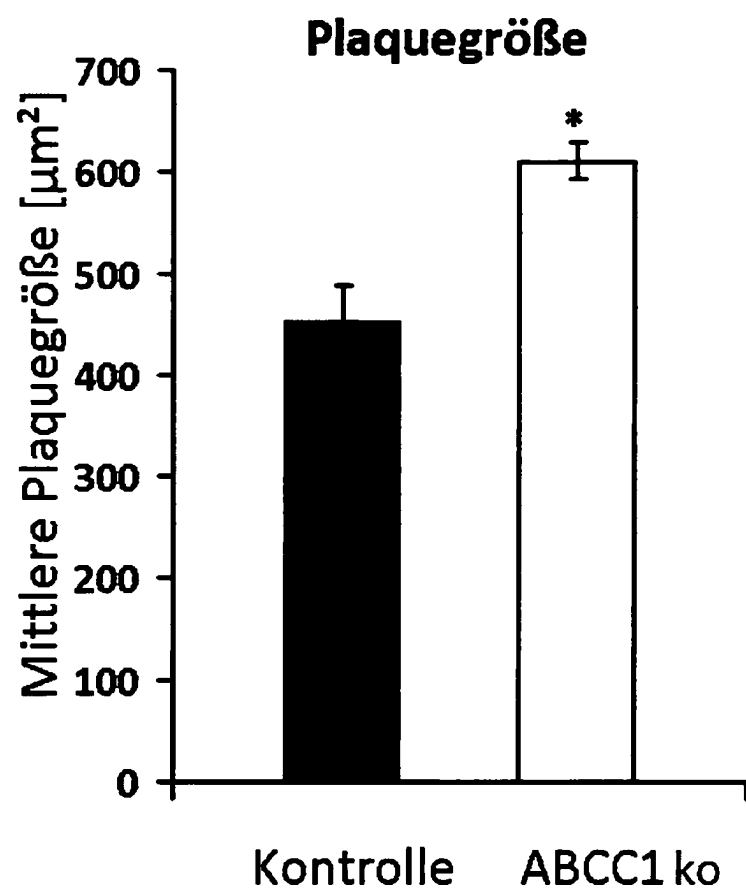
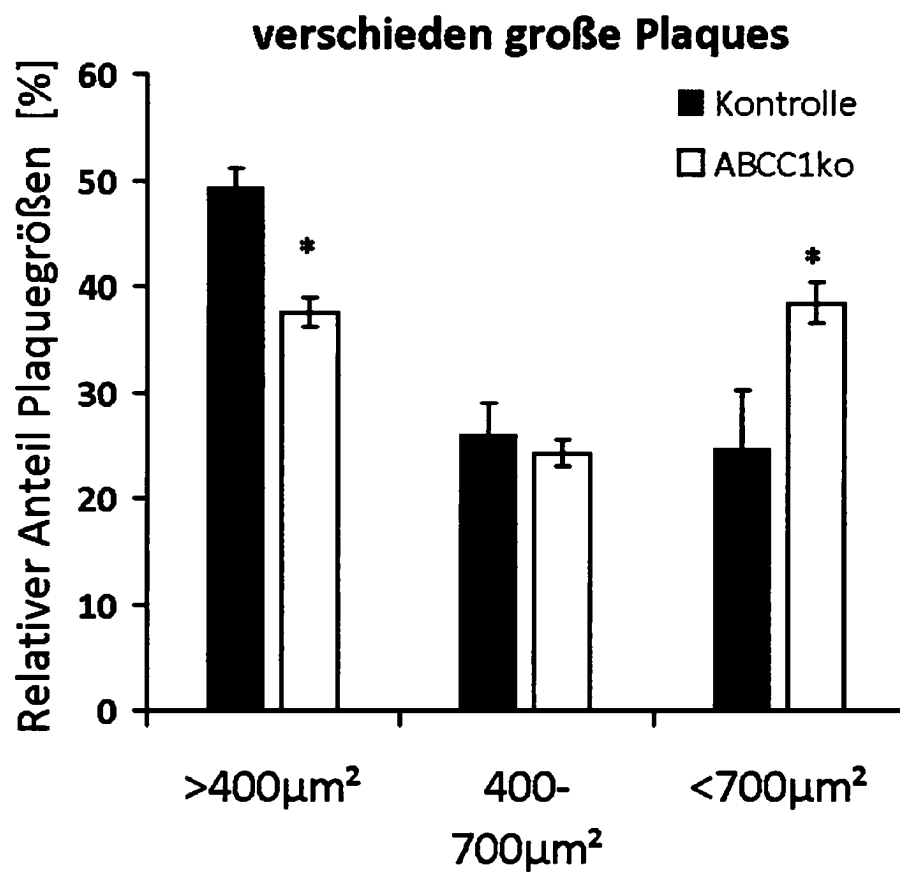


Abb. 1c



**Abb. 1d**

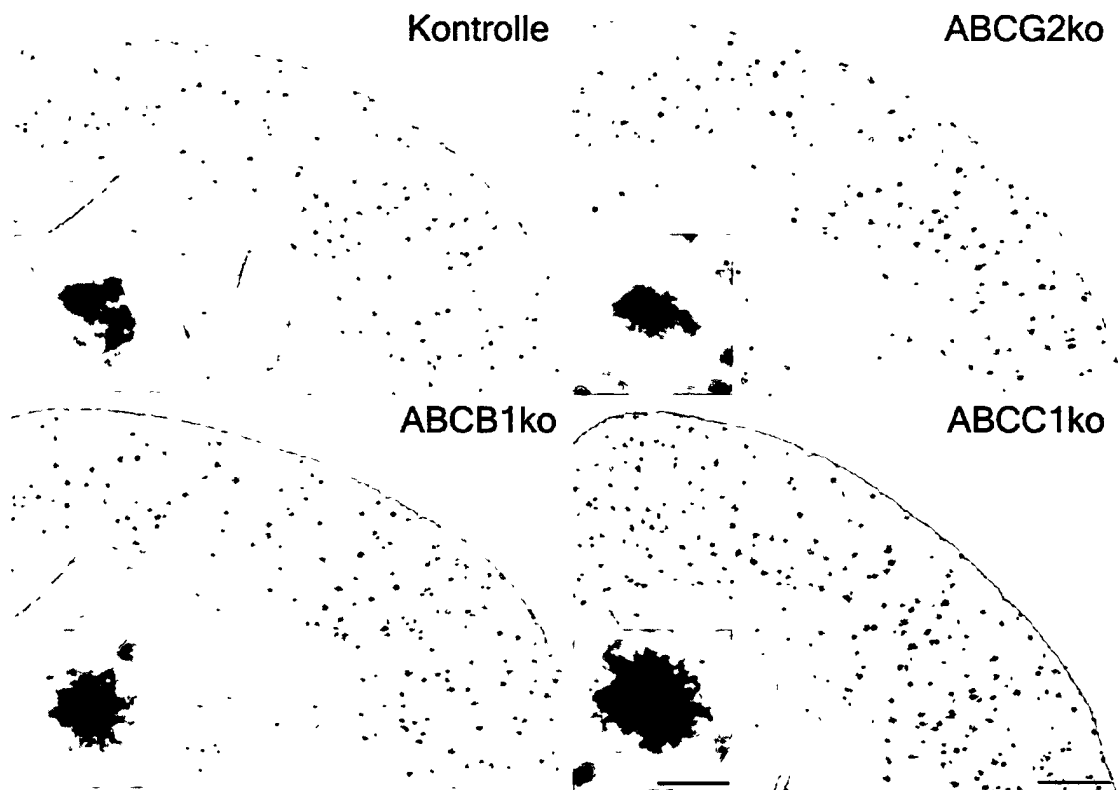


Abb. 2a

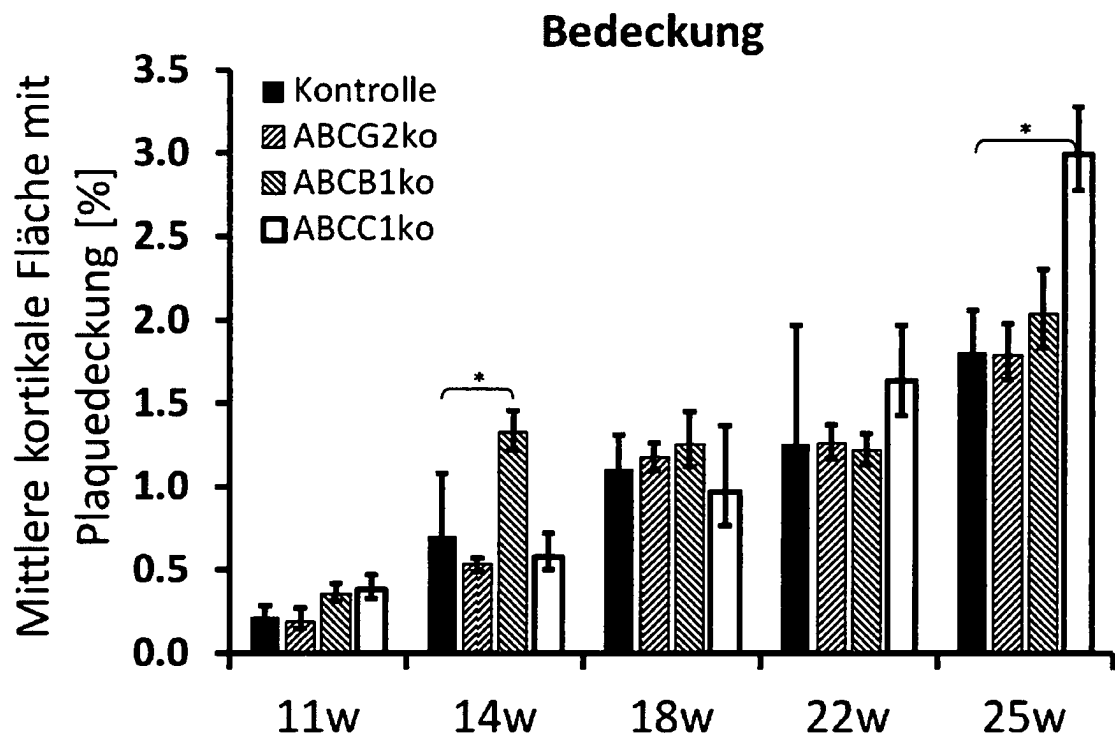




Abb. 2b

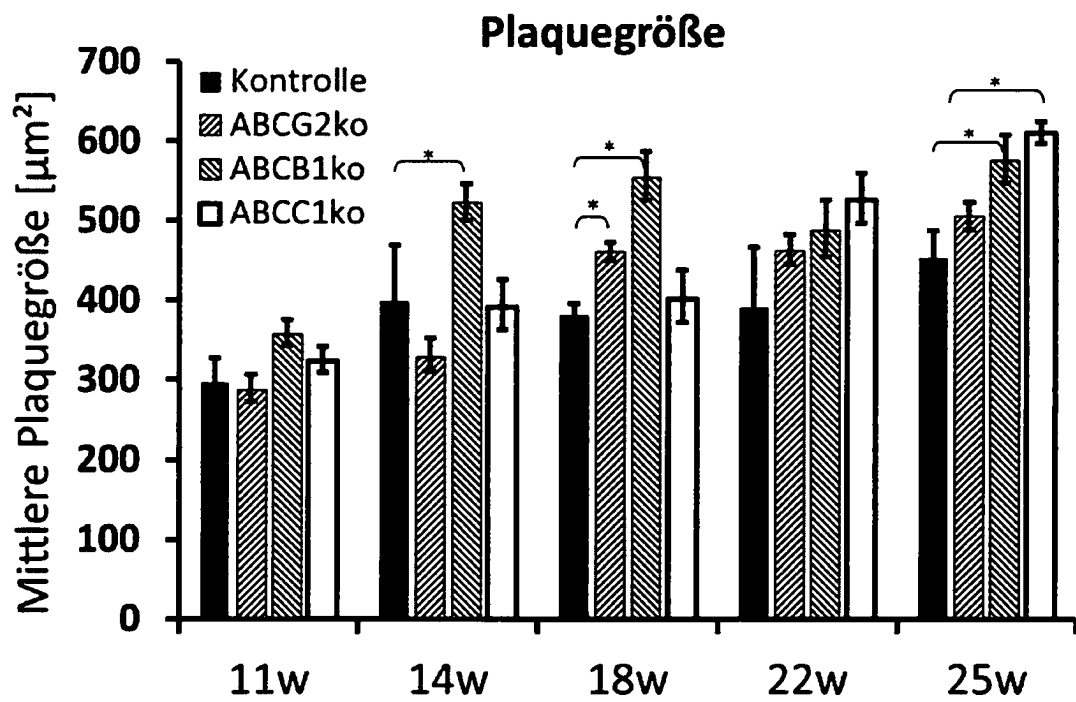


Abb. 2c

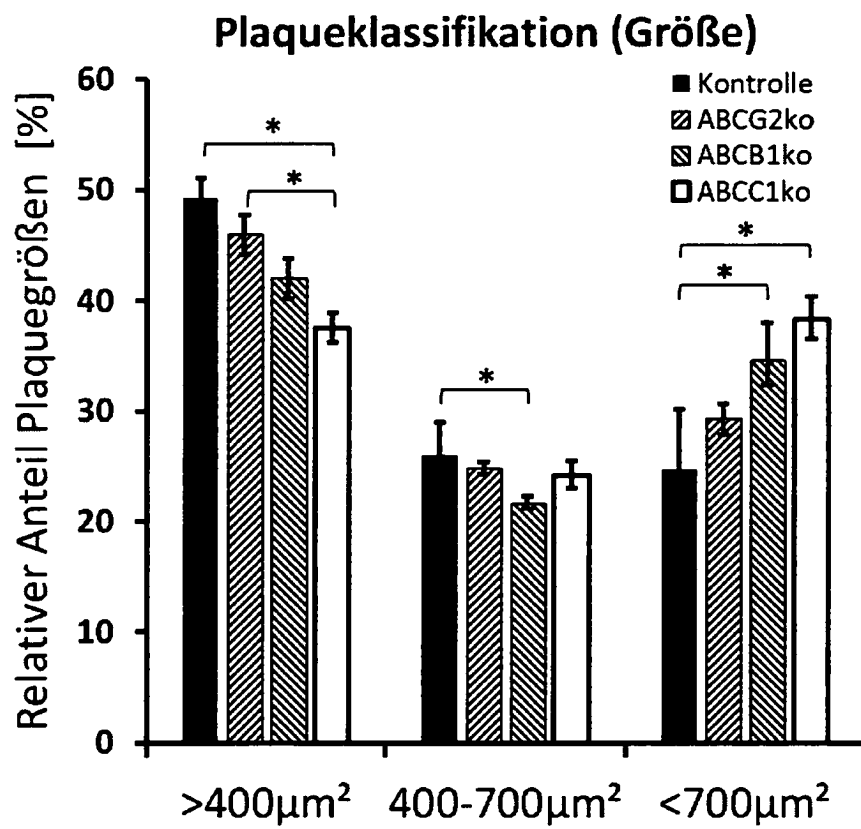


Abb. 3a

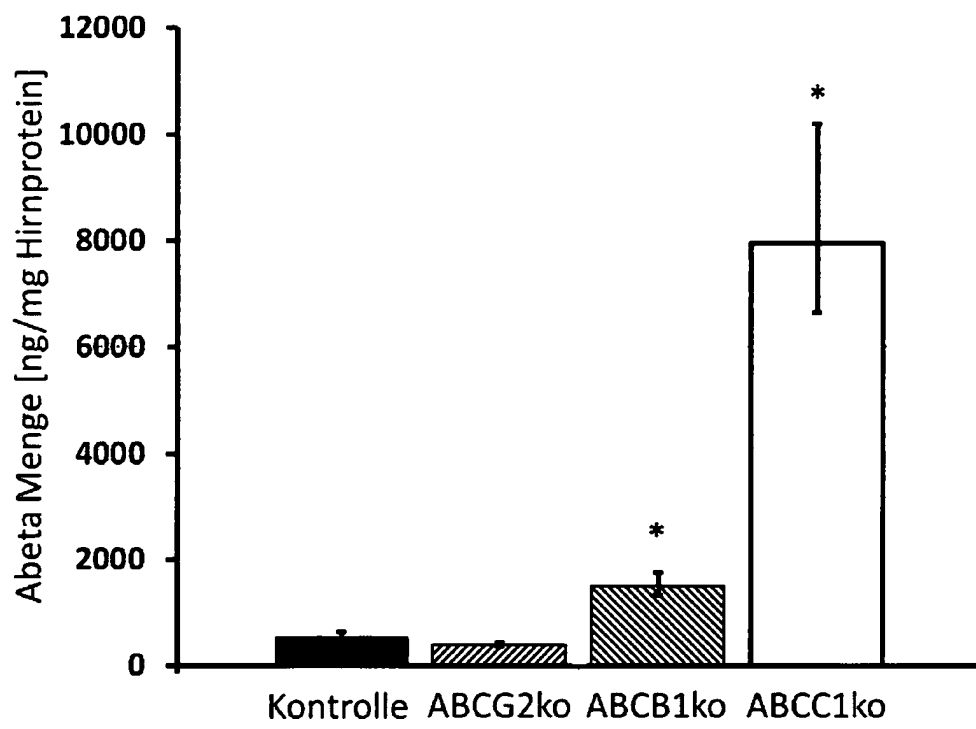


Abb. 3b

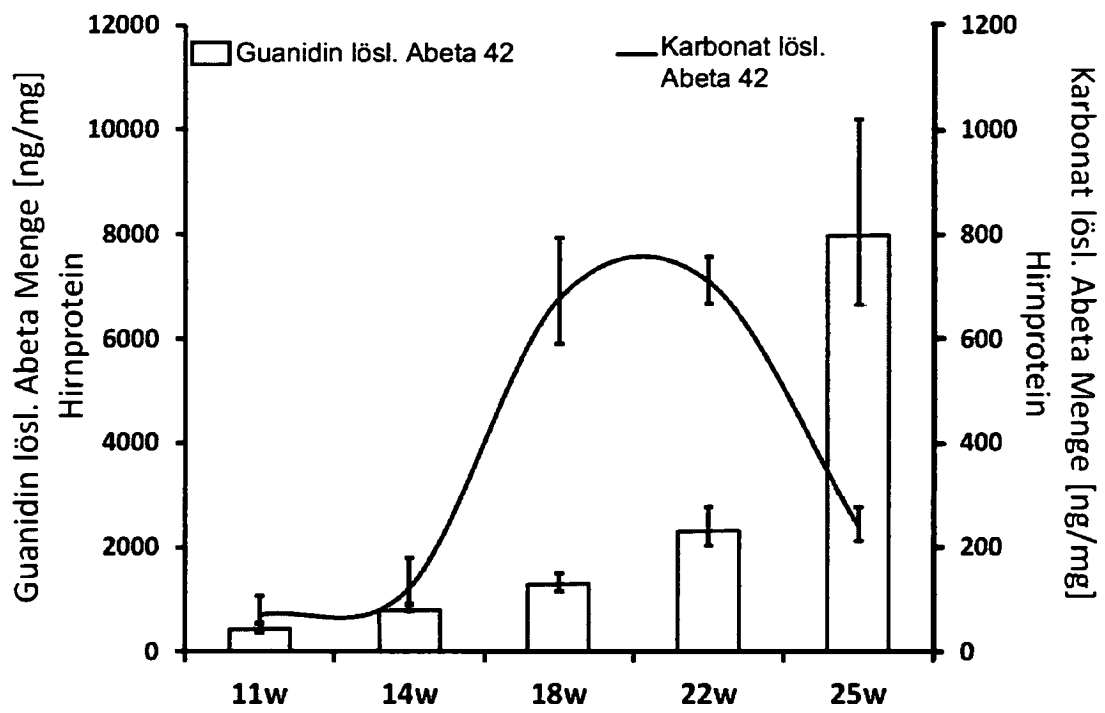


Abb. 3c

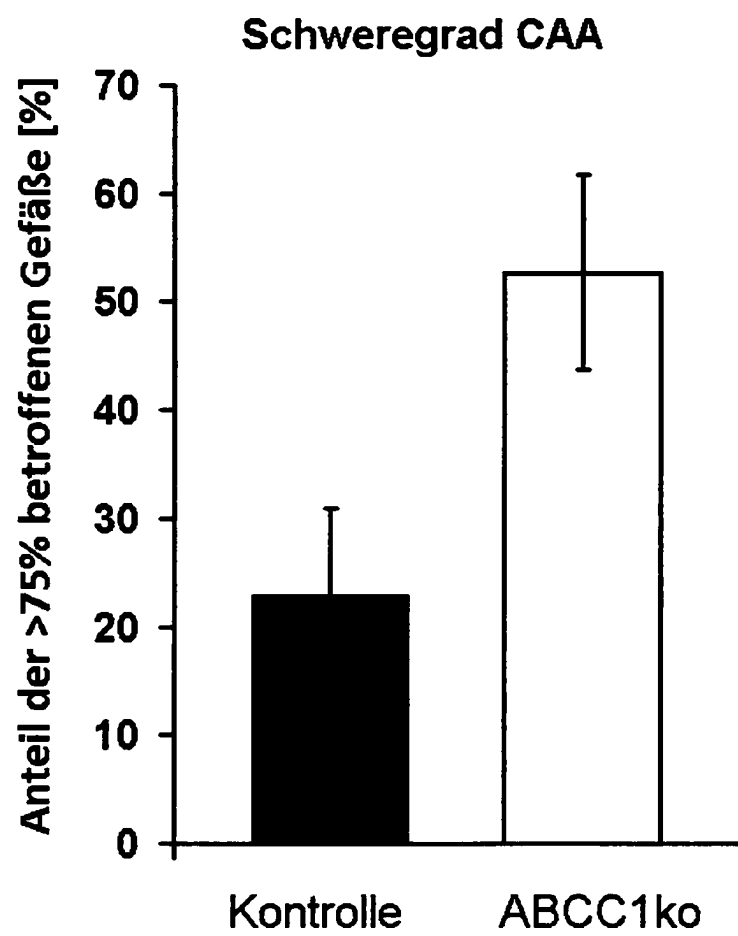


Abb. 3d

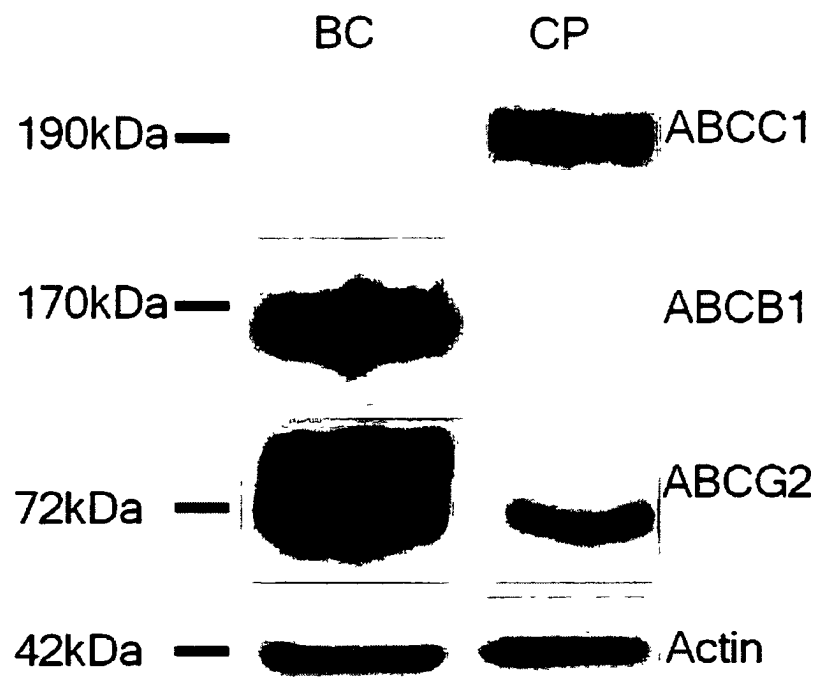


Abb. 3e

