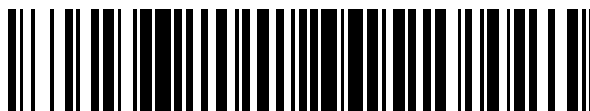


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 890**

51 Int. Cl.:

C07D 281/10 (2006.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13164051 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2653466**

54 Título: **Agentes para el tratamiento de trastornos que implican la modulación de los receptores rianodina**

30 Prioridad:

18.04.2012 US 201261625890 P

11.05.2012 EP 12167732

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

25.02.2015

73 Titular/es:

LES LABORATOIRES SERVIER (50.0%)

35, rue de Verdun

92284 Suresnes Cedex, FR y

ARMGO PHARMA, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

YAN, JIAMING;

BELVEDERE, SANDRO;

WEBB, YAEL;

BERTRAND, MARC y

VILLENEUVE, NICOLE

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 529 890 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

Agentes para el tratamiento de trastornos que implican la modulación de los receptores rianodina

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a derivados de 1,4-benzotiazepina y a su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados a los receptores rianodina (RyR) que regulan el funcionamiento del canal de calcio en las células. La invención también describe composiciones farmacéuticas que incluyen estos compuestos y sus usos para tratar enfermedades y afecciones asociadas a RyR, en particular trastornos cardíacos, musculoesqueléticos y del sistema nervioso central (SNC).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El retículo sarcoplasmático (RS) es una estructura de las células que desempeña la función, entre otras, de almacén especializado de calcio intracelular (Ca^{2+}). Los RyRs son canales en el RS que se abren y cierran para regular la liberación de Ca^{2+} del RS en el citoplasma intracelular de la célula. La liberación de Ca^{2+} del RS en el citoplasma aumenta la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. La probabilidad de apertura de RyRs se refiere a la probabilidad de que un RyR esté abierto en cualquier momento dado y, en consecuencia, sea capaz de liberar Ca^{2+} en el citoplasma desde el RS.

Existen tres tipos de RyR, todos ellos altamente homólogos: RyR1, RyR2 y RyR3. El RyR1 se encuentra predominantemente en los músculos esqueléticos y en otros tejidos, el RyR2 se encuentra predominantemente en el corazón y en otros tejidos y el RyR3 se encuentra en el cerebro y en otros tejidos. El RyR es un tetrámero. Parte del complejo de RyR está formada por cuatro polipéptidos de RyR en asociación con cuatro proteínas de unión FK506 (FKBP) (calstabinas), específicamente FKBP12 (calstabilina 1) y FKBP12.6 (calstabilina 2). La calstabilina 1 se une a RyR1 y RyR3, mientras que la calstabilina 2 se une a RyR2. Las calstabinas se unen a los RyR (una molécula por subunidad de RyR), estabilizan la función de los RyR, facilitan la formación de pasos acoplados entre RyR adyacentes y previenen la activación anormal (fuga de Ca^{2+}) del canal mediante la estabilización del estado cerrado del canal.

Receptor de rianodina 2 y enfermedades cardíacas

En el músculo estriado cardíaco, el RyR2 es el canal principal de liberación de Ca^{2+} requerido para el acoplamiento de excitación-contracción (EC) y la contracción muscular. Durante el acoplamiento de EC, la despolarización de la membrana celular del músculo cardíaco durante la fase cero del potencial de acción activa los canales de Ca^{2+} gobernados por voltaje. La afluencia de Ca^{2+} a través de los canales abiertos gobernados por voltaje inicia a su vez la liberación de Ca^{2+} del RS a través de RyR2. Este proceso es conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . Después, la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} mediada por RyR2 activa las proteínas contráctiles en la célula cardíaca, lo que resulta en la contracción del músculo cardíaco.

La fosforilación de RyR2 por proteína A quinasa (PKA) es una parte importante de la respuesta "luchar o huir" que incrementa el aumento de acoplamiento de EC cardíaco aumentando la cantidad de Ca^{2+} liberado para un desencadenante dado. Esta vía de transmisión de señales proporciona un mecanismo mediante el cual la activación del sistema nervioso simpático (SNS), en respuesta a una tensión, conduce a un mayor rendimiento cardíaco. La fosforilación de RyR2 por PKA produce una disociación parcial de calstabilina 2 del canal, lo que conduce a su vez a una mayor probabilidad de apertura y una mayor liberación de Ca^{2+} del RS en el citoplasma intracelular.

La insuficiencia cardíaca (IC) se caracteriza por un estado hiperadrenérgico constante en el que los niveles de catecolamina sérica están crónicamente elevados. Una consecuencia de este estado hiperadrenérgico crónico es la hiperfosforilación persistente de RyR2 por PKA, de modo que 3-4 de los cuatro Ser2808 en cada canal de RyR2 homotetramérico están fosforilados crónicamente (Marx SO, y col. *Cell*, 2000; 101 (4): 365-376). En particular, la hiperfosforilación de RyR2 por PKA está asociada con el agotamiento de la subunidad de estabilización de canal calstabilina 2 del complejo macromolecular del canal RyR2. El agotamiento de la calstabilina conduce a una "fuga" de Ca^{2+} de RS diastólica del complejo de RyR, que contribuye a una contractilidad deficiente (Marx y col., 2000). Debido a la activación de corrientes despolarizantes hacia el interior, esta "fuga" de Ca^{2+} de RS diastólica también está asociada con arritmias cardíacas fatales (Lehnart y col., *J Clint Invest*. 2008; 118 (6): 2230- 2245). De hecho, ratones modificados genéticamente con RyR2 carente de sitio de fosforilación por OKA están protegidos contra la progresión de la IC después de infarto de miocardio (IM) (Wehrens XH y col. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103 (3): 511- 518). Además, la

hiperfosforilación crónica de RyR2 por PKA en la IC está asociada con la remodelación del complejo macromolecular de RyR2, que incluye el agotamiento de fosfatasa (Marx y col. 2000) PP1 y PP2a (influyendo negativamente en la desfosforilación de Ser2808) y la fosfodiesterasa de tipo 4 específica de AMPc (PDE4D3) del complejo de RyR2. El agotamiento de PDE4D3 del complejo de RyR2 provoca un aumento constante de niveles de AMPc locales (Lehnart SE y col., *Cell* 2005; 123 (1): 25- 35). Por consiguiente, la fuga de Ca^{2+} de RS diastólica contribuye a la progresión de la IC y arritmias. Además, un informe reciente ha demostrado que ratones *knock-in* RyR2-S2808D+/+ (ácido aspártico en sustitución de serina 2808), que imitan la hiperfosforilación de RyR2 por PKA constitutiva, muestran un agotamiento de calstabilina 2 y fuga de RyR2. Los ratones RyR2-S2808D+/+ desarrollan cardiomiopatía dependiente de la edad y muestran una oxidación y nitrosilación de RyR2 elevada, un contenido reducido de almacenamiento de Ca^{2+} en RS y un aumento de la fuga de Ca^{2+} de RS diastólica. Después de infarto de miocardio, los ratones RyR2-S2808D+/+ presentan un aumento de la mortalidad en comparación con ratones WT de la misma camada. Un tratamiento con S107, un derivado de 1,4-benzotiazepina que estabiliza interacciones de RyR2-calstabilina 2 (WO 2007/024717), inhibió la fuga de Ca^{2+} de RS diastólica mediada por RyR2 y redujo la progresión de la IC tanto en ratones WT como en ratones RyR2-S2808D+/+ (Shan y col., *J Clin Invest.* 1 de diciembre de 2010; 120 (12): 4375- 87).

Además, el RyR2 contiene aproximadamente 33 residuos tiol libres que lo hacen altamente sensible al estado redox celular. La oxidación de cisteína facilita la apertura de RyR y la fuga de Ca^{2+} de RS. Shan y col., 2010, demostraron que la oxidación y nitrosilación de RyR2 y la disociación de la subunidad de estabilización calstabilina 2 de RyR2 induce la fuga de Ca^{2+} de RS.

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) es un trastorno congénito en individuos con corazones estructuralmente normales. Se han asociado más de 50 mutaciones de RyR2 distintas con la TVPC. Los pacientes de TVPC sufren síncope y muerte súbita cardíaca (MSC) desde la niñez hasta la edad adulta, y antes de los 35 años la mortalidad alcanza el 50%. Los individuos con TVPC sufren arritmias ventriculares cuando hacen ejercicio, pero no desarrollan arritmias en reposo. Las mutaciones de RyR2 asociadas con la TVPC resultan en canales de RyR2 "con fugas" debido a la disminución de la unión de la subunidad calstabilina 2 (Lehnart y col., 2008). Los ratones heterocigóticos para la mutación R2474S en RyR2 (ratones RyR2-R2474S) sufren convulsiones tónico-clónicas generalizadas espontáneas (que se producen en ausencia de arritmias), arritmias ventriculares inducidas por ejercicio y MSC. Un tratamiento con S107 aumentó la unión de calstabilina 2 al canal RyR2-R2474S mutante, inhibió las fugas en el canal, previno arritmias cardíacas y elevó el umbral de convulsiones (Lehnart y col., 2008).

Receptor de rianodina 1 y enfermedades musculoesqueléticas

La contracción de los músculos esqueléticos se activa mediante la liberación de Ca^{2+} de RS a través de RyR1. La despolarización de la membrana de conducto transversal (T) activa el sensor de voltaje de receptor de dihidropiridina (Cav1.1), que a su vez activa canales de RyR1 a través de una interacción directa de proteína-proteína, provocando la liberación de almacenes de Ca^{2+} de RS. El Ca^{2+} se une a la troponina C permitiendo que se produzca la formación de puentes cruzados actina-miosina y el acortamiento del sarcómero.

En condiciones de tensión muscular prolongada (por ejemplo durante carreras de maratón) o de una enfermedad como la insuficiencia cardíaca, ambos casos caracterizados por la activación crónica del SNS, resulta afectada la función de los músculos esqueléticos, posiblemente debido a una alteración del acoplamiento de EC. En particular se reduce la cantidad de Ca^{2+} liberado del RS durante cada contracción muscular, se pueden producir eventos de liberación anormal de Ca^{2+} y la reabsorción de Ca^{2+} se ralentiza (Reiken, S, y col., 1003. *J. Cell Biol.* 160: 919-928). Estas observaciones sugieren que los efectos nocivos de la activación crónica del SNS en los músculos esqueléticos se pueden deber, al menos en parte, a defectos en la transmisión de señales de Ca^{2+} .

El complejo macromolecular de RyR1 consiste en un tetrámero de la subunidad RyR1 de 560 kDa que forma una estructura para proteínas que regulan la función de canal, incluyendo PKA y la fosfodiesterasa 4D3 (PDE4D3), proteína fosfatasa 1 (PP1) y calstabilina 1. La proteína de anclaje de A-quinasa (AKAPm) dirige la PDE4D3 a RyR1, mientras que la espinofilina dirige la PP1 al canal (Marx y col. 2000; Brillantes y col., *Cell*, 1994, 77, 513-523; Bellinger y col., *J. Clin. Invest.* 2008, 118, 445-53). Las subunidades catalíticas y reguladoras de PKA, PP1 y PDE4D3 regulan la fosforilación de RyR1 mediada por PKA en Ser2843 (Ser2844 en el ratón). Se ha demostrado que la fosforilación de RyR1 mediada por PKA en Ser2844 aumenta la sensibilidad del canal al Ca^{2+} citoplasmático, reduce la afinidad de unión de la calstabilina 1 por el RyR1 y desestabiliza el estado cerrado del canal (Reiken y col., 2003; Marx, S.O. y col., *Science*, 1998, 281: 818-821). Se ha informado de que las concentraciones de calstabilina 1 en los músculos esqueléticos son de aproximadamente 200 nM y que la fosforilación de RyR1 por PKA reduce la afinidad de unión de la calstabilina 1 por el RyR1 de aproximadamente 100-200 nM a más de 600 nM. Por consiguiente, bajo condiciones fisiológicas, la reducción de la afinidad de unión de la calstabilina 1 por el RyR1, que resulta de la fosforilación de RyR1 por PKA en Ser2843, es suficiente para reducir sustancialmente la cantidad de calstabilina 1

5 presente en el complejo de RyR1. La hiperfosforilación crónica de RyR1 por PKA en Ser2843 (definida como fosforilación por PKA de 3 o 4 de los 4 sitios Ser2843 de PKA presentes en cada homotetrámero de RyR1) conduce a canales "con fugas" (es decir, canales tendentes a abrirse en reposo), lo que contribuye a la disfunción de los músculos esqueléticos asociada con estados hiperadrenérgicos persistentes, como los que se producen en individuos con insuficiencia cardíaca (Reiken y col., 2003).

Además se ha informado de que la regulación de RyR1 mediante modificaciones postraduccionales diferentes a la fosforilación, como la nitrosilación de grupos sulfhidrilo libres en residuos de cisteína (S-nitrosilación), así como la oxidación de canal, aumenta la actividad de canal de RyR1. Se ha demostrado que tanto la S-nitrosilación como la oxidación de RyR1 reducen la unión de calstabilina 1 a RyR1.

10 Bellinger y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008, 105 (6): 2198- 2002) han notificado previamente que, durante la realización de ejercicios extremos en ratones y humanos, el RyR1 es hiperfosforilado progresivamente por PKA, S-nitrosilado y desprovisto de PDE4D3 y calstabilina 1, lo que conduce a canales "con fugas" que provocan una disminución de la capacidad de ejercicio en ratones. Un tratamiento con S107 previno el agotamiento de calstabilina 1 del complejo de RyR1, mejoró la generación de fuerza y la capacidad de

15 ejercicio y redujo la actividad de calpaína proteasa neutra dependiente de Ca^{2+} y los niveles de creatinina quinasa en plasma.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las principales enfermedades genéticas infantiles letales. La DMD está ligada al cromosoma X, afecta a 1 de cada 3.500 nacimientos masculinos y conduce normalmente a la muerte antes de ~30 años de edad por insuficiencia respiratoria o cardíaca. Las mutaciones de distrofina asociadas con la DMD conducen a una pérdida completa de la proteína distrofina, alterando así

20 la unión entre el citoesqueleto de subsarcolema y la matriz extracelular. Esta unión es esencial para proteger y estabilizar el músculo frente a lesiones inducidas por contracción. Actualmente no existe cura para la DMD y la mayor parte de los tratamientos clínicos son paliativos. Algunas intervenciones emergentes en ensayos clínicos en Fase I/II consisten en salto de exón, inhibición de misotatina y regulación de utrofina. No obstante, el suministro sistémico, el mantenimiento de salto de exón y la regulación de utrofina presentan problemas. Además, en ensayos clínicos en Fase I/II, la inactivación de misotatina para aumentar el tamaño muscular no

25 mostró ningún aumento de la fuerza muscular o mejora de su función. La inestabilidad sarcolémica debida a mutaciones de distrofina tiene un efecto en cascada. Uno de los principales efectos es un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, que conduce a la activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} (calpains). Otro efecto es la inflamación y una actividad elevada de NOSi, que puede provocar la oxidación/nitrosilación de proteínas, lípidos y ADN. La patología muscular DMD es progresiva y supera con mucho la inestabilidad del sarcolema. Por consiguiente, la patología es coherente con la inestabilidad del sarcolema que aumenta la susceptibilidad a lesiones. Recientemente se ha demostrado que la oxidación o nitrosilación excesiva de RyR1 puede alterar la interacción de calstabilina 1 con el complejo de RyR1, conduciendo a "fugas" de RyR1 y

30 debilidad muscular en un modelo de distrofia muscular en ratones (*mdx*), y que el tratamiento con S107 aumenta los índices de función muscular en este modelo de ratón (Bellinger, A. y col., 2009, *Nature Medicine*, 15:325-330).

La pérdida de masa muscular y fuerza relacionada con la edad (sarcopenia) contribuye a una discapacidad y aumento de la mortalidad. Andersson, D. y col., (*Cell Metab.* 3 de agosto de 2011; 14 (2): 196- 207) han

40 notificado que el RyR1 de ratones viejos (24 meses) está oxidado, cisteína-nitrosilados y desprovistos de calstabilina 1, en comparación con el RyR1 de adultos más jóvenes (3-6 meses). Esta remodelación del complejo de canales de RyR1 resulta en canales "con fugas" con una mayor probabilidad de apertura, lo que conduce a una fuga de calcio intracelular en los músculos esqueléticos. Un tratamiento de ratones viejos con S107 estabilizó la unión de calstabilina 1 con RyR1, redujo la fuga de calcio intracelular, disminuyó las

45 especies de oxígeno reactivo (ERO) y aumentó la liberación de Ca^{2+} tetánico, la fuerza específica del músculo y la capacidad de ejercicio.

Las publicaciones de patente internacional PCT WO 2005/094457, WO 2006/101496 y WO 2007/024717 dan a conocer derivados de 1,4-benzotiazepina y su utilización en el tratamiento de trastornos cardíacos, trastornos musculoesqueléticos y trastornos cognitivos, entre otros.

50

La publicación de patente internacional PCT WO 2008/060332 se refiere al uso de derivados de 1,4-benzotiazepina para el tratamiento de fatiga muscular en sujetos que padecen patologías tales como distrofia muscular, o en sujetos que padecen fatiga muscular debido a ejercicio constante, prolongado y/o intenso, o estrés crónico.

55 La publicación de patente internacional PCT WO 2008/021432 se refiere al uso de derivados de 1,4-benzotiazepina para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, trastornos y afecciones que afectan al sistema nervioso.

La publicación de patente internacional PCT WO 2012/019076 se refiere al uso de derivados de 1,4-benzotiazepina para el tratamiento y/o la prevención del daño por isquemia/reperfusión cardíaca. Fauconnier y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(32): 13258-63 han notificado que la fuga de RyR mediada por activación de caspasa-8 conduce a lesión ventricular izquierda después de isquemia-reperfusión miocárdica, y que un tratamiento con S107 inhibió la fuga de Ca^{2+} de RS, redujo las arritmias ventriculares, el tamaño del infarto y la remodelación ventricular izquierda 15 días después de la reperfusión.

La publicación de patente internacional WO 2012/019071 se refiere al uso de derivados de 1,4-benzotiazepina para el tratamiento y/o la prevención de la sarcopenia.

La publicación de patente internacional WO 2012/037105 se refiere al uso de derivados de 1,4-benzotiazepina para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades y trastornos neuronales inducidos por estrés.

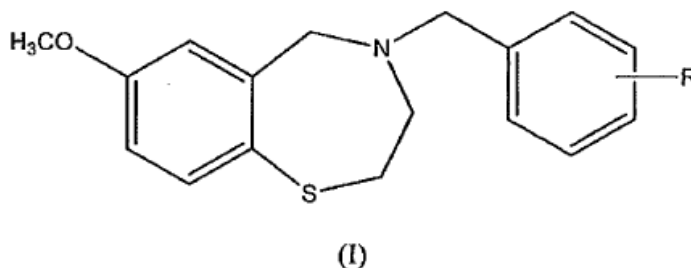
Existe la necesidad de identificar nuevos compuestos eficaces para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con RyR, incluyendo enfermedades y trastornos cardíacos y musculoesqueléticos. Más particularmente, sigue existiendo la necesidad de identificar nuevos agentes que puedan ser utilizados para tratar trastornos asociados con RyR, por ejemplo mediante la reparación de la fuga en canales de RyR y el aumento de la unión de calstabinas con RyR fosforilados/oxidados/nitrosilados por PKA, y con RyR mutantes que en otro caso tienen una afinidad reducida por las calstabinas o que no se unen con éstas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevos derivados de 1,4-benzotiazepina y sus sales farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son estabilizadores del canal de calcio del receptor de rianodina (RyR), a veces denominados "Rycals®". La presente invención proporciona además métodos de utilización de estos compuestos para tratar enfermedades y trastornos asociados con RyR.

Los compuestos de la presente invención son una selección de los derivados de 1,4-benzotiazepina descritos en el documento WO 2007/024717. El documento WO 2007/024717 describe compuestos estructuralmente similares. Sin embargo, tal como se describe además aquí, se ha comprobado que estos compuestos son altamente inestables y en consecuencia su utilidad terapéutica como fármacos es limitada. Por consiguiente, el problema en que se basa la presente solicitud es proporcionar derivados de 1,4-benzotiazepina alternativos que no sólo sean farmacológicamente activos, sino que también presenten propiedades favorables tales como una alta estabilidad metabólica y, por tanto, sean adecuados como fármacos para el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas con el RyR, por ejemplo trastornos cardíacos, musculoesqueléticos y del sistema nervioso central (SNC). Sorprendentemente se ha descubierto que los compuestos de Fórmula (I) son estables y farmacológicamente activos, proporcionando así una solución técnica al problema en que se basa la presente invención.

Los compuestos de la presente invención están representados por la estructura de Fórmula (I):



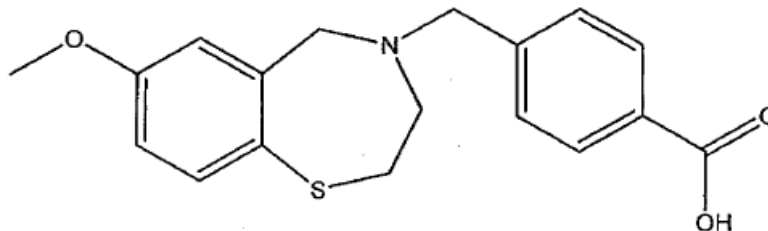
donde R es COOH;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de Fórmula (I) pueden estar presentes en forma de una sal con un ácido o una base farmacéuticamente aceptables. Estas sales se seleccionan preferentemente de entre el grupo consistente en sales de sodio, potasio, magnesio, hemifumarato, clorhidrato y bromhidrato, representando cada posibilidad una realización independiente de la presente invención. Una sal actualmente preferente es la sal de sodio. Otra sal actualmente preferente es la sal hemifumarato.

En algunas realizaciones específicas, el compuesto se selecciona de entre el grupo consistente en el compuesto 1, el compuesto 4 y el compuesto 6, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. A continuación se describen las estructuras de estos compuestos.

En una realización preferente, el compuesto está representado por la estructura de compuesto (1):



(1)

5

o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto 1 se emplea como compuesto de partida. Sin embargo, en otras realizaciones, el compuesto 1 se emplea en forma de sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptables. Esta sal se selecciona preferentemente de entre el grupo consistente en sales de sodio, potasio, magnesio, hemifumarato, clorhidrato y bromhidrato, representando cada posibilidad una realización independiente de la presente invención. Una sal actualmente preferente es la sal de sodio. Otra sal actualmente preferente es la sal hemifumarato.

10

La presente invención también proporciona métodos para la síntesis de compuestos de la invención y de sales de los mismos.

15

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más de los compuestos de la invención y al menos un aditivo o excipiente, por ejemplo materiales de carga, diluyentes, aglutinantes, disgregantes, tampones, colorantes, emulsionantes, agentes mejoradores de sabor, gelificantes, lubricantes, conservantes, solubilizadores, estabilizadores, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes de tonicidad, humectantes, emulsionantes, dispersantes, agentes hinchantes, retardadores, lubricantes, absorbentes y agentes de aumento de la viscosidad. Las composiciones se pueden presentar en formas farmacéuticas en cápsulas, gránulos, polvos, soluciones, sobres, suspensiones o pastillas.

20

La presente invención también proporciona métodos para tratar o prevenir diversos trastornos, enfermedades y afecciones asociados con RyR, como enfermedades y trastornos cardíacos, musculoesqueléticos, cognitivos, del SNC y neuromusculares, que incluyen la administración a un sujeto que requiere dicho tratamiento de una cantidad de un compuesto de Fórmula (I) o de una sal del mismo eficaz para prevenir o tratar un trastorno o enfermedad asociado con un RyR. La presente invención también proporciona un método para prevenir o tratar una fuga de RyR (incluyendo RyR1, RyR2 y RyR3) en un sujeto, que incluye la administración a dicho sujeto de una cantidad de un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo eficaz para prevenir o tratar una fuga en RyR.

25

Además, la presente invención proporciona un método para modular la unión de RyR y calstabinas en un sujeto, que incluye la administración a dicho sujeto de una cantidad de un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo eficaz para modular la cantidad de calstabinas unidas a RyR.

30

La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de Fórmula (I) para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos, enfermedades y afecciones asociados con RyR, como enfermedades y trastornos cardíacos, musculoesqueléticos, cognitivos/del SNC. En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula (I) para la producción de un medicamento para prevenir o tratar una fuga en RyR. En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de Fórmula (I) para la producción de un medicamento para modular la cantidad de calstabinas unidas a RyR.

35

Los métodos de la invención se pueden poner en práctica en un sistema *in vitro* (por ejemplo, células o tejidos cultivados) o *in vivo* (por ejemplo en un animal no humano o en un humano).

40

En algunas realizaciones, los compuestos de la invención se proporcionan en combinación con terapias de salto de exón, por ejemplo oligonucleótidos antisentido (OA) para aumentar el salto de exón en un ARNm de interés, por ejemplo el gen *DMD*, tal como se describe aquí adicionalmente. Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras.

45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1A Inmunotransferencia con anticuerpo de calstabilina 2 que muestra la unión de calstabilina 2 con RyR2 fosforilado por PKA en ausencia (-) o presencia del compuesto 1 100 nM. (+): calstabilina unida a RyR2 no fosforilado por PKA. Como control positivo se utiliza S36 (US 7,544,678).
- Figura 1B Inmunotransferencia con anticuerpo de calstabilina 2 que muestra la unión de calstabilina 2 con RyR2 fosforilado por PKA en ausencia (-) o presencia del compuesto 2, compuesto 3 o compuesto 4 100 nM. (+): calstabilina unida a RyR2 no fosforilado por PKA. Como control positivo se utiliza S36.
- Figura 1C Inmunotransferencia con anticuerpo de calstabilina 1 que muestra la unión de calstabilina 2 con RyR1 fosforilado por PKA en ausencia (Neg) o presencia de las concentraciones indicadas del compuesto 1 o el compuesto 4. (Pos): calstabilina unida a RyR1 no fosforilado por PKA. Como control positivo se utiliza S36.
- Figura 2 Figura 2A: Inmunotransferencia con anticuerpo de calstabilina 1 que muestra los niveles de calstabilina 1 en complejos de RyR1 inmunoprecipitados de lisados tibiales en ratones vehículo administrado (50:50 DMSO/PEG), isoproterenol (ISO) solo o isoproterenol junto con las concentraciones indicadas del compuesto 1 en bombas osmóticas. Como control se utiliza S36 en una concentración 3,6 mM. Figura 2B: cuantificación del % de calstabilina 1 que se une de nuevo a RyR1.
- Figura 3 Modelo de insuficiencia cardíaca crónica en ratas inducida mediante daño por isquemia-reperusión (I/R). Para el protocolo de I/R, la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) se ocluyó durante 1 hora.
- Figura 4 Volúmenes ventriculares izquierdos (LV) y fracción de eyección (EF) en ratas tratadas con el compuesto 1 a razón de 5 mg/kg/d (5 MK) o 10 mg/kg/d (10 MK) en agua de bebida frente a animales tratados con vehículo (H₂O) y sometidos a operación falsa. La insuficiencia cardíaca crónica se indujo mediante daño por isquemia-reperusión (I/R). La arteria LAD se ocluyó durante 1 hora; el tratamiento comenzó 1 semana después de la reperusión y continuó durante 3 meses. Los parámetros electrocardiográficos se obtuvieron después de 1, 2 o 3 meses de tratamiento. Figura 4A: volumen diastólico final LV; Figura 4B: volumen sistólico final LV; Figura 4C: EF. Figuras 4A y 4B: § $P < 0,001$ frente a operación falsa; * $P < 0,04$ frente a vehículo; † $P < 0,001$ frente a vehículo. Figura 4C: § $P < 0,001$ frente a operación falsa, † $P < 0,001$ frente a vehículo.
- Figura 5 Las Figuras 5 A-C representan el peso corporal (BW) (5A), el tamaño del infarto (5B) y el peso de LV (5C), y la Figura 5D representa el contenido de colágeno en ratas tratadas con el compuesto 1 a razón de 5 mg/kg/d (5 MK) y 10 mg/kg/día (10 MK) en agua de bebida frente a animales tratados con vehículo (H₂O) y sometidos a operación falsa. La insuficiencia cardíaca crónica se indujo mediante daño por isquemia-reperusión (I/R). La arteria LAD se ocluyó durante 1 hora; el tratamiento comenzó 1 semana después de la reperusión y continuó durante 3 meses. Los parámetros se midieron después de 3 meses de tratamiento. Figuras 5A-C: no significativas. Figura 5D: ††† $P < 0,001$ frente a operación falsa; * $P < 0,05$ frente a vehículo.
- Figura 6 Hemodinámica invasiva: presión sistólica ventricular izquierda (LV SP) (6A), dP/dtmax (6B); y dP/dtmin (6C) en ratas tratadas con el compuesto 1 a razón de 5 mg/kg/d (5 MK) y 10 mg/kg/día (10 MK) en agua de bebida frente a animales tratados con vehículo (H₂O) y sometidos a operación falsa. La insuficiencia cardíaca crónica se indujo mediante daño por isquemia-reperusión (I/R). La arteria LAD se ocluyó durante 1 hora; el tratamiento comenzó 1 semana después de la reperusión y continuó durante 3 meses. Los parámetros hemodinámicos se midieron después de 3 meses de tratamiento. Figura 6A: no significativa. Figura 6B: § $P < 0,05$ frente a vehículo. Figura 6C: † $P < 0,05$ frente a operación falsa; * $P < 0,05$ frente a vehículo. Figura 6C: † $P < 0,01$ frente a operación falsa; * $P < 0,05$ frente a vehículo.
- Figura 7 Concentraciones plasmáticas (μ M) del compuesto 1 en función de la hora del día.
- Figura 8 EF en ratas tratadas con el compuesto 1 o el compuesto A a razón de 5 mg/kg/d (5 MK) en agua de bebida frente a animales tratados con vehículo (H₂O) y sometidos a operación falsa. La arteria LAD se ocluyó durante 1 hora; el tratamiento comenzó 1 semana después de la reperusión y continuó durante 3 meses. Los parámetros electrocardiográficos se

obtuvieron después de 1, 2 o 3 meses de tratamiento. § $P < 0,001$ frente a operación falsa; * $P < 0,05$ frente a vehículo; † $P < 0,001$ frente a vehículo.

- 5
Figura 9 Efecto del compuesto 1 en la actividad física espontánea de ratones *mdx* y WT en comparación con controles tratados con vehículo (H₂O). $P < 0,001$ durante los días 1-19 actividad en ratones *mdx* que recibieron 10 y 50 mg/kg/día (dosis de objetivo) administrados en agua de bebida, en comparación con el control de vehículo.
- 10
Figura 10 Relación fuerza específica-frecuencia del músculo EDL. (A) ratones *mdx* tratados con el compuesto 1 (5, 10 y 50 mg/kg/d (dosis de objetivo)) administrado en agua de bebida, en comparación con controles tratados con vehículo (H₂O) (n = 5). $p < 0,05$ para la dosis de 50 mg/kg/d con frecuencias de 150 Hz y superiores. (B) WT, C57BL/6, ratones tratados con el compuesto 1 (50 mg/kg/d (dosis de objetivo)) administrado en agua de bebida, en comparación con controles tratados con vehículo (H₂O) (n = 4).
- 15
Figura 11 Peso corporal medio (12A) y consumo medio de agua (12B) de ratones *mdx* y WT tratados con vehículo (H₂O) o con el compuesto 1 (50 mg/kg/d (dosis de objetivo)) administrado en agua de bebida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

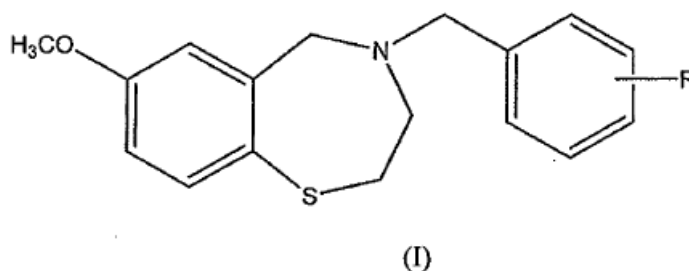
Se ha de entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican diversas realizaciones de la invención, se dan únicamente a modo ilustrativo.

- 20 Tal como se utilizan aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a no ser que el contenido indique claramente otra cosa.

El término "Rycals®" se refiere a estabilizadores del canal de calcio de receptores de rianodina representados por los compuestos de Fórmula general (I) o (IA) previstos por la invención, así como los compuestos específicos designados mediante referencias numéricas previstos por la invención, y denominados aquí colectivamente como "compuesto(s) de la invención".

25 Compuestos

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención están representados por la estructura de Fórmula (I):



donde R es COOH;

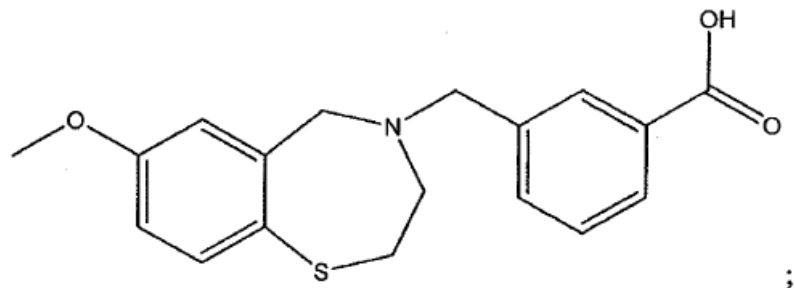
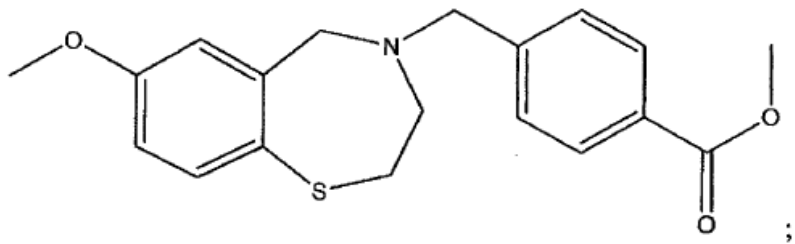
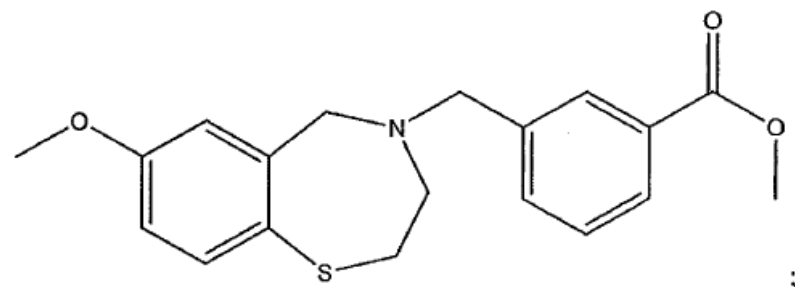
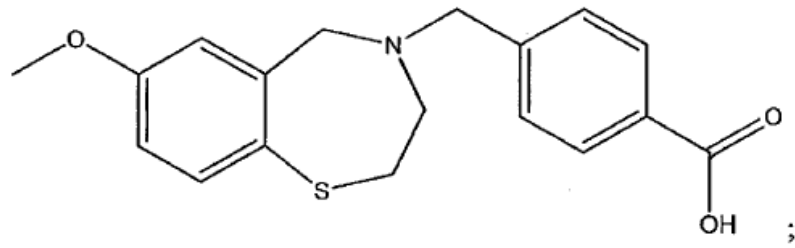
- 30 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

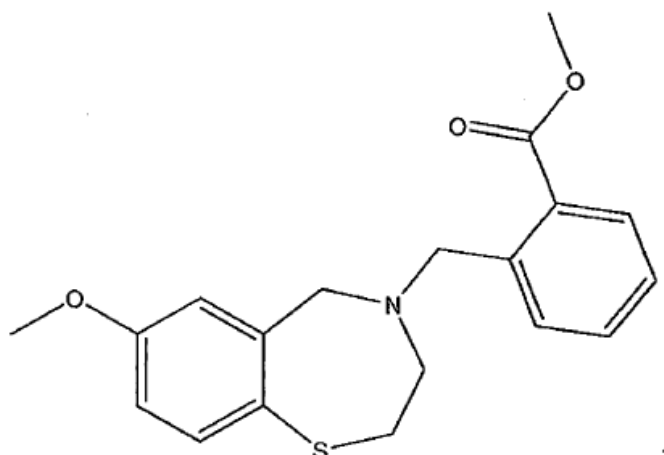
- 35 En realizaciones preferentes, R en la Fórmula (I) está en la posición 4 del anillo fenilo (es decir, la posición 7 del anillo benzodiazepina). Cada posibilidad representa una realización independiente de la presente invención. Los compuestos de Fórmula (I) pueden estar presentes en forma de una sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptables. Esta sales se seleccionan preferentemente de entre el grupo consistente en sales de sodio, potasio, magnesio, hemifumarato, clorhidrato y bromhidrato, representando cada posibilidad una realización independiente de la presente invención. Una sal actualmente preferente es la sal de sodio. Otra sal actualmente preferente es la sal hemifumarato.

- 40 En algunas realizaciones específicas, el compuesto de la invención se selecciona de entre el grupo consistente en el compuesto 1, el compuesto 4, el compuesto 6 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

También se describen adicionalmente compuestos de referencia seleccionados de entre el grupo consistente en el compuesto 2, el compuesto 3, el compuesto 5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

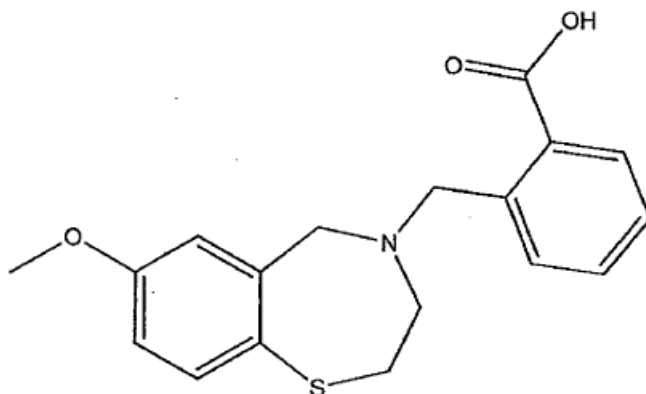
Estos compuestos están representados por las siguientes estructuras:





(5)

y



(6)

Definiciones químicas:

- 5 Tal como se utiliza aquí, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado de 1 a 4 átomos de carbono ("alquilo(C₁-C₄"). Grupos alquilo representativos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo y terc-butilo.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en su forma tautomérica. Todas estas formas tautoméricas se contemplan aquí como parte de la presente invención.

- 10 Después de su preparación, los compuestos de la presente invención preferentemente se aíslan y purifican para obtener una composición que contiene una cantidad en peso igual o mayor que aproximadamente el 90% del compuesto, aproximadamente el 95% del compuesto, y de forma todavía más preferente mayor que aproximadamente el 99% del compuesto (compuesto "esencialmente puro"), que después se utiliza o formula tal como se describe aquí. Estos compuestos de la presente invención "esencialmente puros" también se contemplan aquí como parte de la presente invención.
- 15

Uso terapéutico

- La presente invención proporciona compuestos aptos para el tratamiento de afecciones, enfermedades y trastornos asociados con RyRs. Más particularmente, la presente invención proporciona compuestos que pueden fijar una fuga en canales RyR, que pueden consistir en canales RyR1, RyR2 y/o RyR3. En una realización, los compuestos de la invención aumentan y/o inhiben la disociación de RyR y calstabilina (por ejemplo, RyR1 y calstabilina 1; RyR2 y calstabilina 2; y RyR3 y calstabilina 1). El concepto "afecciones, enfermedades y trastornos asociados con RyR" significa enfermedades y trastornos que se pueden tratar y/o prevenir mediante la modulación de RyR e incluyen enfermedades y trastornos cardíacos, fatiga muscular, enfermedades y trastornos musculoesqueléticos, enfermedades y trastornos del SNC, disfunción cognitiva,
- 20

enfermedades y trastornos neuromusculares, mejora de la función cognitiva, enfermedades y trastornos óseos, caquexia cancerosa, hipertermia maligna, diabetes, muerte súbita cardíaca y síndrome de la muerte súbita del lactante.

5 En una realización, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (I), tal como se describe aquí, o de una sal del mismo, para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada de entre el grupo consistente en enfermedades o trastornos cardíacos, fatiga muscular, enfermedades y trastornos musculoesqueléticos, enfermedades y trastornos del SNC, enfermedades y trastornos neuromusculares, disfunción cognitiva, enfermedades y trastornos óseos, caquexia cancerosa, hipertermia maligna, diabetes, muerte súbita cardíaca y síndrome de la muerte súbita del lactante, o para mejorar la función cognitiva. Un compuesto actualmente preferente es un compuesto de Fórmula (1).

15 En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula (I) tal como se describe aquí, o a una sal del mismo, para su uso en la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una afección seleccionada de entre el grupo consistente en enfermedades o trastornos cardíacos, fatiga muscular, enfermedades y trastornos musculoesqueléticos, enfermedades y trastornos del SNC, disfunción cognitiva, enfermedades y trastornos neuromusculares, enfermedades y trastornos óseos, caquexia cancerosa, hipertermia maligna, diabetes, muerte súbita cardíaca y síndrome de la muerte súbita del lactante, o para mejorar la función cognitiva. Un compuesto actualmente preferente es un compuesto de Fórmula (1).

20 También se describen métodos para tratar o prevenir una afección seleccionada de entre el grupo consistente en enfermedades o trastornos cardíacos, fatiga muscular, enfermedades y trastornos musculoesqueléticos, enfermedades y trastornos del SNC, disfunción cognitiva, enfermedades y trastornos neuromusculares, enfermedades y trastornos óseos, caquexia cancerosa, hipertermia maligna, diabetes, muerte súbita cardíaca y síndrome de la muerte súbita del lactante, o para mejorar la función cognitiva, incluyendo el método el paso de administrar a un sujeto que requiere dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I) tal como se describe aquí, o una sal del mismo, para efectuar dicho tratamiento. Un compuesto actualmente preferente es un compuesto de Fórmula (1).

25 En una realización, el trastorno, afección o enfermedad está asociado con una función anómala del RyR1. En otra realización, el trastorno, afección o enfermedad está asociado con una función anómala del RyR2. En otra realización, el trastorno, afección o enfermedad está asociado con una función anómala del RyR3. Cada posibilidad representa una realización independiente de la presente invención.

30 Las enfermedades y trastornos cardíacos incluyen enfermedades y trastornos de arritmia cardíaca, enfermedades y trastornos de arritmia cardíaca inducida por ejercicio, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca descompensada aguda, daño por isquemia/reperusión (I/R) cardíaca (incluyendo daño por I/R después de angioplastia coronaria o después de trombólisis durante infarto de miocardio (IM)), enfermedad pulmonar obstructiva crónica e hipertensión. Las enfermedades y trastornos de arritmia cardíaca incluyen arritmia auricular y ventricular, fibrilación auricular y ventricular, taquiarritmia auricular y ventricular, taquicardia auricular y ventricular, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC) y variantes de las mismas inducidas por ejercicio.

40 Los compuestos de la invención también son útiles en el tratamiento de la fatiga muscular, que se puede deber a ejercicio prolongado o de alta intensidad, o que puede estar causada por enfermedades musculoesqueléticas. Ejemplos de enfermedades y trastornos musculoesqueléticos incluyen fatiga musculoesquelética, miopatías del núcleo central, fatiga musculoesquelética inducida por ejercicio, trastornos vesicales, incontinencia, fatiga muscular asociada con la edad, sarcopenia, miopatías congénitas, miopatías musculoesqueléticas y/o atrofas, caquexia cancerosa, miopatía con núcleos y barras, miopatías mitocondriales [por ejemplo síndrome de Kearns-Sayre, síndrome MELAS (miopatía mitocondrial, encefalopatía, acidosis láctica y episodios de tipo ictus) y síndrome MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas)], miopatías endocrinas, glucogenosis hereditarias musculares [por ejemplo enfermedad de Pompe, enfermedad de Andersen y enfermedad de Cori], mioglobinurias [por ejemplo enfermedad de McArdle, enfermedad de Tarui y enfermedad de DiMauro], dermatomiositis, miositis osificante, parálisis periódica familiar, polimiositis, miositis por cuerpos de inclusión, neuromiotonía, síndrome del hombre rígido, hipertermia maligna, calambres musculares comunes, tetania, miastenia grave, atrofia muscular espinal (AME), atrofia muscular espinal y bulbar (AMEB, también conocida como atrofia muscular espinobulbar, atrofia bulbo-espinal, neuropatía bulboespinal ligada al cromosoma X (NBSX), atrofia muscular espinal ligada al cromosoma X de tipo 1 (AMEX1) y enfermedad de Kennedy (EK)), y distrofia muscular. Los trastornos musculoesqueléticos preferentes incluyen fatiga musculoesquelética inducida por ejercicio, una miopatía congénita, distrofia muscular, fatiga muscular relacionada con la edad, sarcopenia, miopatía del núcleo central, caquexia cancerosa, trastornos vesicales e incontinencia.

Ejemplos de distrofia muscular incluyen distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de cintura y extremidades (DMCE), distrofia muscular congénita (DMC), distrofia muscular distal, distrofia fascioescapulohumeral, distrofia muscular miotónica, distrofia muscular de Emery-Dreifuss y distrofia muscular oculofaríngea, siendo preferente actualmente la DMD.

- 5 Tal como se utiliza aquí, el concepto "distrofia muscular congénita" se refiere a una distrofia muscular que ya está presente en el nacimiento. La DMC se clasifica en base a mutaciones genéticas: 1) genes codificadores para proteínas estructurales de la membrana basal o matriz extracelular de las fibras musculoesqueléticas; 2) genes codificadores para glicosiltransferasas putativas o demostradas, que afectan a su vez a la glicosilación de distroglicano, una proteína de membrana exterior de la membrana basal; y 3) otros. Los ejemplos de DMC incluyen DMC con deficiencia de laminina $\alpha 2$ (MDC1A), DMC de Ullrich (DMCU 1, 2 y 3) síndrome de Walker-Warburg (SWW), enfermedad muscular oculo-cerebral (MEB), DMC de Fukuyama (DMCF), DMC más deficiencia de laminina 1 secundaria (MDC1B), DMC más deficiencia de laminina 2 secundaria (MDC1C), DMC con retraso mental y paquigiria (MDC1D), y espina rígida con distrofia muscular de tipo 1 (RSMD1).

- 15 La disfunción cognitiva puede estar asociada o incluir pérdida de memoria, pérdida de memoria asociada con la edad, trastorno por estrés postraumático (TEPT), trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA), trastorno generalizado del desarrollo (TGD), trastorno de ansiedad generalizada (TAG), trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), esquizofrenia, trastorno bipolar o depresión mayor.

Los trastornos y enfermedades del SNC incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), neuropatía, crisis epilépticas, enfermedad de Parkinson (EP) y enfermedad de Huntington (EH).

- 20 Los trastornos y enfermedades neuromusculares incluyen ataxia espinocerebelosa (AEC) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehring).

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención mejoran la función cognitiva, que se puede seleccionar entre memoria a corto plazo, memoria a largo plazo, atención, aprendizaje y cualquier combinación de éstos.

- 25 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la caquexia cancerosa, esto es debilidad muscular asociada con cáncer en general, preferentemente debilidad muscular en caso de cáncer metastásico, como metástasis óseas. La debilidad muscular y la atrofia muscular (caquexia) son síntomas paraneoplásicos comunes en pacientes de cáncer. Estas afecciones provocan una fatiga significativa y reducen dramáticamente la calidad de vida del paciente. La presente divulgación proporciona un método para tratar y prevenir la debilidad muscular en pacientes de cáncer, basado en parte en el descubrimiento de que, en determinados tipos de cáncer, por ejemplo cáncer de próstata y de mama con metástasis ósea, el RyR1 se oxida, lo que hace que se produzcan "fugas". Además se ha comprobado que la prevención de las fugas mediante administración de compuestos Rycal mejora la función muscular. Los ejemplos de cáncer incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer pancreático, 35 cáncer de pulmón, cáncer de colon, y cáncer gastrointestinal.

Terapia de salto de exón:

- En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención modulan (por ejemplo aumentan) el empalme de ARNm aumentando el salto de exón mediado por antisentido. Esta modulación de empalme se realiza en presencia de oligonucleótidos antisentido (OA) que son específicos para empalmar secuencias de interés. En algunas realizaciones de la invención, el compuesto de fórmula (I) o (IA) y el OA pueden actuar de forma sinérgica, aumentando el compuesto de fórmula (I) o (IA) el salto de exón mediado por OA. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento o la prevención de cualquiera de las afecciones aquí descritas asociadas con fugas RyR, que además comprende el uso de OA antisentido que es específico para una secuencia de empalme en una secuencia de ARNm, para aumentar el salto de exón en el ARNm de interés.

- Una realización particular para aumentar el salto de exón mediante los compuestos de la presente invención está relacionada con la distrofia muscular de Duchenne (DMD). La DMD es una enfermedad recesiva letal ligada al cromosoma X caracterizada por una debilidad muscular progresiva a lo largo de la vida del paciente. La DMD está causada principalmente por deleciones multiexón fuera de marco en el gen *DMD* que destruyen la producción de la proteína distrofina. La pérdida de expresión de distrofina no explica por sí sola la patofisiología de la DMD. La alteración del complejo de glicoproteína-distrofina (CDG) también produce estrés oxidante, sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y apoptosis, aumento del flujo de entrada de Ca^{2+} en el músculo y transmisión patológica de señales de Ca^{2+} . No existen terapias curativas para la DMD y el único tratamiento farmacológico demostrado son los corticosteroides, que pueden prolongar la ambulación pero tienen efectos secundarios considerables. El salto de exón mediado por oligonucleótidos antisentido es un planteamiento terapéutico prometedor que pretende restaurar el marco de lectura de *DMD* y permitir la expresión de un complejo de glicoproteína-distrofina intacto. Hasta la fecha, con este método se han producido niveles bajos

de proteína distrofina en humanos. Kendall y col. (*Sci Transl Med*, 2012, 4(164), p. 164ra160) informaron de que determinadas moléculas pequeñas, como el Dantroleno y otros moduladores de RyR, potencian el salto de exón guiado por oligómeros antisentido, aumentando el salto de exón para restaurar el marco de lectura de ARNm, la proteína distrofina sarcolémica y el complejo de glicoproteína-distrofina en músculos esqueléticos de ratones *mdx*, un modelo de DMD en ratones.

Así, en una realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la presente invención en combinación con un oligonucleótido antisentido (OA) que es específico para una secuencia de empalme de uno o más exones del gen *DMD*, por ejemplo el exón 23, 45, 44, 50, 51, 52 y/o 53 del gen *DMD*, para la producción de un medicamento para el tratamiento de la DMD. Los OA preferentes incluyen OA dirigidos al exón 23, 50 y/o 51 del gen *DMD*, OA de como fosforotioato de 2'-O-metilo (2OMe) o fosforodiamidato morfolino (PMO). Ejemplos de estos OA incluyen Pro051/GSK2402968, AV14658/Eteplirsén y PMO E23 morfolino (5'- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT- 3').

Las expresiones "cantidad eficaz", "cantidad suficiente" o "cantidad terapéuticamente eficaz", que se utilizan aquí indistintamente, consisten en la cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos y, como tales, las expresiones "cantidad eficaz" o sus variantes dependen del contexto en el que son aplicadas. En algunos casos la respuesta es preventiva, en otros terapéutica y en otros una combinación de ambas. La expresión "cantidad eficaz" también incluye la cantidad de un compuesto de la invención que es "terapéuticamente eficaz" y que evita o atenúa esencialmente efectos secundarios no deseables.

Tal como se utiliza aquí y es bien entendido en la técnica, un "tratamiento" es un método para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir el alivio o mejoría de uno o más síntomas o estados, la disminución del alcance de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del estadio de la enfermedad, la prevención de la proliferación de la enfermedad, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejoría o paliación del estado de la enfermedad y la remisión, detectable o indetectable. El término "tratamiento" también puede significar una prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en caso de no recibir tratamiento.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención se formulan en composiciones farmacéuticas para ser administradas a sujetos humanos en una forma biológicamente compatible para la administración *in vivo*. De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende compuestos de la invención mezclados con un diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable es preferentemente "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no ser perjudicial para el receptor del mismo.

El compuesto se puede administrar solo, pero preferiblemente se administra con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. El vehículo farmacéuticamente aceptable aquí empleado se puede seleccionar de entre diversos materiales orgánicos o inorgánicos que se utilizan como materiales para formulaciones farmacéuticas y que se incorporan como uno o más de los siguientes ingredientes: materiales de carga, diluyentes, aglutinantes, disgregantes, tampones, colorantes, emulsionantes, agentes mejoradores de sabor, gelificantes, lubricantes, conservantes, solubilizadores, estabilizadores, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes de tonicidad, humectantes, emulsionantes, dispersantes, agentes hinchantes, retardadores, lubricantes, absorbentes y agentes de aumento de la viscosidad.

Los compuestos de la presente invención se administran a un sujeto humano o animal mediante procedimientos conocidos, incluyendo, de forma no exclusiva, por vía sublingual, bucal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), transdérmica, per- o transcutánea, intranasal, intravaginal, rectal, ocular y respiratoria (administración por inhalación). Los compuestos de la invención también pueden ser administrados al sujeto mediante suministro a los músculos del sujeto, incluyendo, de forma no exclusiva, los músculos cardíacos o esqueléticos del sujeto. En una realización, el compuesto se administra al sujeto mediante el suministro dirigido a las células de músculos cardíacos a través de un catéter insertado en el corazón del sujeto. En otras realizaciones, los compuestos pueden ser administrados directamente en el SNC, por ejemplo mediante inyección intralumbal o infusión intraventricular de los compuestos directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR), o mediante administración intraventricular, intratecal o intersticial. Actualmente es preferente la administración oral.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para la administración sólida vía oral incluyen en especial pastillas o grageas, pastillas sublinguales, sobres, cápsulas, incluyendo cápsulas de gelatina, polvos y gránulos; y las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para la administración

5 Líquida vía oral, nasal, bucal u ocular incluyen en especial emulsiones, soluciones, suspensiones, gotas, jarabes y aerosoles. Los compuestos también pueden ser administrados en forma de una suspensión o solución con agua de bebida o con alimentos. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, de forma no limitativa, derivados de celulosa, incluyendo carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa y celulosa microcristalina; azúcares como manitol, sacarosa o lactosa; glicerina, goma arábiga, estearato de magnesio, fumarato de estearil-sodio, solución salina, alginato de sodio, almidón, talco y agua, entre otros.

10 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para inyecciones parenterales incluyen en especial soluciones estériles, que pueden ser acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones, y también polvos estériles para la reconstitución de soluciones o suspensiones inyectables. Los compuestos de la invención se pueden combinar con una solución acuosa estéril isotónica con la sangre del sujeto. Las formulaciones de este tipo se preparan disolviendo un principio activo sólido en agua que contiene sustancias fisiológicamente compatibles, como cloruro de sodio, glicina y similares, y que tiene un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas, para producir una solución acuosa, y esterilizando después dicha solución. La formulación se presenta en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, como ampollas selladas o viales sellados. La formulación se administra mediante cualquier modo de inyección, incluyendo inyección epifacial, intracapsular, intracraneal, intracutánea, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraespinal, intraesternal, intravascular, intravenosa, parenquimatosas, subcutánea o sublingual, o a través de un catéter en el corazón del sujeto.

20 Las composiciones farmacéuticas para la administración rectal o vaginal consisten preferentemente en supositorios, y las composiciones farmacéuticas para administración per- o transcutánea incluyen en especial polvos, aerosoles, cremas, ungüentos, geles y parches.

25 Para la administración transdérmica, los compuestos de la invención se combinan con promotores de penetración en la piel, como propilenglicol, polietilenglicol, isopropanol, etanol, ácido oleico, *N*-metilpirrolidona y similares, que aumentan la permeabilidad de la piel a los compuestos de la invención y permiten que los compuestos penetren a través de la piel hasta la corriente sanguínea. Los compuestos/composiciones promotoras también se pueden combinar con una sustancia polimérica, como etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etileno/acetato de vinilo, polivinilpirrolidona y similares, para obtener la composición en forma de gel, que se disuelve en un disolvente, se evapora hasta la viscosidad deseada y después se aplica a un material de soporte para obtener un parche.

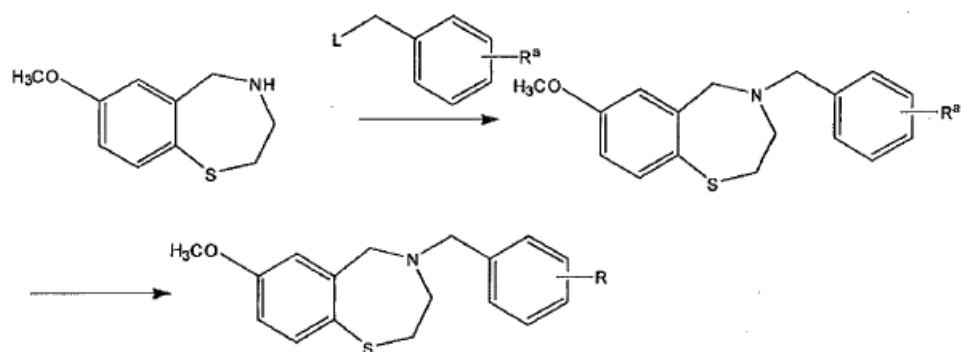
30 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se preparan mediante métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, incluyendo métodos de granulación en húmedo y en seco, o mediante compresión directa. La elección del vehículo está determinada por la solubilidad y la naturaleza química de los compuestos, la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar.

35 Las composiciones farmacéuticas arriba mencionadas ilustran la invención.

40 De acuerdo con los métodos de la presente invención, cualquiera de estos compuestos puede ser administrado al sujeto (o puesto en contacto con células del sujeto) en una cantidad eficaz para limitar o prevenir una disminución del nivel de calstabilina unida a RyR en el sujeto, en particular en células del sujeto. El trabajador cualificado puede determinar fácilmente esta cantidad basándose en procedimientos conocidos, incluyendo análisis de curvas de titulación establecidas *in vivo* y métodos y ensayos dados a conocer aquí. Una cantidad adecuada de los compuestos de la invención eficaz para limitar o prevenir una disminución del nivel de calstabilina unida a RyR en el sujeto oscila entre aproximadamente 0,01 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día (por ejemplo 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 o 100 mg/kg/día), y/o es una cantidad suficiente para alcanzar niveles en plasma entre aproximadamente 300 ng/ml y aproximadamente 5.000 ng/ml. Alternativamente, la cantidad de compuestos de la invención oscila entre aproximadamente 1 mg/kg/día y aproximadamente 50 mg/kg/día. Alternativamente, la cantidad de compuestos de la invención oscila entre aproximadamente 10 mg/kg/día y aproximadamente 20 mg/kg/día. También están incluidas cantidades entre aproximadamente 0,01 mg/kg/día o 0,05 mg/kg/día y aproximadamente 5 mg/kg/día o aproximadamente 10 mg/kg/día que pueden ser administradas.

50 Métodos de síntesis

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona procesos para la preparación de un compuesto de la invención y sus sales. Más particularmente, la presente invención proporciona procesos para la preparación de los compuestos de Fórmula (I), por ejemplo el compuesto 1, el compuesto 2, el compuesto 3, el compuesto 4, el compuesto 5, el compuesto 6, o sales de los mismos. Las diversas vías de síntesis para obtener los compuestos se describen en los ejemplos. La vía de síntesis general (VSG) se expone en el siguiente Esquema 1:



Esquema 1

En el Esquema 1, R^a es COOR^1 o CN ; R^1 es un alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) y L es un grupo saliente, que consiste por ejemplo en un halógeno, un sulfonato (OSO_2R^1 , siendo R^1 igual a alquilo o arilo, por ejemplo OMs (metilato), OTs (tosilato)) y similares. El material de partida de amina se somete a reacción con el agente alquilante (derivado de bencilo arriba mostrado), preferentemente en presencia de una base, para obtener el producto deseado o un precursor del mismo ($R=R^a$). Dicho precursor se puede someter adicionalmente a reacción para convertir el grupo R^a en el grupo COOH tal como se ejemplifica más abajo en la sección experimental, o mediante cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un precursor de éster ($R^a = \text{COOR}^1$, siendo R^1 un alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$)) se puede convertir en el ácido carboxílico correspondiente ($R = \text{COOH}$) mediante hidrólisis bajo condiciones ácidas o básicas de acuerdo con métodos conocidos. Alternativamente, un precursor de nitrilo ($R^a = \text{CN}$) se puede convertir en un tetrazol (un isómero de ácido carboxílico) mediante reacción con azida de sodio bajo condiciones adecuadas, o en un ácido carboxílico ($R = \text{COOH}$) mediante hidrólisis.

El material de partida de amina se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en los documentos WO 2009/111463 o WO 2007/024717, o mediante cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. La naturaleza de la base no es particularmente limitativa. Las bases preferentes incluyen hidruros (por ejemplo hidruro de sodio o de potasio) y N,N-diisopropiletilamina. Otras bases adecuadas incluyen bases orgánicas, como aminas terciarias, seleccionadas de entre el grupo consistente en aminas acíclicas (por ejemplo trimetilamina, trietilamina, dimetilfenilamina, diisopropiletilamina y tributilamina), aminas cíclicas (por ejemplo N-metilmorfolina) y aminas aromáticas (dimetilamina, dimetilaminopiridina y piridina).

La reacción se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de un disolvente. La naturaleza del disolvente, cuando se utiliza, no es particularmente limitativa, y sus ejemplos incluyen disolventes tales como ésteres (por ejemplo acetato de etilo), éteres (por ejemplo THF), disolventes clorados (por ejemplo diclorometano o cloroformo), dimetilformamida (DMF) y otros disolventes como acetonitrilo o tolueno, o mezclas de estos disolventes entre sí o con agua.

Las sales de compuestos de Fórmula (I) donde $R = \text{COOH}$ se pueden preparar sometiendo a reacción la molécula original con una base adecuada, por ejemplo NaOH o KOH, para obtener las sales metálicas alcalinas correspondientes, por ejemplo sales de sodio o potasio. Alternativamente, los ésteres ($R = \text{COOR}^1$) se pueden convertir directamente en sales mediante reacciones con bases adecuadas.

Las sales de compuestos de Fórmula (I) también se pueden preparar sometiendo a reacción la molécula original con un ácido adecuado, por ejemplo HCl, ácido fumárico o ácido paratoluensulfónico, para obtener las sales correspondientes, por ejemplo clorhidrato, tosilato o hemifumarato.

EJEMPLOS

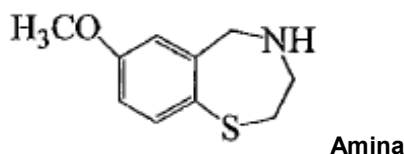
Los siguientes ejemplos son ilustrativos de las diversas realizaciones preferentes de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1: Síntesis

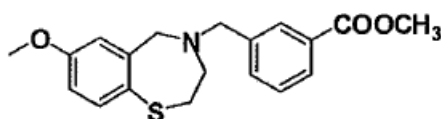
Instrumentos:

RMN: Bruker AVANCE III 400 o Varian Mercury 300
 CL/EM: Waters Delta 600 equipado con Autosampler 717Plus, Photo Diode Array Detector 2996, y Mass Detector 3100, o Shimadzu 210

Procedimiento general para la alquilación de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahydrobenzo[f][1,4]tiazepina ("Amina").

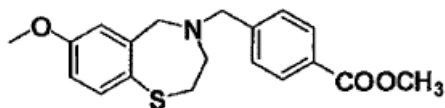


- 5 La amina (estructura mostrada más arriba) (1 mmol) se disolvió en 3 ml de diclorometano. A la solución se añadió un reactivo de alquilación (1 mmol) seguido de N,N-diisopropiletilamina (0,34 ml, 2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución se cargó en columna directamente y se eluyó con hexano/EtOAc (2:1, v/v).



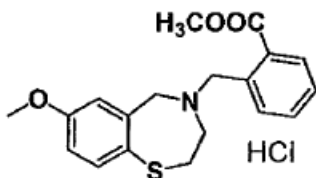
Compuesto 2

- 10 3-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoato de metilo: ¹HRMN (300 MHz, CDCl₃): 7,96 (m, 2 H), 7,46 (m, 3 H), 6,70 (dd, J = 8,4 Hz, 3,0 Hz, 1 H), 6,50 (d, J = 2,7 Hz, 1 H), 4,09 (s, 2 H), 3,90 (s, 3 H), 3,72 (s, 3 H), 3,57 (s, 2 H), 3,35 (m, 2 H), 2,72 (m, 2 H). MS: 344 (M+1)



Compuesto 3

- 15 4-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoato de metilo: ¹HRMN (300 MHz, CDCl₃): 7,99 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,46 (d, J = 8,4 Hz, 1 H), 7,37 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 6,70 (dd, J = 8,4 Hz, 3,0 Hz, 1 H), 6,50 (d, J = 2,7 Hz, 1 H), 4,09 (s, 2 H), 3,90 (s, 3 H), 3,72 (s, 3 H), 3,57 (s, 2 H), 3,35 (m, 2 H), 2,72 (m, 2 H). MS: 344 (M+1)



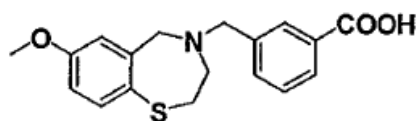
20 Compuesto 5

2-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoato de metilo: El compuesto se convirtió en sal clorhidrato con HCl 2M en éter.

- ¹HRMN (300 MHz, DMSO-d₆): 10,33 (br, 1 H), 8,08 (d, J = 7,5 Hz, 1 H), 7,80-7,65 (m, 3 H), 7,51 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,14 (s, 1 H), 6,99 (dd, J = 8,4, 2,1 Hz, 1 H), 4,90-4,40 (m, br, 4 H), 3,88 (s, 3 H), 3,78 (s, 3 H), 3,40 (m, 2 H), 3,26 (m, 1 H), 3,11 (m, 1 H). MS: 344 (M+1)
- 25

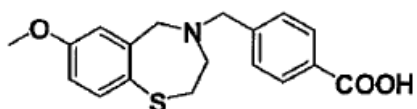
Hidrólisis de éster (procedimiento general)

- Un metil éster (3 mmol) se disolvió en 30 ml de THF/metanol/NaOH 1 M (1:1:1, v/v). La mezcla se agitó durante 8 horas y la TLC mostró la desaparición completa del éster. Después se añadió 1 ml de HCl concentrado para ajustar a pH ácido. El disolvente orgánico se retiró y el sólido formado se recogió por filtración. El sólido se secó al aire.
- 30

**Compuesto 4**

Ácido 3-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoico: Este compuesto se obtuvo por extracción con EtOAc como disolvente.

- 5 $^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3) 8,10 (s, 1 H), 8,04 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H), 7,80 (br, 1 H), 7,46 (m, 2 H), 6,80 (m, 2 H), 4,40 (s, 2 H), 3,90 (s, 2 H), 3,76 (s, 3 H), 3,42 (s, 2 H), 2,86 (s, 2 H). MS: 330 (M+1), 328 (M-1).

**Compuesto 1**

- 10 Ácido 4-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoico: Este compuesto se obtuvo por extracción con EtOAc como disolvente.

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3): 8,02 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H), 7,46 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H), 7,42 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H), 6,70 (dd, $J = 8,4$ Hz, 3,0 Hz, 1 H), 6,50 (d, $J = 3,0$ Hz, 1 H), 4,11 (s, 2 H), 3,72 (s, 3 H), 3,62 (s, 2 H), 3,35 (m, 2 H), 2,76 (m, 2 H). MS: 330 (M+1), 328 (M-1).

Compuesto 1, sal sódica:

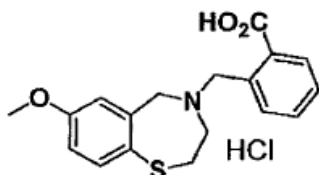
- 15 La sal sódica del compuesto 1 se preparó a partir de la molécula original utilizando 1 equivalente de NaOH en EtOH (p.f. de la sal: $> 290^\circ\text{C}$).

$^1\text{HRMN}$ (DMSO- D_6 , 600 MHz), δ (ppm): 7,77 (2 H, m), 7,41 (1 H, d), 7,13 (2 H, m), 6,75 (1 H, dd), 6,63 (1 H, d), 4,00 (2 H, s), 3,70 (3 H, s), 3,49 (2 H, s), 3,18 (2 H, m), 2,70 (2 H, m).

Compuesto 1, sal hemifumarato:

- 20 1,6 g del compuesto 1 (forma neutra) y 265 mg de ácido fumárico se introdujeron en un matraz de fondo redondo. Después de añadir 18 ml de acetona y 2 ml de agua, la mezcla de reacción se sometió a reflujo. Se observó una solubilización parcial (pero no una clarificación completa), seguida de precipitación. Después, la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante una noche. Después de enfriar la mezcla, el sólido residual se aisló por filtración, se lavó con 3 ml de acetona y se secó bajo vacío ($40^\circ\text{C}/10$ mbar) durante 4 horas.

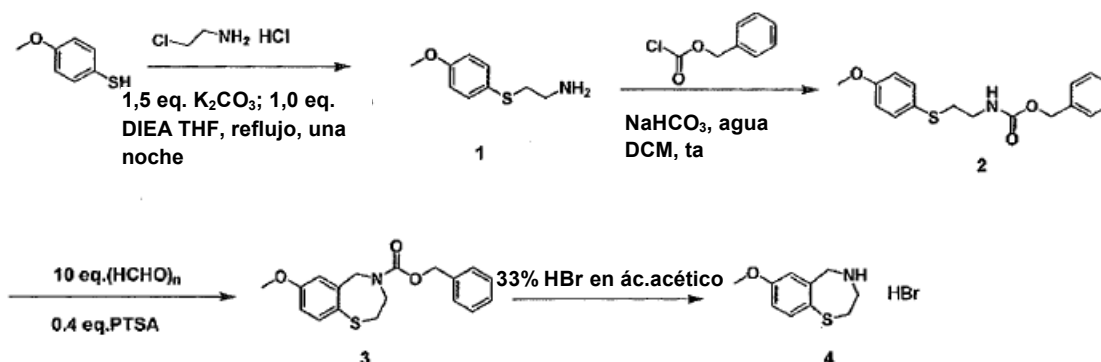
- 25 $^1\text{HRMN}$ (DMSO- D_6 , 600 MHz), δ (ppm): 12,97 (2 H, bs), 7,90 (2 H, m), 7,43 (1 H, d), 7,40 (2 H, m), 6,77 (1 H, dd), 6,64 (1 H, d), 6,62 (1 H, s), 4,03 (2 H, s), 3,70 (3 H, s), 3,58 (2 H, s), 3,20 (2 H, m), 2,72 (2 H, m).

**Compuesto 6**

- 30 Ácido 2-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoico: El compuesto se convirtió en sal clorhidrato con HCl 2 M en éter.

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6): 10,10 (br, 1 H), 8,08 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H), 7,66-7,51 (m, 4 H), 7,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H), 6,99 (dd, $J = 8,4$, 2,1 Hz, 1 H), 4,80- 4,40 (m, br, 4 H), 3,78 (s, 3 H), 3,46 (m, 2 H), 3,13 (m, 2 H). MS: 330 (M+1), 328 (M-1).

Síntesis de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[t][1,4]tiazepina ("Amina").



2-(4-metoxifeniltio)etanoamina (1)

Se mezclaron 4-metoxitiofenol (50 g, 0,357 mol), monoclorhidrato de 2-cloroetilamina (39,8 g, 0,343 mol), K_2CO_3 (78,8 g, 0,57 mol) y diisopropil-etilamina (32 ml, 0,178 mol) en 200 ml de THF. La mezcla se desgasificó durante 5 minutos bajo presión reducida y se sometió a reflujo bajo argón durante una noche. El disolvente se retiró y se añadió agua (300 ml) al matraz. La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 200 ml). Los componentes orgánicos se recogieron, el diclorometano se retiró y se añadieron 50 ml de HCl concentrado, seguido de 200 ml de agua. La solución se extrajo con 1:1 EtOAc (3 x 200 ml). La capa acuosa se ajustó a pH 10 con NaOH 2M y se extrajo con diclorometano (3 x 200 ml). La solución orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La eliminación del disolvente proporcionó 61 g del compuesto buscado en forma de un líquido incoloro, con un rendimiento de un 97%.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 7,35 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 6,81 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 3,77 (s, 3 H), 2,88-2,80 (m, 4 H), 1,44 (s, 2 H).

2-(4-metoxifeniltio)etilcarbamato de bencilo (2)

15 Primer método

A un matraz que contenía el compuesto 1 (8,0 g, 43,7 mmol), bicarbonato de sodio (12,1 g, 144 mmol), agua (100 ml) y diclorometano (200 ml) se añadió cloroformiato de bencilo (8,2 g, 48,1 mmol, diluido en 100 ml de diclorometano) gota a gota a 0°C. Después de la adición, la mezcla se agitó a t.a. durante 5 horas. La capa orgánica se recogió y la solución acuosa se extrajo con 100 ml de diclorometano. La solución orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio. El disolvente se retiró y el sólido resultante se trituroó con 200 ml de THF/hexano (1:10). El sólido se recogió y se secó, dejando el producto buscado (12,9 g) con un rendimiento de un 93%.

Método alternativo

A la solución del compuesto 1 (10 g, 54,6 mmol) y trietilamina (15 ml, 106 mmol) en 200 ml de diclorometano se añadió cloroformiato de bencilo (7,24 ml, 51,5 mmol, diluido en 100 ml de diclorometano) gota a gota a 0°C. Después de la adición, la mezcla se agitó a t.a. durante una hora. El sólido se retiró por filtración. La solución se extrajo con 100 ml de HCl 0,1M y 100 ml de carbonato de sodio saturado, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La retirada del disolvente proporcionó un sólido blanco, que se agitó en 200 ml de THF/hexano (1:20) durante tres horas. El sólido se recogió por filtración para obtener 14,2 g del compuesto buscado con un rendimiento de un 87%.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 7,35 (m, 7 H), 6,83 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 5,07 (m, 3 H), 3,77 (s, 3 H), 3,10 (q, J = 6,3 Hz, 2 H), 2,92 (t, J = 6,3 Hz, 2 H).

7-metoxi-2,3-dihidrobencof[1,4]tiazepin-4(5H)-carboxilato de bencilo (3)

Una mezcla del compuesto 2 (7,3 g, 23 mmol), paraformaldehído (6,9 g, 0,23 mol) y ácido *p*-toluensulfónico (1,45 g, 7,6 mmol) en 250 ml de tolueno se agitó a 70°C durante una noche. Después de enfriar la mezcla a t.a., el sólido se retiró por filtración. La solución se extrajo con carbonato de sodio saturado (100 ml) y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de retirar el disolvente se obtuvo el producto buscado (7,4 g) en forma de un líquido, con un rendimiento de un 97%.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 7,44 (d, J = 8,1 Hz, 0,77 H), 7,32 (m, 5,60 H), 7,07 (d, J = 2,7 Hz, 0,33 H), 6,68 (m, 1,30 H), 5,04 (s, 2 H), 4,59 (ss, 2 H), 3,96 (br, 1,80), 3,80 (ss, 1,23 H), 3,55 (s, 1,97 H), 2,76 (m, 2 H).

Bromhidrato de 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidrobencof[1,4]tiazepina (Amina) (sal 4 HBr)

Primer método

Una solución de HBr (al 33% en ácido acético, 10 ml) se añadió al compuesto **3** (4,2 g, 12,8 mmol). Después de la adición comenzó a desarrollarse dióxido de carbono y se formó un sólido blanco. La mezcla se dejó reposar a t.a. durante otras 2 horas. Después se añadió dietil éter (150 ml) a la mezcla y ésta se agitó durante 5 30 minutos. El sólido se recogió por filtración y se lavó con dietil éter. El sólido se secó bajo vacío para obtener 3,40 g del compuesto buscado con un rendimiento de un 91,8%.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): 9,02 (br, 2 H), 7,52 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 7,27 (d, J = 3,3 Hz, 1 H), 6,92 (dd, J = 8,4, 2,7 Hz, 1 H), 4,41 (s, 2 H), 3,77 (s, 3 H), 3,53 (m, 2 H), 2,96 (m, 2 H).

Método alternativo (base libre 4a)

10 El compuesto **3** (10 g, 30 mmol) se mezcló con 50 ml de HCl concentrado, 50 ml de agua y 30 ml de dioxano. La mezcla se agitó a 100°C durante una noche. Después de enfriar la mezcla a t.a., la mayor parte del disolvente y el HCl se eliminó bajo presión reducida. Luego se añadió agua (100 ml) a la solución y el sólido se retiró por filtración. La solución acuosa se extrajo con EtOAc/hexano (1:1, 3 x 100 ml) y se ajustó a un valor básico añadiendo 15 g de NaOH. La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 150 ml). La solución 15 combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La retirada del disolvente proporcionó un líquido, que se solidificó después de reposar a t.a. dejando 6,2 g del compuesto buscado.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7,42 (d, J = 8,1 Hz, 1 H), 6,78 (d, J = 2,7 Hz, H), 6,68 (dd, J = 2,7, 8,1 Hz, 1 H), 4,08 (s, 2 H), 3,96 (br, 1,80), 3,76 (s, 3 H), 3,38 (m, 2 H), 2,68 (m, 2 H).

Ejemplo 2: Unión de calstabilina 2 a RyR2 fosforilado por PKA

20 Se prepararon membranas de RS cardíaco tal como se describe más arriba (Marx y col., 2000; Kaftan y col., *Circ. Res.*, 1996, 78:990-97). También se llevó a cabo una inmunotransferencia de microsomas (50 µm) tal como se describe, con anticuerpo anti-calstabilina (1:1.000) (Jayaraman y col., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267:9474-77) durante 1 hora a temperatura ambiente (Reiken y col., *Circulation*, 107:2459-66, 2003). Después de una 25 incubación con IgG antirratón marcada con HRP (dilución 1:5.000; Transduction Laboratories, Lexington, Ky), las transferencias se desarrollaron utilizando ECL (Amersham Pharmacia, Piscataway, N.J.) y se detectaron sobre película de rayos X, o se expusieron a anticuerpos secundarios marcados con colorante infrarrojos y se visualizaron en un equipo de Li-Cor Biosciences (modelo Odyssey). A no ser que se especifique otra cosa, los compuestos se analizaron en una concentración de 100 mM. A continuación se presenta un ensayo de unión de calstabilina-2 representativo.

30 A. Fosforilación por PKA de retículo sarcoplasmático cardíaco (RSC)

La mezcla de reacción se preparó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Doscientos µg de RS cardíaco se añadieron a una mezcla de reacción de tampón de quinasa, PKA y ATP hasta un volumen final de 100 µl (mezcla de reacción indicada más abajo). Al final se añadió ATP para iniciar la reacción.

35 Mezcla de reacción:

20 µl = Muestra (RS cardíaco, 2 o 10 µg/µl)
10 µl = 10 x tampón de quinasa (80 mM MgCl₂, EGTA 100 mM, Tris/PIPES 500 mM), pH = 7,0
20 µl = PKA (2 unidades/ul) (Sigma # P2645)
10 µl = 10 x ATP (1,0 mM) (Sigma A 9187)
40 µl = H₂O destilada

1. Los tubos se incubaron a 30°C durante 30 minutos.
2. La mezcla de reacción se transfirió después a tubos de vidrio con una pared de 0,5 ml de espesor.
3. Los tubos de vidrio que contenían la mezcla de reacción se centrifugaron durante 10 minutos a 50.000xg en Sorvall Centrifuge RCM120EX utilizando un rotor S120AT3. Una centrifugación a 45 50.000xg durante 10 minutos es suficiente para aislar los microsomas.
4. La pella resultante se lavó 4 veces con tampón de unión (imidazol 10 mM, sacarosa 300 mM, pH = 7,4). En cada caso se añadieron 100 µl de 1 x tampón de unión al tubo para lavar la pella. La pella se resuspendió subiéndola y bajándola utilizando la punta de la pipeta. Después de la última vuelta se añadieron 50 µl de tampón de unión y las pellas de todos los tubos se reunieron. La reacción se 50 guardó a -20°C.

5. La fosforilación se confirmó separando aproximadamente 10 µg de RSC por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6% y analizando las inmunotransferencias tanto en lo que respecta al RyR total (5029 Ab, dilución 1:3000 o Monoclonal Ab de Affinity Bioreagents, nº Cat. MA3-916, dilución 1:2000) y RyR2 fosforilado por PKA (P2809 Ab, dilución 1:10000).
- 5 6. Se pueden guardar partes alícuotas a -80°C.
- B. Ensayo de re-unión de calstabilina**
1. El RSC fosforilado por PKA (aproximadamente 20 µg) se incubó con calstabilina 2 250 nM en 100 µl de tampón de unión (tal como se describe más arriba) con o sin compuestos.
- 10 2. La reacción se produjo en tubos de vidrio con una pared de 0,5 ml de espesor (producto de Hitachi Centrifuge, número de catálogo B4105).
3. La calstabilina-2 se añadió a la mezcla de reacción como último reactivo. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
4. Después de la reacción, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 100.000xg (centrífuga Sorvall RCM120EX con rotor S120AT3).
- 15 5. La pella resultante se lavó 4 veces en 1 x tampón de unión a 4°C. Después de cada lavado, los tubos se centrifugaron a 50.000xg durante 10 minutos a 4°C.
6. Después del lavado final se desechó el sobrenadante.
7. Luego se añadieron 20 µl de tampón de muestra (2 x) [6 x tampón de muestra descrito más abajo] y la pella se resuspendió con la punta y/o mediante un breve vórtice. La suspensión se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 20 8. Los tubos se calentaron a 90°C durante 4 minutos.
9. Las proteínas se separaron utilizando MSC/PAGE.
10. La unión de calstabilina-2 se detectó con anticuerpo primario anti-FKBP (Jayaraman y col., *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 9474-77, 1:2000) y anticuerpo secundario apropiado.
- 25 6 x tampón de muestra
- 7,0 ml 4 x Tris-HCl/SDS, pH 6,8
 3,0 ml glicerol (concentración final 30%)
 1,0 g SDS (concentración final 10%)
 0,93 g DTT (0,6M final)
- 30 1 mg azul de bromofenol (concentración final 0,001%)
 Agua destilada hasta un volumen final de 10 ml
 Conservación en partes alícuotas de 1 ml a -70°C

Resultados:

- 35 La Figura 1A representa una inmunotransferencia con anticuerpo de calstabilina-2 que muestra la unión de calstabilina-2 con RyR2 fosforilado por PKA en ausencia (-) o presencia del compuesto 1 100 nM. (+): calstabilina unida a RyR2 no fosforilado por PKA. Como control se utiliza S36, una benzotiazepina descrita en el documento US 7.544.678. Como se muestra, el compuesto 1, en una concentración de 100 nM, previno la disociación de calstabilina 2 de RyR2 fosforilado por PKA y/o aumentó la (nueva) unión de calstabilina 2 a RyR2 fosforilado por PKA.
- 40 Como muestra la Figura 1B, también se comprobó que los siguientes compuestos representativos previenen la disociación de calstabilina-2 de RyR2 fosforilado por PKA y/o aumentan la (nueva) unión de calstabilina 2 a RyR2 fosforilado por PKA cuando se ensayan en el ensayo de re-unión de calstabilina-2 arriba mencionado a 100 nM: compuesto 2, compuesto 3 y compuesto 4.

Ejemplo 3: Unión de calstabilina-1 con RyR1 fosforilado por PKA

- 45 Se prepararon membranas de RS de músculo esquelético de modo similar al del Ejemplo 2 y tal como se describe adicionalmente en la publicación de solicitud de patente US nº 2004/0224368, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. También se llevó a cabo una inmunotransferencia de microsomas (50 µg) tal

como se ha descrito, con anticuerpo anti-calstabilina-1 (Zymed) (1:1.000). Las transferencias se desarrollaron y cuantificaron tal como se describe en el Ejemplo 2.

La Figura 1C representa una inmunotransferencia con anticuerpo de calstabilina-1 que muestra la unión de calstabilina-2 con RyR1 fosforilado por PKA en ausencia (Neg) o presencia de las concentraciones indicadas del compuesto 1 o el compuesto 4. (Pos): calstabilina unida a RyR1 no fosforilado por PKA. Como control positivo se utiliza S36. Como se muestra, el compuesto 1 y el compuesto 4 previnieron la disociación de calstabilina-1 de RyR1 fosforilado por PKA y/o aumentaron la (nueva) unión de calstabilina-1 a RyR1 fosforilado por PKA de modo dependiente de la dosis, con una EC50 estimada de aproximadamente 100 nM y 150 nM, respectivamente.

10 **Ejemplo 4: Re-unión de calstabilina-1 a RyR1 en ratones tratados con isoproterenol**

El isoproterenol, un agonista de los receptores adrenérgicos beta, induce una insuficiencia cardíaca en ratones por la hiperestimulación del receptor adrenérgico beta. Simultáneamente se produce la activación de PKA, la fosforilación de los RyR2 en el RS y una disminución de la interacción de calstabilina-2 (FKBP12.6) con RyR2. En el músculo esquelético se produce una cascada de eventos similar, donde el RyR1 se fosforila, lo que conduce a una disminución de la unión de calstabilina-1 (FKBP12) con RyR1.

Tal como se describe detalladamente en la publicación internacional nº WO 2008/064264, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia, un tratamiento crónico con isoproterenol aplicado a un ratón de fenotipo salvaje ofrece un método rápido y fiable para inducir cambios en la bioquímica de RyR que se pueden cuantificar fácilmente. Estos cambios incluyen un aumento de la fosforilación por RyR y una disminución simultánea de la unión de calstabilina.

Animales y reactivos

Ratones C57B1/6 se mantuvieron y estudiaron de acuerdo con protocolos aprobados. El agonista adrenérgico beta sintético isoproterenol (ISO) se obtuvo de Sigma (I65627) y se preparó en forma de una solución madre de 100 mg/ml en agua. Se preparó tampón de lisis mediante la adición de sacarosa (1 mM), ditiotreitól (320 mM) y 1 tableta de inhibidor de proteasa (10X) a 10 ml de solución madre (HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, NaF 20 mM, Na₃VO₄ 2 mM).

Preparación de la bomba osmótica e implantación quirúrgica

Los ratones fueron sometidos a infusión continua de 10 mg/ml de isoproterenol (1 µl/hora) durante cinco días con una bomba de infusión osmótica implantada subcutáneamente (bomba Alzet MiniOsmotic, Modelo 2001, Durect Corporation, Cupertino, CA).

Para la carga del fármaco, la bomba osmótica se mantuvo en posición vertical y se inyectaron 200 µl de solución de fármaco en la bomba con una jeringuilla de 1 ml (conectada a una cánula) que contenía un exceso de solución de fármaco (~ 250-300 µl). La solución de fármaco se inyectó lentamente en sentido descendente, mientras que la jeringuilla se levantaba lentamente hasta que la bomba estuvo sobrealimentada. El desbordamiento de fluido desplazado al tapar la bomba confirmó que la bomba estaba adecuadamente cargada.

Las bombas osmóticas cargadas se implantaron subcutáneamente siguiendo los siguientes pasos. Los ratones receptores fueron anestesiados con 1,5-2% isoflurano en O₂ administrado a 0,6 l/minuto, y se midió y registró su peso. Después los ratones fueron colocados boca abajo sobre poliestireno expandido, con la cara en el cono de morro. La piel se recortó sobre la parte trasera del cuello, extendiéndose detrás de las orejas hasta la parte superior de la cabeza. El área se limpió suavemente con alcohol al 70% y se realizó una pequeña incisión en la línea media sobre la nuca de la cabeza/cuello. Un dispositivo de retención de suturas se limpió con alcohol, se insertó en el corte y se abrió para separar la piel del tejido subyacente. Para alojar la bomba, esta abertura se extendió hacia atrás hasta los cuartos traseros. La bomba cargada se insertó en la abertura, con su lugar de liberación situado lejos de la incisión, y se dejó que se asentara debajo de la piel con una tensión mínima. La incisión se cerró con sutura de nylon 5.0, lo que requirió aproximadamente 5-6 suturas, y el área se limpió suavemente con alcohol al 70%. Después de la cirugía, los ratones se dispusieron en jaulas individuales para reducir al mínimo la lesión y la posible activación del sistema nervioso simpático.

Aislamiento de músculo esquelético

El tejido de músculo esquelético de ratón se aisló de la siguiente manera. Los músculos de la pata se expusieron cortando la piel por el tobillo y tirando de ella hacia arriba. El tejido se mantuvo húmedo con tampón de Tyrode (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 0,42 mM, MgCl₂ 1,7 mM, NaHCO₃ 11,9 mM, glucosa 5 mM, CaCl₂ 1,8 mM, preparado añadiendo 20 mg de CaCl₂ a 100 ml 1X tampón producido a partir de una solución 10X sin CaCl₂). Los siguientes músculos se aislaron y congelaron en nitrógeno

líquido. El extensor largo de los dedos (*extensor digitorum longus* - EDL) se aisló insertando unas tijeras entre el tendón lateral y la X formada por el EDL y los tendones tibiales, cortando en sentido ascendente hacia la rodilla; cortando el músculo fibular para exponer el tendón en abanico del gastrocnemio; insertando fórceps bajo X y bajo el músculo para soltar el tendón del EDL; cortando el tendón del EDL y tirando hacia arriba del músculo; y finalmente cortando el EDL para soltarlo. El sóleo se aisló retirando el músculo fibular de la parte superior del gastrocnemio; exponiendo el sóleo en la parte inferior del gastrocnemio cortando y levantando el tendón de Aquiles; cortando el sóleo en la parte superior del músculo detrás de la rodilla; y finalmente tirando del sóleo y cortando el mismo para separarlo del músculo gastrocnemio. El tibial se aisló cortando el tendón tibial desde la parte delantera del tobillo, tirando del tendón hacia arriba y cortando el mismo para separarlo de la tibia. El vasto (músculo del muslo) se aisló en ambas patas cortando el músculo justo por encima de la rodilla y retirando el haz muscular. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido.

Inmunoprecipitación de RyR1 de lisados tisulares

El RyR1 se inmunoprecipitó a partir de muestras incubando 200-500 µg de homogenado con 2 µl de anticuerpo anti-RyR1 (Zymed) en 0,5 ml de un tampón RIPA modificado (Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 0,9% NaCl, NaF 5,0 mM, Na₃VO₄ 1,0 mM, 0,5% Triton-X100, e inhibidores de proteasa) a 4°C durante 1,5 horas. Después, las muestras se incubaron con perlas de proteína A-sefariosa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 4°C durante 1 hora, tras lo cual las perlas se lavaron tres veces con RIPA muy frío. Las muestras se calentaron a 95°C y se fraccionaron por tamaños mediante SDS-PAGE (15% SDS-PAGE para la calstabilina). Luego se desarrollaron inmunotransferencias utilizando un anticuerpo anti-FKBP (FKBP12/12.6, Jayaraman y col., J. Biol. Chem. 1992; 267: 9474-77) en una dilución 1:2.000. Los anticuerpos se diluyeron en 5% leche o TBS-T (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M, 0,05% Tween® 20, 0,5% Triton X-100).

Resultados

Se implantaron bombas osmóticas que contenían isoproterenol con o sin compuesto de ensayo en ratones tal como se describe más arriba. Los ratones fueron sometidos a perfusión osmótica durante cinco días con vehículo solo (DMSO/PEG), isoproterenol solo (ISO) (0,5 mg/kg/hora) o una combinación de isoproterenol (0,5 mg/kg/hora) y el compuesto 1 en las concentraciones indicadas. El sexto día cada ratón fue sacrificado y se aisló tejido de músculo esquelético, que se utilizó para analizar la unión de calstabilina-1 en inmunoprecipitados de RyR1.

El efecto del compuesto 1 en el incremento de la unión de calstabilina 1 con RyR1 en músculo esquelético aislado de ratones tratados con isoproterenol está representado en las Figuras 2A (inmunotransferencia) y 2B (cuantificación gráfica). Como muestran las figuras, el compuesto 1 aumentó los niveles de calstabilina-1 unida a RyR1 en membranas de músculo esquelético a un nivel similar al observado mediante la administración de S36 3,6 mM, otro derivado de benzotiazepina utilizado como control positivo (WO 2008/064264). En el caso del compuesto 4 se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

35 **Ejemplo 5: Efecto del compuesto 1 en un modelo de insuficiencia cardíaca postisquémica crónica en ratas**

Objetivo

El objetivo de este estudio era analizar la capacidad del compuesto 1 para reducir la disfunción cardíaca y atenuar la remodelación ventricular en un modelo de insuficiencia cardíaca inducida por isquemia-reperusión.

40 Metodología

A ratas Wistar (224-240 g, 10-11 semanas de edad) se les indujo una insuficiencia cardíaca crónica mediante daño por isquemia-reperusión (I/R). Para el protocolo de I/R, la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) se ocluyó durante 1 hora. El tratamiento con fármaco (5 mg/kg/día o 10 mg/kg/día en agua de bebida) se inició 1 semana después de la reperusión y se mantuvo durante un período de estudio de 3 meses. La eficacia del compuesto 1 se evaluó mediante ecocardiografía uno, dos y tres meses después del comienzo del tratamiento, y mediante hemodinámica invasiva 3 meses en comparación con animales tratados con vehículo y sometidos a operación falsa. También se analizaron muestras cardíacas para evaluar la hipertrofia y el contenido de colágeno. El último día del estudio se extrajo sangre de cada rata para evaluar las concentraciones plasmáticas del fármaco tal como muestra la Figura 3. El diseño del estudio está representado en la Figura 3. Los experimentos eran experimentos a ciegas.

Métodos estadísticos

Con los parámetros medidos en función del tiempo se analizan la comparación de animales sometidos a operación falsa y animales tratados con vehículo y la comparación de tratamientos con fármaco mediante análisis de varianza de dos factores con medidas repetidas. Con los parámetros medidos en el momento del

sacrificio y la morfometría, se analizaron comparaciones de animales sometidos a operación falsa y animales tratados con vehículo mediante test t y comparaciones de tratamientos con fármaco mediante análisis de varianza de un factor seguido de test de Dunnett.

Resultados

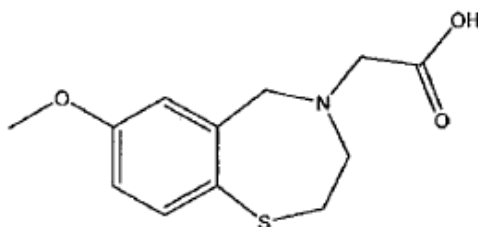
- 5 En comparación con los animales sometidos a operación falsa, los animales I/R tratados con vehículo mostraron mayores volúmenes sistólicos finales (LV ESV) y diastólicos finales (LV EDV) del ventrículo izquierdo (LV) (Figuras 4A y B), función cardíaca reducida medida a través de Fracción de Eyección (EF) (Figura 4C) y mayor contenido de colágeno intersticial (Figura 5D). El compuesto 1, administrado a razón de 5 y 10 mg/kg/día, aumentó considerablemente la EF y también disminuyó tanto el LVESV como el LVEDV en
10 comparación con el vehículo, de uno a tres meses (Figuras 4A-C), y redujo el contenido de colágeno intersticial (Figura 5D).

- Un estudio hemodinámico invasivo (a los 3 meses) mostró una conservación de Lv dP/dt máx. y LV dP/dt mín. en los animales tratados con el compuesto 1 a razón de 5 y 10 mg/kg/día en comparación con el vehículo (Figuras 6B y C), sin ningún cambio estadísticamente significativo en la presión sistólica de LV tras el tratamiento (Figura 6A).
15

No se observó ningún efecto en el peso corporal (BW), el tamaño del infarto o la hipertrofia (peso de LV) tras el tratamiento (Figuras 5A-C). Las concentraciones plasmáticas del fármaco están representadas en la Figura 7.

- Los resultados muestran que el compuesto 1, en concentraciones de tan solo 5 mg/kg/día, ejerce un efecto beneficioso tanto en la función cardíaca sistólica como en la diastólica en un modelo de insuficiencia cardíaca postisquémica crónica en ratas.
20

- El compuesto 1 era significativa y sorprendentemente más activo que el compuesto A, un derivado de benzodiazepina relacionado estructuralmente y descrito en el documento WO 2007/024717. Como muestra la Figura 8, el compuesto A, administrado en una concentración de 5 mg/kg/día durante 3 meses, no mejoró la función cardíaca sistólica y diastólica en comparación con el compuesto 1 en el modelo de insuficiencia cardíaca postisquémica crónica en ratas al final del estudio. Por consiguiente, después de 3 meses de tratamiento con una dosis de 5 mg/kg/día en el modelo de rata CHF se observaron efectos beneficiosos del compuesto 1, pero no del compuesto A.
25



Compuesto A

- 30 **Ejemplo 6: Efecto del compuesto 1 en la función muscular en un modelo de distrofia muscular en ratones (*mdx*)**

Objetivo

El objetivo de este estudio era analizar si el tratamiento con el compuesto 1 mejora la función muscular en un modelo de ratón con deficiencia de distrofina (*mdx*).

- 35 Metodología

- Ratones C57BL/10ScSn- DMD^{*mdx*}/J (abreviado como *mdx*, n = 5 por grupo), de 6 semanas de edad y aproximadamente 20 gramos al comienzo del estudio se aclimataron a jaulas con ruedas durante seis días antes de aleatorización en grupos que recibieron tratamiento con vehículo (H₂O) o dosis de objetivo de 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día o 50 mg/kg/día (dosis reales: 7,9 mg/kg/día, 12,8 mg/kg/día y 61,5 mg/kg/día, respectivamente, determinadas a partir del consumo de solución de fármaco medido semanalmente y dividido por el peso corporal) de la sal sódica del compuesto 1 (basada en el peso del fármaco original; en adelante la sal sódica se designa en este ejemplo como "compuesto 1") administrada en el agua de bebida *ad libitum* durante 4 semanas.
40

Durante las 3 primeras semanas se midieron la actividad voluntaria en la rueda, el peso corporal y el consumo medio de agua. La fuerza muscular específica se midió después de 4 semanas de tratamiento, al final del estudio.

- 5 La distancia recorrida (Km/día) a lo largo de un período de 24 horas se analizó como índice de la mejora de la actividad funcional (véase DMD_M.2.1.002 SOP en <http://www.treat-nmd.eu/>). Al concluir el estudio se aisló el músculo extensor largo de los dedos (*extensor digitorum longus* - EDL) para analizar la fuerza muscular tal como se describe más abajo. Al final del estudio se extrajo sangre de cada ratón mediante sangrado retroorbital (después de finalizar el ciclo de oscuridad - aproximadamente 7 AM) para evaluar las concentraciones plasmáticas del fármaco. Los experimentos eran experimentos a ciegas.

10 Mediciones de fuerza

- Al final del estudio se diseccionó el músculo EDL de las extremidades inferiores para el análisis de la fuerza isométrica utilizando el 407A Muscle Test System de Aurora Scientific (Aurora, Ontario, Canadá). En cada tendón se ató una sutura 6-0 y el músculo EDL completo, de tendón a tendón, se transfirió a un baño Ragnotti de O₂/CO₂ (95%/5%) de solución de Tyrode con burbujas (en mM: NaCl 121, KCl 5,0, CaCl₂ 1,8, MgCl₂, NaH₂PO₄, NaHCO₃ 24, y glucosa 5,5). Utilizando las suturas, un tendón se ató verticalmente a un gancho de acero inoxidable conectado con un transductor de fuerza. El otro tendón suturado se fijó hacia abajo en un brazo móvil del sistema Aurora. El músculo EDL se estimuló para que se contrajera utilizando un campo eléctrico entre dos electrodos de platino. Al comienzo de cada experimento, la longitud del músculo se ajustó para producir la fuerza máxima. Las relaciones fuerza-frecuencia se determinaron provocando la contracción usando frecuencias de estimulación crecientes (5-250 Hz durante 200 ms con voltaje superior al umbral). El músculo se dejó reposar ~3 minutos entre las estimulaciones. Al final de la medición de la fuerza se midió la longitud (L₀) del músculo EDL suturado en el sistema Aurora excluyendo los tendones. Después se retiró el músculo EDL del sistema y se pesó después de cortar los extremos de los tendones y las suturas. A continuación, el músculo EDL se congeló en nitrógeno líquido. El área de sección transversal (mm²) del músculo EDL se calculó dividiendo el peso del músculo EDL por la longitud del mismo y la constante de densidad muscular de mamíferos de 1,056 mg/m³ (Yamada, T., y col., *Arthritis and rheumatism* 60:3280-3289). Para determinar la fuerza específica del EDL (kN/m²), la fuerza tetánica absoluta se dividió por el área de sección transversal del músculo EDL.

Métodos estadísticos

- 30 Con el fin de determinar la significación estadística se utilizó un test t para realizar una comparación entre dos grupos. Todos los datos reunidos se expresaron como valor medio ± SEM.

Resultados

- Se analizó la capacidad del compuesto 1 para aumentar el ejercicio voluntario en ratones *mdx*. Después de aclimatar los ratones a la jaula con rueda de uso voluntario, la actividad voluntaria de los ratones en las 35 ruedas se controló mediante un ordenador 24/7. Los datos recogidos se transcribieron a la distancia recorrida al día a lo largo de 3 semanas. Los ratones *mdx* tratados con 10 y 50 mg/kg/día (dosis de objetivo) del compuesto 1 recorrieron en la rueda distancias considerablemente más largas que las recorridas por los ratones *mdx* tratados con vehículo (H₂O) solo ($P < 0,001$ desde el día 1 hasta el día 19). El efecto del tratamiento se observó ya 2-3 días después del inicio del tratamiento y continuó a lo largo de todo el período de control de la actividad. En el caso de los ratones WT tratados con 50 mg/kg/día del compuesto 1, no se observó ningún efecto del compuesto 1 en la distancia recorrida (Figura 9). Además, de acuerdo con la 40 determinación por mediciones de fuerza en el músculo EDL *in vitro* (Figura 10), el tratamiento con el compuesto 1 aumentó la fuerza específica en el músculo de los ratones *mdx* de forma dependiente de la dosis. Con frecuencias de estimulación de 150 Hz y más, los ratones *mdx* tratados con 50 mg/kg/día 45 mostraron un aumento estadísticamente significativo de la fuerza muscular específica ($P < 0,05$). En los ratones WT no se observó ningún efecto del tratamiento con el compuesto 1 en la fuerza muscular específica.

- Como muestra la Figura 11, el tratamiento con el compuesto 1 no afectó al peso corporal. No se observó ningún efecto dependiente de la dosis en el consumo de agua. La exposición sanguínea matutina del compuesto 1 (valor medio ± SEM) fue de $3,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ en el caso de los ratones *mdx* tratados con una dosis 50 de 5 mg/kg/día, $10,7 \pm 0,9 \mu\text{M}$ en el caso de los ratones *mdx* tratados con una dosis de 10 mg/kg/día, $52,8 \pm 1,7 \mu\text{M}$ en el caso de los ratones *mdx* tratados con una dosis de 50 mg/kg/día, y de $72,8 \pm 7,0 \mu\text{M}$ en el caso de los ratones WT tratados con una dosis de 50 mg/kg/día. En conjunto, los resultados muestran que, en comparación con los controles tratados con vehículo, el tratamiento con el compuesto 1 a razón de 10 mg/kg/día y 50 mg/kg/día (dosis de objetivo) aumentaba el ejercicio voluntario en la rueda después de 3 55 semanas y la fuerza muscular específica después de 4 semanas en ratones *mdx*, un modelo murino de distrofia muscular de Duchenne (DMD), demostrando así la utilidad del compuesto 1 y sus análogos, tal como se reivindican aquí, en el tratamiento de la distrofia muscular.

Ejemplo 7: Estabilidad metabólica

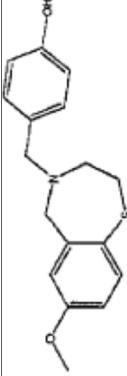
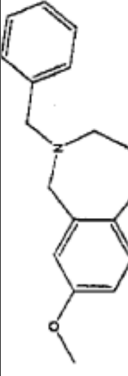
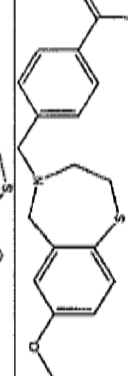
La estabilidad metabólica del compuesto 1, un Rycal representativo de acuerdo con la presente invención, se comparó con el compuesto B y el compuesto C, derivado de benzotiazepina relacionado estructuralmente y descrito en el documento WO 2007/024717.

5 A. Estabilidad metabólica en microsomas hepáticos humanosMétodos:

Solubilización del compuesto: Se prepararon soluciones madre en DMSO y soluciones de trabajo en agua que contenían 1 mg/ml de BSA.

- 10 Predicción de biodisponibilidad metabólica: las predicciones de biodisponibilidad metabólica (MF%) se basaron en mediciones de estabilidad metabólica *in vitro* con microsomas hepáticos en el supuesto de una absorción total. En pocas palabras, los fármacos no modificados se cuantificaron mediante CL-EM-EM después de incubación (10^{-7} M) con microsomas hepáticos de rata y humanos (0,33 mg proteína/ml) después de 0, 5, 15, 30 y 60 minutos de incubación en presencia de NADPH (1 mM). La reacción enzimática se detuvo con metanol (v/v) y las proteínas se precipitaron por centrifugación. Las tasas de eliminación intrínsecas *in vitro* (Clint_{mic}) expresadas como ml/min/g de proteína fueron las pendientes (después de linealización LN) de la concentración remanente de fármaco no alterado en función del tiempo de incubación. Después, los Clint *in vitro* se aumentaron a cuerpo total *in vivo* (vivoClint) utilizando 0,045 mg prot/kg de hígado y peso de hígado de 11 g en el caso de la rata y 1,2 kg en el caso del hombre. Los Clint *in vivo* se transformaron luego en tasas de eliminación hepáticas (HepCl) utilizando el modelo bien agitado ($HepCl = vivoClint * HBF / (vivoClint + HBF)$) registrándose el HBF (*hepatic blood flow* - flujo sanguíneo hepático) como 22 ml/min en el caso de la rata y 1500 ml/min en el caso del hombre. Después se dedujeron las MF% a partir de la tasa de extracción con la siguiente ecuación ($MF\% = 1 - HepCl/HBF$). Los resultados se presentan en la Tabla 1:
- 15
- 20

Tabla 1 Estabilidad en microsomas humanos

Compuesto	Estructura	Microsomas de rata			Microsomas humanos		
		Clint_mic rata ml/min/ gprot	MF mic %	Clase	Clint_mic hombre ml/min/ gprot	MF mic %	Clase
B		823	5	muy baja	285	6	muy baja
C		1926	2	muy baja	1326	2	muy baja
1		101	30	Intermedia	9,1	75	alta

a. Clint_mic: tasa de eliminación intrínseca *in vitro* en ml/min/g de proteína

b. MF%: biodisponibilidad metabólica en %

B. Estabilidad metabólica en hepatocitos hepáticos de rata y humanos

Solubilización del compuesto: Se prepararon soluciones madre en DMSO y soluciones de trabajo en medio de William que contenían 1/10 plasma de rata o 1/4 plasma humano.

- 5 Determinación de la estabilidad metabólica: Los compuestos se incubaron a 10^{-7} M con hepatocitos aislados (6E+5 células/ml en el caso de los hepatocitos de rata y 4E+5 células/ml en el caso de los hepatocitos humanos) a 37°C en plasma de las mismas especies diluido en medio de Williams (dilución 1/10 en el caso de las ratas y dilución 1/4 en el caso de los humanos). Los tiempos de toma de muestras se fijaron en 0, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos y la reacción enzimática se interrumpió con metanol (v/v). Las proteínas se precipitaron por centrifugación y el sobrenadante se analizó mediante CL/EM/EM. Los Clint expresados como ml/min/g de proteína se calcularon como para los microsomas hepáticos utilizando una proporción de 0,134 mg de proteína/ml para 4E+5 células/ml en el caso de los humanos y 0,201 mg de proteína/ml para 6E+5 células/ml en el caso de las ratas. La presencia del fármaco de referencia y el metabolito potencial se comprobó mediante CL/EM/EM durante el ensayo en cada muestra. La Tabla 2 muestra los resultados:

Tabla 2 Estabilidad en hepatocitos de rata y humanos

Comp.	Hepatocitos de rata			Hepatocitos humanos		
	Clint (ml/min/gprot)	MF rata %	Q cél. /ml	Clint (ml/min/gprot)	MF rata %	Q cél. /ml
B	1334	3	6,00E+05	693	3	4,00E+05
1	5	90	6,00E+05	0	100	4,00E+05
C	2610	2	6,00E+05	100	16	4,00E+05

- 15 a. Clint_{mic}: tasa de eliminación intrínseca *in vitro* en ml/min/g de proteína
 b. MF%: biodisponibilidad metabólica en %
 c. Q: cantidad de células por ml

C. Estabilidad metabólica en microsomas de ratón y rataMateriales y métodos

- 20 Tampón de dilución: Tampón Tris HCl 0,1M pH 7,4 que contenía EDTA 5 mM.

Solución de cofactor de NADPH: A un tubo Falcon de 50 ml que contenía 2,79 ml de tampón de dilución se le añadieron 0,429 ml de solución regeneradora de NADPH A y 0,079 ml de solución regeneradora de NADPH B.

- 25 Preparación de microsomas: (solución de 1,5 mg/ml) Un tubo Falcon de 50 ml que contenía 3,32 ml de tampón de dilución se precalentó a 37 °C durante 15 minutos (al menos 10 minutos). Luego se añadieron 0,178 ml de microsoma (24,6 mg/ml) al tampón de dilución precalentado. La concentración de proteína de esta preparación de microsomas era de 1,25 mg/ml.

- 30 Muestra (compuesto de ensayo) - Soluciones madre originales e intermedias: Se preparó una solución de 1 mg/ml (para el compuesto 1 se utilizaron 0,5 mg/ml) del compuesto de ensayo en metanol. También se preparó una solución intermedia 100 µM del compuesto de ensayo a partir de la solución madre original utilizando el tampón de dilución. Además se preparó una solución 5 µM diluyendo la solución intermedia 100 µM utilizando tampón de dilución.

Experimento: (Los experimentos se realizaron en tubos de microcentrífuga Eppendorf de 1,5 ml)

0 minutos de incubación. Procedimiento:

- 35 a. Añadir 100 µl de microsomas precalentados.
 b. Añadir 50 µl de solución 5 µM del compuesto de ensayo.
 c. Añadir 500 µl de solución de interrupción fría (metanol muy frío).
 d. Añadir 100 µl de solución de cofactor NSDPH al Eppendorf.
 a. Mezclar por vórtice el Eppendorf.

"t" minutos de incubación

- 40 b. Añadir 100 µl de solución de cofactor NSDPH al Eppendorf.
 c. Añadir 50 µl de solución 5 µM del compuesto de ensayo.
 d. Añadir 100 µl de microsomas precalentados.
 e. Incubar el Eppendorf a 37 °C 300 rpm durante 't' minutos en un termomezclador.
 45 f. Retirar el Eppendorf del termomezclador.
 g. Añadir 500 µl de solución de interrupción fría (metanol muy frío).

h. Mezclar por vórtice el Eppendorf.

Tanto las muestras incubadas durante '0' minutos como las incubadas durante 't' minutos se centrifugaron a 15.000 rcf a 4°C durante 154 minutos. Se retiraron 500 µl de la solución sobrenadante y se sometieron a análisis CL/EM (SIM - control de iones específicos).

- 5 Los resultados se expresan como % de compuesto de ensayo restante - (respuesta de área de EM de muestra de 't' minutos / respuesta de área de EM de muestra de '0' minutos) x 100. El área de EM se utiliza como un valor medio de inyecciones por duplicado.

Tiempos = 0, 15, 30 y 60 minutos para cada compuesto de ensayo.

Control positivo:

- 10 Como control positivo para los experimentos de estabilidad de microsomas de hígado de rata y ratón se utilizó imipramina 2 µM - 5 minutos e imipramina 2 µM - 15 minutos.

La Tabla 3 muestra los resultados.

Tabla 3 Estabilidad en microsomas de ratón y rata

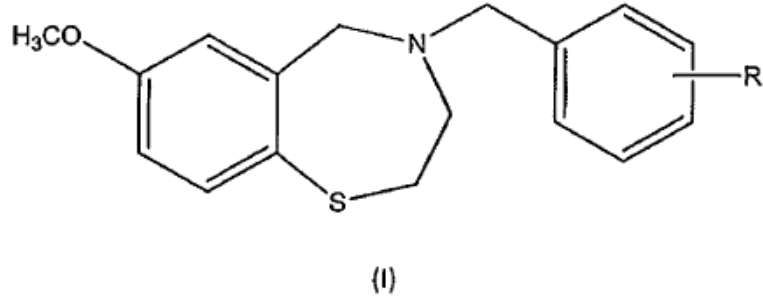
Estabilidad metabólica <i>in vitro</i>	Compuesto (1)	Compuesto B	Compuesto C
Microsomas de rata (% restante)			
15 minutos	54%	1%	0%
30 minutos	17%	0%	0%
1 hora	2%	0%	0%
Microsomas de ratón (% restante)			
15 minutos	99%	0%	0%
30 minutos	98%	0%	0%
1 hora	82%	0%	0%

- 15 Sorprendentemente, como muestran las Tablas 13, el compuesto 1 era considerablemente más estable en microsomas de ratón, de rata y humanos, y en hepatocitos de rata y humanos, en comparación con los compuestos B y C estructuralmente análogos dados a conocer en el documento WO 2007/024717. Se ha comprobado que estos dos presentan mala estabilidad metabólica *in vitro* en los sistemas ensayados, haciendo que estos compuestos sean inadecuados para el desarrollo como fármacos candidatos.
- 20 Sorprendente e inesperadamente, la sustitución de las fracciones de H y OH de los compuestos del estado anterior de la técnica por una fracción COOH condujo al compuesto 1, que presentó una alta estabilidad metabólica en todos los sistemas ensayados. De hecho, la mayor estabilidad metabólica del compuesto 1 en comparación con sus análogos estructurales fue sorprendente y corrobora los beneficios inesperados de este compuesto en comparación con compuestos conocidos en el estado actual de la técnica.

25

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la estructura de Fórmula (I):

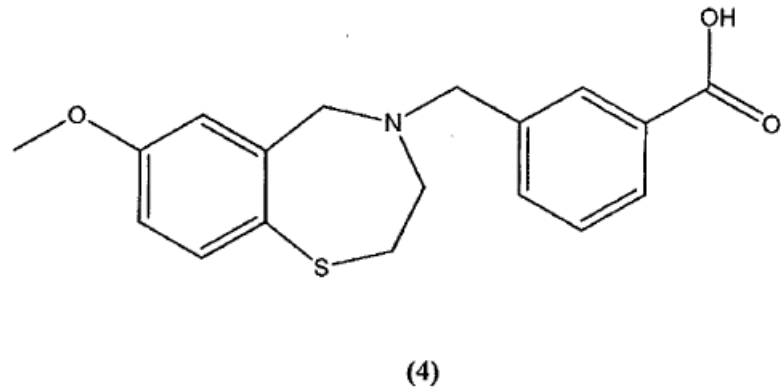
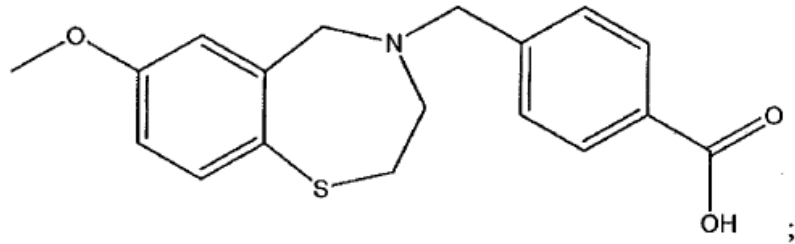


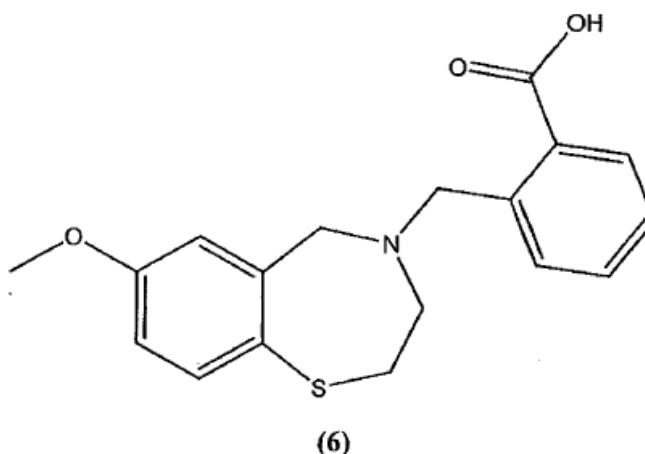
donde R es COOH;

- 5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

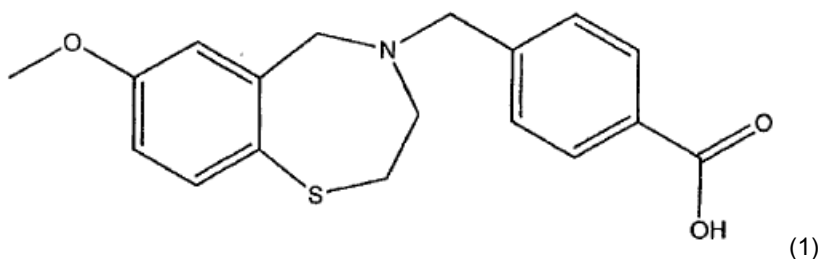
2. Compuesto según la reivindicación 1, en forma de una sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptables.
3. Compuesto según la reivindicación 2, caracterizado porque la sal se selecciona de entre el grupo consistente en sales de sodio, potasio, magnesio, hemifumarato, clorhidrato y bromhidrato.

- 10 4. Compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de entre el grupo consistente en





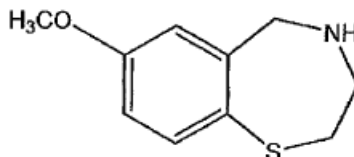
5. Compuesto según la reivindicación 1, que está representado por la estructura de Fórmula (1):



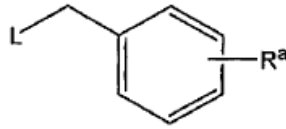
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 **6.** Compuesto según la reivindicación 5, en forma de una sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptables.
- 7.** Compuesto según la reivindicación 6, caracterizado porque la sal se selecciona de entre el grupo consistente en sales de sodio, potasio, magnesio, hemifumarato, clorhidrato y bromhidrato.
- 8.** Compuesto según la reivindicación 7, caracterizado porque la sal es sal de sodio.
- 10 **9.** Compuesto según la reivindicación 7, caracterizado porque la sal es sal hemifumarato.
- 10.** Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en combinación con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 15 **11.** Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su utilización en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de entre el grupo consistente en enfermedades o trastornos cardíacos, fatiga muscular, enfermedades y trastornos musculoesqueléticos, enfermedades y trastornos del SNC, disfunción cognitiva, enfermedades y trastornos neuromusculares, enfermedades y trastornos óseos, caquexia cancerosa, hipertermia maligna, diabetes, muerte súbita cardíaca y síndrome de la muerte súbita del lactante, o para mejorar la función cognitiva.
- 20 **12.** Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su utilización en el tratamiento o la prevención de una afección de acuerdo con la reivindicación 11, seleccionándose las enfermedades y trastornos cardíacos de entre el grupo consistente en enfermedades y trastornos de arritmia cardíaca tales como enfermedades y trastornos de arritmia cardíaca seleccionados entre el grupo consistente en arritmia auricular y ventricular, fibrilación auricular y ventricular, taquiarritmia auricular y ventricular, taquicardia auricular y ventricular, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC), y variantes de las mismas inducidas por ejercicio; enfermedades y trastornos de arritmia cardíaca inducida por ejercicio, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca descompensada aguda; daño por isquemia/reperfusión (I/R) cardíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, daño por I/R después de angioplastia coronaria o después de trombólisis para el tratamiento del infarto de miocardio (IM); e hipertensión.
- 25
- 30

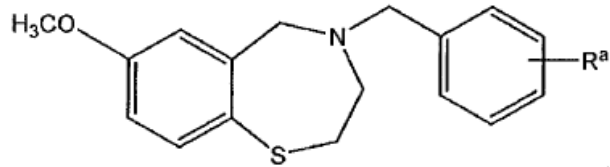
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención según la reivindicación 11, debiéndose la fatiga muscular a una enfermedad, trastorno o afección de los músculos esqueléticos.
- 5 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención según la reivindicación 11, seleccionándose la enfermedad, trastorno o afección de los músculos esqueléticos de entre el grupo consistente en fatiga musculoesquelética inducida por ejercicio; fatiga muscular debida a ejercicio prolongado o ejercicio de alta intensidad; miopatía congénita; distrofia muscular tal como distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), distrofia muscular de cintura y extremidades (DMCE), distrofia fascioescapulohumeral, distrofia muscular miotónica, distrofia muscular congénita (DMC), distrofia muscular distal, distrofia muscular de Emery-Dreifuss y distrofia muscular oculofaríngea; atrofia muscular espinal (AME), atrofia muscular espinal y bulbar (AMEB), fatiga muscular relacionada con la edad; sarcopenia, miopatía del núcleo central; caquexia cancerosa, trastornos vesicales; e incontinencia.
- 10 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención según la reivindicación 11, seleccionándose los trastornos y enfermedades del SNC de entre el grupo consistente en la enfermedad de Alzheimer (EA), neuropatía, crisis epilépticas, enfermedad de Parkinson (EP) y enfermedad de Huntington (EH); y seleccionándose los trastornos y enfermedades neuromusculares de entre el grupo consistente en ataxia espinocerebelosa (AEC), y esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehring).
- 15 16. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención según la reivindicación 11, estando la disfunción cognitiva relacionada con el estrés o con la edad, o consistiendo la función cognitiva a mejorar en memoria a corto plazo, memoria a largo plazo, atención o aprendizaje, o estando la disfunción cognitiva asociada con una enfermedad o trastorno seleccionado de entre el grupo consistente en la enfermedad de Alzheimer (EA), trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA), trastorno generalizado del desarrollo (TGD), trastorno de ansiedad generalizada (TAG), trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), enfermedad de Parkinson (EP), trastorno por estrés postraumático (TEPT), esquizofrenia, trastorno bipolar o depresión mayor.
- 20 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención según la reivindicación 11, consistiendo dicha afección en caquexia cancerosa.
- 25 18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, caracterizada porque la caquexia cancerosa se debe a un cáncer con metástasis óseas.
- 30 19. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección seleccionada de entre el grupo consistente en enfermedades o trastornos cardíacos, fatiga muscular, enfermedades y trastornos musculoesqueléticos, enfermedades y trastornos del SNC, disfunción cognitiva, enfermedades y trastornos neuromusculares, enfermedades y trastornos óseos, caquexia cancerosa, hipertermia maligna, diabetes, muerte súbita cardíaca y síndrome de la muerte súbita del lactante, o para mejorar la función cognitiva.
- 35 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 en combinación con un oligonucleótido antisentido (OA) que es específico para una secuencia de empalme en una secuencia de ARNm de interés, con el fin de aumentar el salto de exón en dicho ARNm de interés para su uso en el tratamiento o prevención según la reivindicación 11.
- 40 21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20 para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), siendo el oligonucleótido antisentido (OA) específico para una secuencia de empalme de al menos un exón del gen *DMD*.
- 45 22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, siendo el oligonucleótido antisentido (OA) específico para una secuencia de empalme del exón 23, 45, 44, 50, 51, 52 y/o 53 del gen *DMD*.
23. Proceso para la preparación de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que incluye el paso de someter a reacción un compuesto de fórmula



con un compuesto de fórmula



donde R^a es COOR¹ o CN; R¹ es alquilo(C₁-C₄) y L es un grupo saliente, para obtener un compuesto de fórmula:



5

convertir el grupo R^a en el grupo R para obtener un compuesto de fórmula (I). ; y

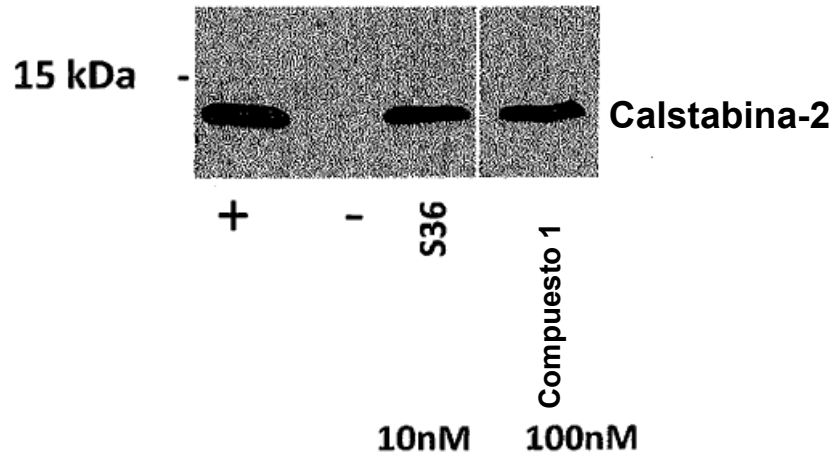


Figura 1A

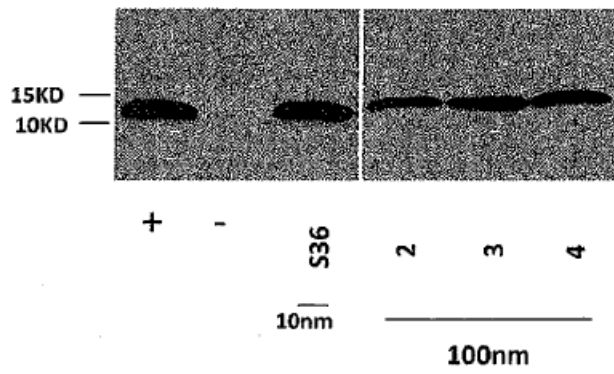


Figura 1B

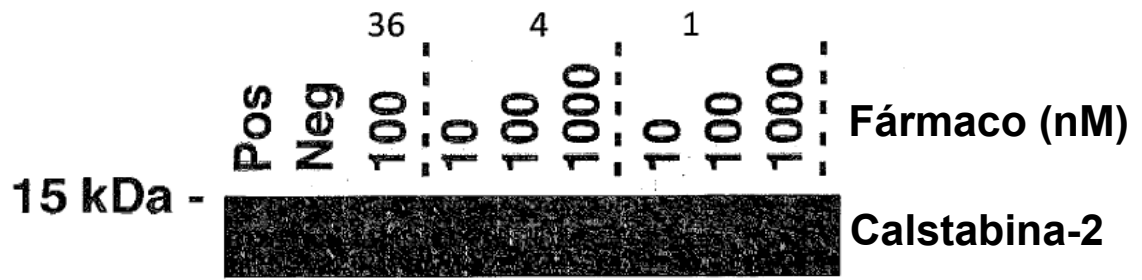


Figura 1C

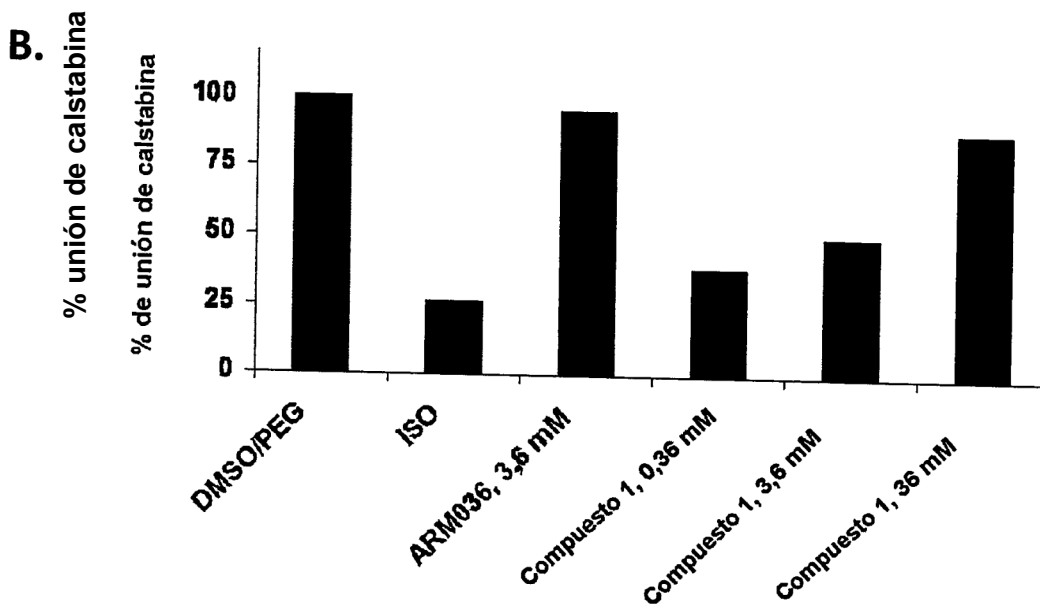
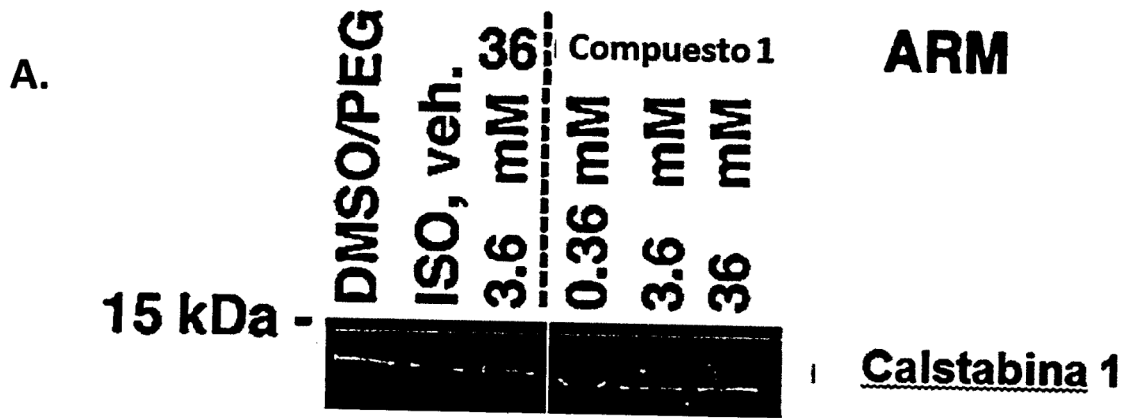


Figura 2

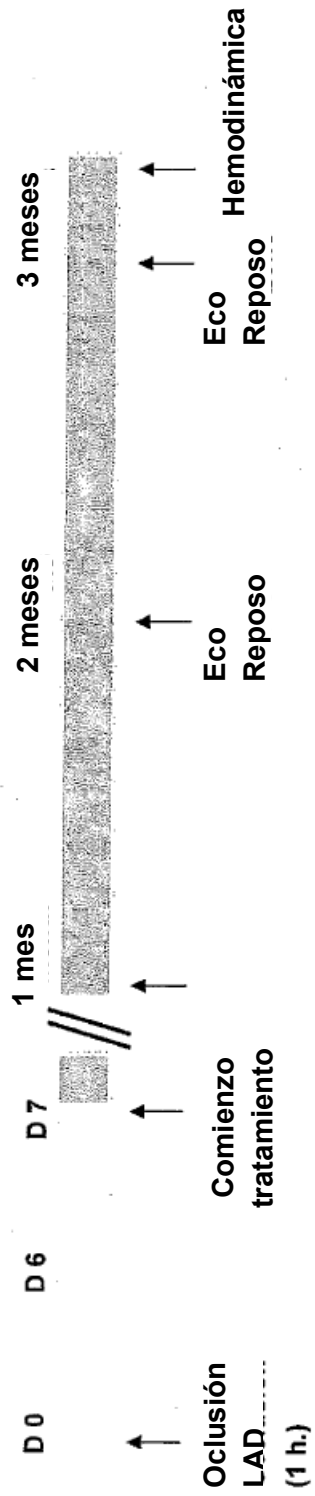


Figura 3

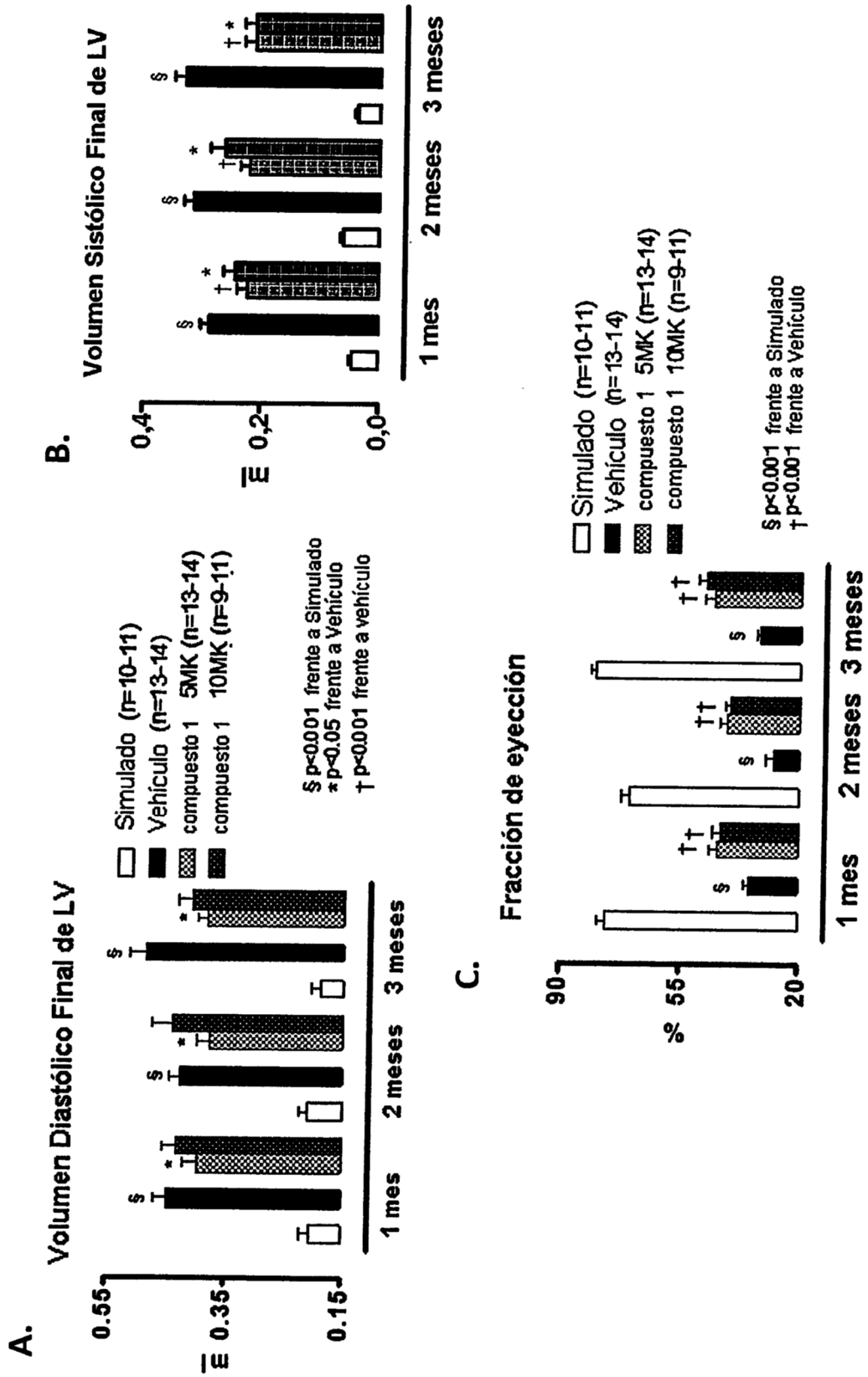


Figura 4

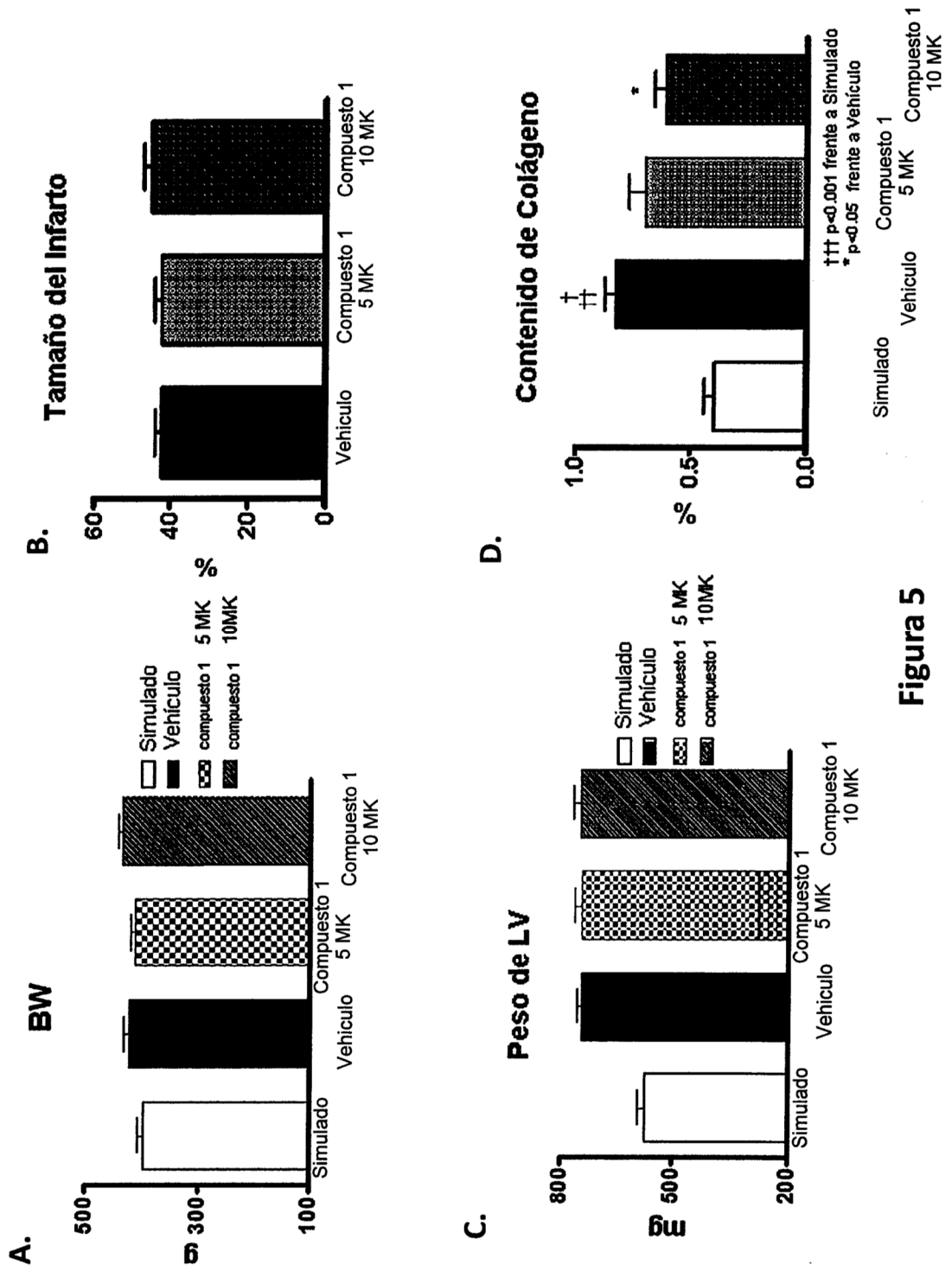


Figura 5

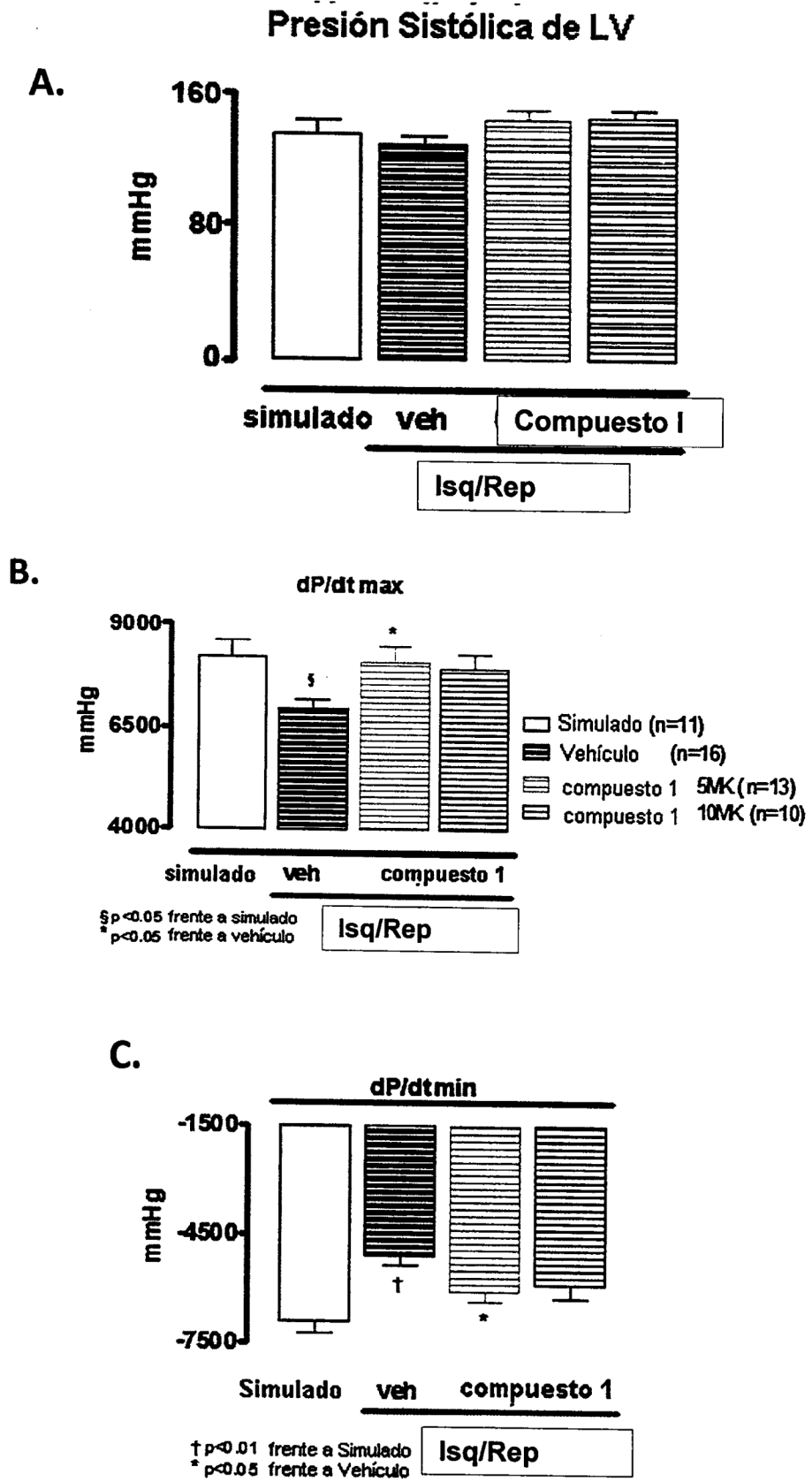


Figura 6

Concentraciones plasmáticas del compuesto 1

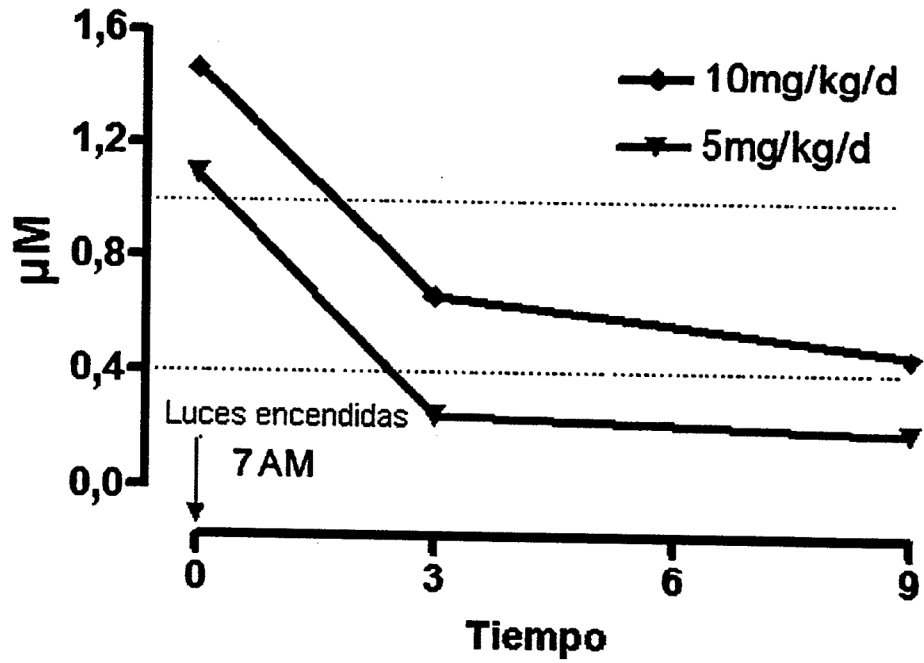


Figura 7

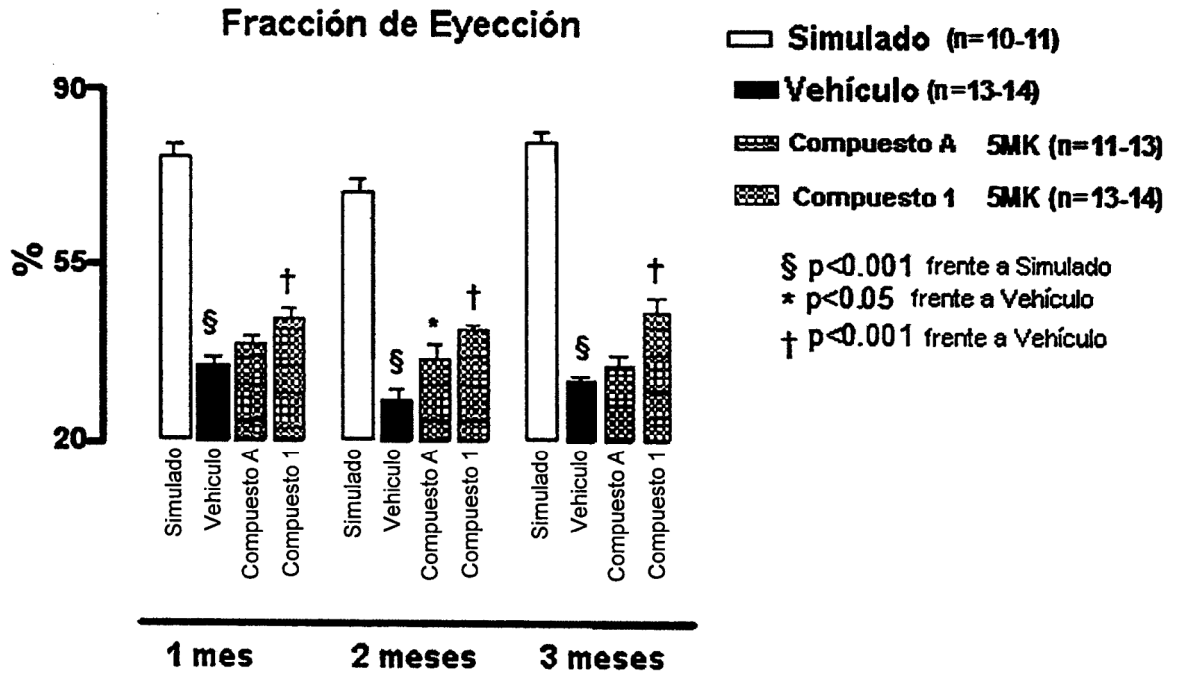


Figura 8

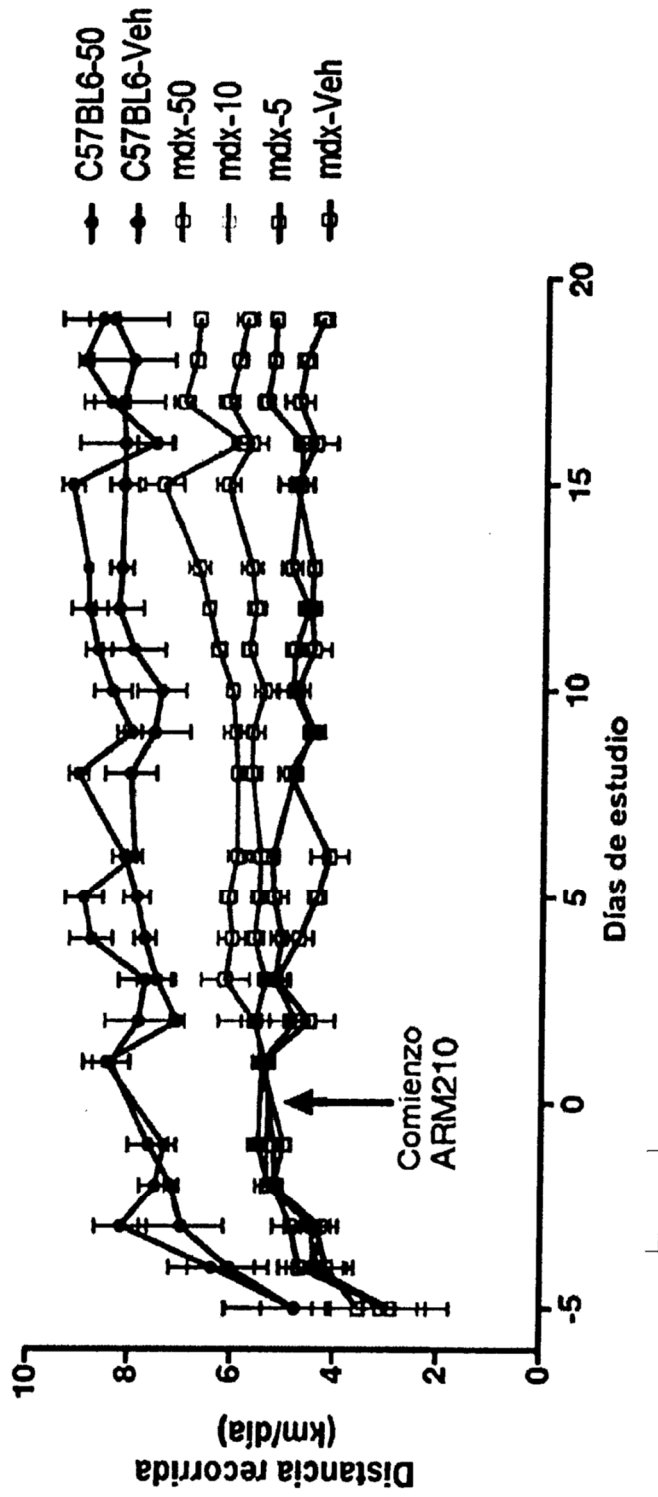


Figura 9

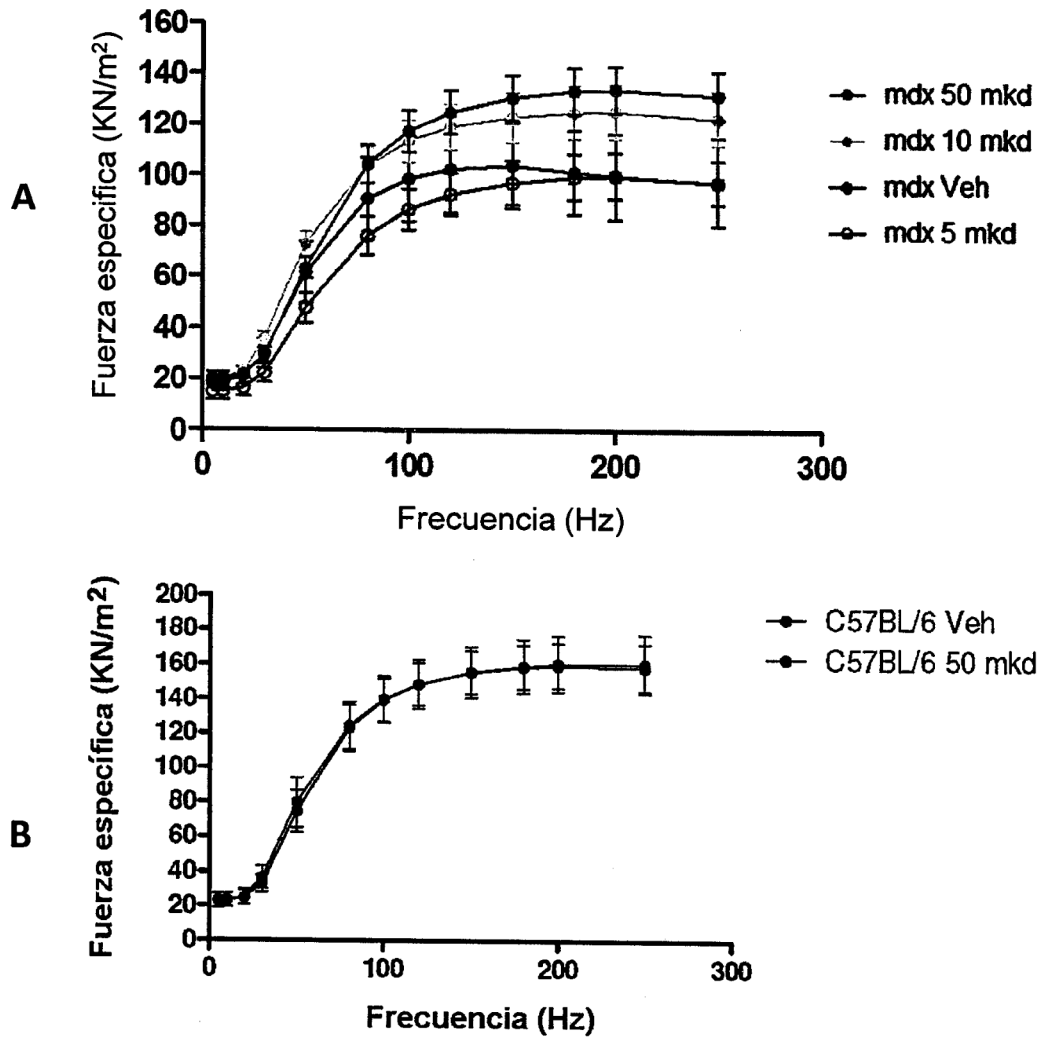


Figura 10

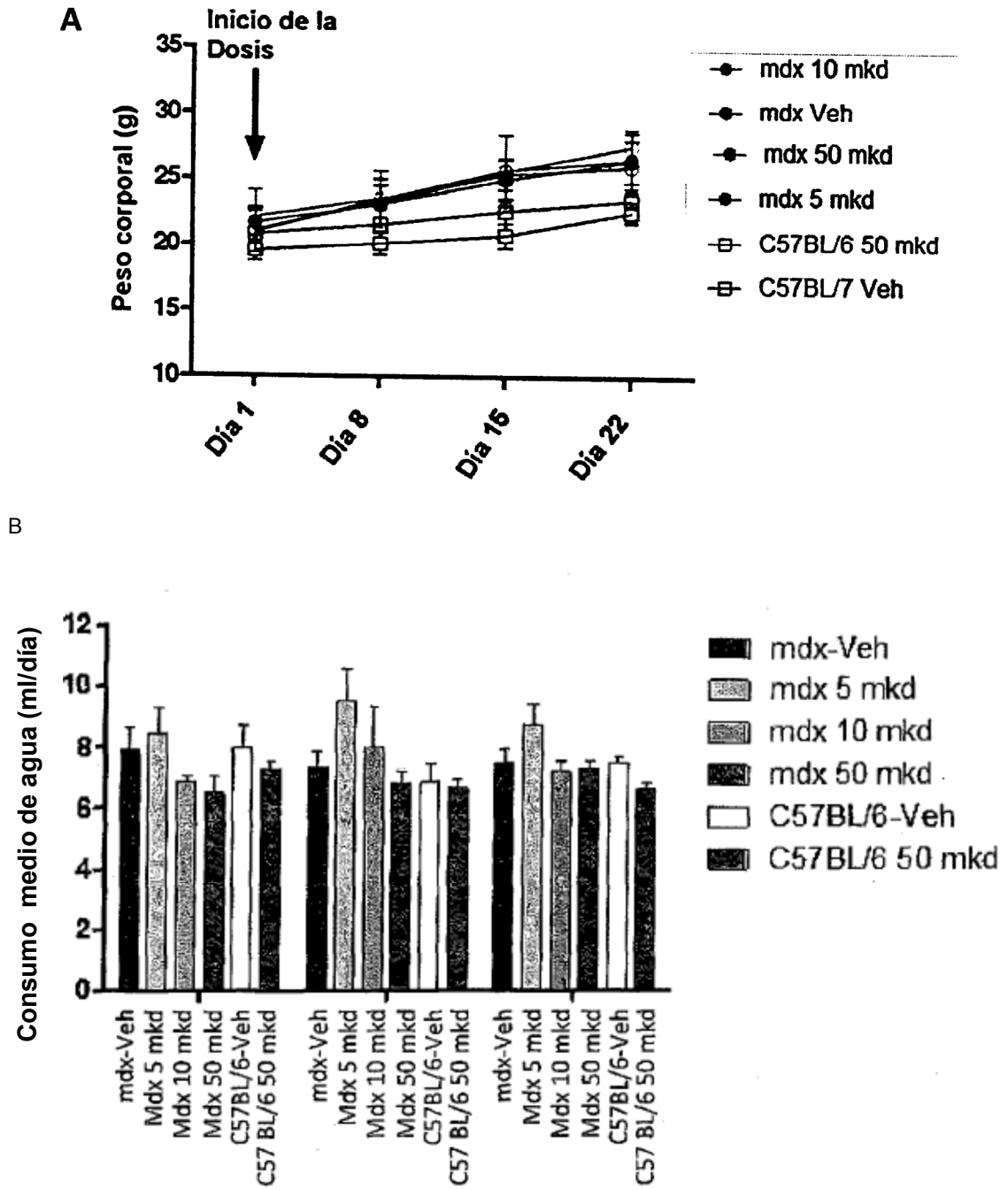


Figura 11