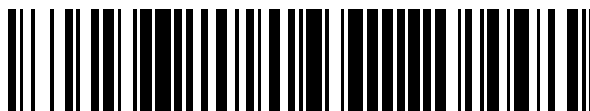


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 957**

51 Int. Cl.:

A61K 31/423 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2008** **PCT/GB2008/050648**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009** **WO09019504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008** **E 08788620 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016** **EP 2170396**

54 Título: **Combinaciones farmacológicas para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

03.08.2007 GB 0715088

21.04.2008 GB 0807216

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2017

73 Titular/es:

SUMMIT (OXFORD) LIMITED (100.0%)

85b Park Park Drive

MiltonAbingdonOX14 4RY, GB

72 Inventor/es:

WYNNE, GRAHAM MICHAEL;

WREN, STEPHEN PAUL;

JOHNSON, PETER DAVID;

PRICE, PAUL DAMIEN;

DE MOOR, OLIVIER;

NUGENT, GARY;

STORER, RICHARD;

PYE, RICHARD JOSEPH;

DORGAN, COLIN RICHARD y

TINSLEY, JONATHON MARK

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 617 957 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

Combinaciones farmacológicas para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a combinaciones que comprenden (o que consisten esencialmente en) el compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol y un corticosteroide seleccionado entre prednisona, prednisolona y deflazacort, y a diversos usos terapéuticos de las combinaciones. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen las combinaciones, así como un método de tratamiento de la Distrofia muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker o caquexia usando las combinaciones.

Antecedentes de la invención

15 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular genética común asociada al deterioro progresivo de la función muscular, descrita por primera vez hace más de 150 años por el neurólogo francés Duchenne de Boulogne, de quien recibe el nombre la enfermedad. La DMD se ha caracterizado como un trastorno recesivo ligado al cromosoma X que afecta a 1 de cada 3.500 hombres causado por mutaciones en el gen de la distrofina. El gen es el más grande del genoma humano, que abarca 2,6 millones de pares de bases de ADN y
20 contiene 79 exones. Aproximadamente el 60 % de las mutaciones de la distrofina son inserciones o deleciones grandes que conducen a errores de desplazamiento del marco de lectura aguas abajo, mientras que aproximadamente el 40 % son mutaciones puntuales o pequeñas transposiciones de desplazamiento del marco de lectura. La gran mayoría de los pacientes de DMD carecen de la proteína distrofina. La distrofia muscular de Becker es una forma mucho más leve de DMD causada por la reducción en la cantidad, o alteración en el tamaño, de la
25 proteína distrofina. La alta incidencia de DMD (1 en 10.000 espermatozoides u óvulos) significa que la selección genética nunca eliminará la enfermedad, por lo que es altamente deseable una terapia eficaz.

Existen varios modelos animales naturales y modificados por ingeniería genética de DMD, y proporcionan una base para los estudios preclínicos (Allamand, V. & Campbell, K. P. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools
30 for the development of therapies. Hum. Mol. Genet. 9, 2459-2467 (2000)). Aunque los modelos de ratón, gato y perro tienen todas las mutaciones en el gen *DMD* y presentan una distrofinopatía bioquímica similar a la observada en seres humanos, muestran una variación sorprendente y considerable en cuanto a su fenotipo. Al igual que los seres humanos, los modelos caninos (distrofia muscular de Golden retriever y Pointer alemán de pelo corto) tienen un fenotipo grave; estos perros mueren normalmente por insuficiencia cardíaca. Los perros ofrecen la mejor fenocopia
35 para la enfermedad humana y se consideran un buen punto de referencia para estudios preclínicos. Desafortunadamente, la cría de estos animales es cara y difícil y el transcurso de tiempo clínico puede ser variable entre las camadas.

El ratón *mdx* es el modelo más ampliamente usado debido a su disponibilidad, corto tiempo de gestación, tiempo
40 hasta la madurez y coste relativamente bajo (Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. Proc. Natl Acad. Sci. USA 81, 1189-1192 (1984)).

Desde el descubrimiento del gen de la DMD hace aproximadamente 20 años, se han logrado grados variables de éxito en el tratamiento de DMD en estudios preclínicos con animales, algunos de los cuales están continuándose en seres humanos. Las estrategias terapéuticas actuales pueden dividirse ampliamente en tres grupos: en primer lugar, enfoques de terapia génica; en segundo lugar, terapia celular; y por último, terapia farmacológica. Las terapias basadas en genes y células ofrecen la ventaja fundamental de obviar la necesidad de corregir por separado patología/defectos secundarios (por ejemplo, contracturas), especialmente si se inicia de manera temprana en el transcurso de la enfermedad. Desafortunadamente, estos enfoques se enfrentan a varios obstáculos técnicos. Se
45 han notificado las respuestas inmunológicas contra vectores víricos, mioblastos y distrofina recién sintetizada, además de toxicidad, falta de expresión estable y dificultad en la administración.

Los enfoques farmacológicos para el tratamiento de distrofia muscular difieren de los enfoques basados en genes y células en que no están diseñados para administrar el gen y/o la proteína que falta. En general, las estrategias farmacológicas usan fármacos/moléculas en un intento por mejorar el fenotipo por medios tales como disminuir la inflamación, mejorar la homeostasis del calcio y aumentar la proliferación o el compromiso de progenitores musculares. Estas estrategias ofrecen la ventaja de que son muy fáciles de administrar por vía sistémica y pueden evitar muchos de los problemas inmunológicos y/o de toxicidad que se relacionan con vectores y terapias basadas en células. Aunque las investigaciones con corticosteroides y cromoglicato sódico, para reducir la inflamación,
55

dantroleno para mantener la homeostasis del calcio, y clenbuterol para aumentar la fuerza muscular, han producido resultados prometedores, no se ha mostrado aún que ninguna de estas posibles terapias sea eficaz en el tratamiento de DMD.

- 5 Un enfoque farmacológico alternativo es la terapia de regulación por aumento. La terapia de regulación por aumento se basa en aumentar la expresión de genes alternativos para reemplazar un gen defectuoso, y es particularmente beneficiosa cuando se monta una respuesta inmunitaria contra una proteína ausente previamente. Se ha propuesto la regulación por aumento de la utrofina, un parólogo autosómico de la distrofina, como una posible terapia para DMD (Perkins & Davies, Neuromuscul Disord, S1: S78-S89 (2002), Khurana & Davies, Nat Rev Drug Discov 2: 379-390 (2003)). Cuando se sobreexpresa utrofina en ratones *mdx* transgénicos, se localiza en el sarcolema de células musculares y restaura los componentes del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), lo que previene el desarrollo distrófico y, a su vez, conduce a una mejora funcional del músculo esquelético. Se ha mostrado que la administración adenovírica de utrofina en el perro previene la patología. El comienzo del aumento de expresión de la utrofina poco tiempo después del nacimiento en el modelo de ratón puede ser eficaz y no se observa toxicidad cuando se expresa la utrofina de manera ubicua, lo que es prometedor para el traslado de esta terapia a seres humanos. La regulación por aumento de la utrofina endógena hasta niveles suficientes para disminuir la patología puede lograrse mediante la administración de compuestos pequeños que pueden difundirse.

Resumen de la invención

- 20 De acuerdo con la invención, se proporciona una combinación como se define en las reivindicaciones.

También se proporciona un método para el tratamiento o profilaxis de Distrofia muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker o caquexia en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una combinación de la invención.

Preferencias generales y definiciones

- 30 Las combinaciones de la invención pueden producir un efecto terapéuticamente eficaz con relación al efecto terapéutico de los compuestos individuales cuando se administran por separado.

El término "eficaz" incluye efectos ventajosos tales como aditividad, sinergia, efectos secundarios reducidos, toxicidad reducida, aumento del tiempo hasta el avance de la enfermedad, aumento del tiempo de supervivencia, sensibilización o resensibilización de un agente a otro, o tasa de respuesta mejorada. Ventajosamente, un efecto eficaz puede permitir que se administren a un paciente dosis menores de cada uno o de cualquier componente, disminuyendo así la toxicidad de la quimioterapia, produciendo y/o manteniendo al mismo tiempo el mismo efecto terapéutico.

Un efecto "sinérgico" en el presente contexto se refiere a un efecto terapéutico producido por la combinación que es mayor que la suma de los efectos terapéuticos de los componentes de la combinación cuando se presentan individualmente.

Un efecto "aditivo" en el presente contexto se refiere a un efecto terapéutico producido por la combinación que es mayor que el efecto terapéutico de cualquiera de los componentes de la combinación cuando se presenta individualmente.

Una "composición farmacéutica" es una composición sólida o líquida en una forma, concentración y nivel de pureza adecuados para la administración a un paciente (por ejemplo, un paciente humano o animal) después de cuya administración puede inducir los cambios fisiológicos deseados. Las composiciones farmacéuticas son típicamente estériles y/o no pirógenas. El término *no pirógeno* según se aplica a las composiciones farmacéuticas de la invención, define composiciones que no provocan respuestas inflamatorias indeseables cuando se administran a un paciente.

Como se usan en el presente documento, las expresiones *agente movilizador* y *movilización* son términos de la técnica que se refieren a agentes y tratamientos que sirven para promover la migración de células CD34⁺, madre, progenitoras y/o precursoras de la médula a la sangre periférica (para una revisión, véase, por ejemplo, Cottler-Fox y col. (2003) Stem cell mobilization Hematology: 419-437). Los agentes estándar actuales para la movilización adecuados para su uso de acuerdo con la invención incluyen G-CSF (Filgrastim™, Amgen), GM-CSF (Sargramostim™, Berlex, Richmond, CA) y eritropoyetina (que tiene cierta actividad movilizante en las células w.r.t.

CD34⁺). Los agentes alternativos incluyen factor de células madre (SCF) (que es particularmente eficaz al usarse en combinación con G-CSF) y diversos derivados de G-CSF (Pegfilgrastim™, Amgen) y eritropoyetina (Darbopoietin®, Amgen). Estos últimos agentes se benefician de semividas prolongadas y, por lo tanto, aumentan la ventana temporal disponible para la recolección. AMD3100 (AnorMed™, Vancouver, Canadá), que es un inhibidor reversible de la unión del factor derivado del estroma (SDF-1a) a su receptor específico CXCR4, está actualmente en ensayos clínicos como un agente movilizador. Otros agentes incluyen docetaxel (véase, por ejemplo, Prince y col. (2000) Bone Marrow Transplantation 26: 483-487).

La expresión "regulación por aumento de la utrofina", como se usa en el presente documento, incluye un aumento de la expresión o la sobreexpresión de utrofina, incluyendo amplificación génica (es decir, múltiples copias de genes) y aumento de la expresión por efecto transcripcional, e hiperactividad y activación de utrofina, incluyendo activación por mutaciones. La expresión "agente de regulación por aumento de la utrofina" debe interpretarse en consecuencia. Por lo tanto, la regulación por aumento de la utrofina cubre el aumento de la actividad de la utrofina a nivel del ADN codificante, así como el nivel de transcripción, traducción o postraducción. Los compuestos preferidos de fórmula (I) son reguladores por aumento de la utrofina (como se desvela en el presente documento).

Como se usa en el presente documento, el término "combinación", como se aplica a dos o más compuestos y/o agentes (también denominados en el presente documento como los *componentes*), pretende definir el material en el que están asociados los dos o más compuestos/agentes. Los términos "combinado" y "combinar" en este contexto deben interpretarse en consecuencia.

La asociación de los dos o más compuestos/agentes en una combinación puede ser física o no física. Los ejemplos de compuestos/agentes combinados físicamente asociados incluyen:

- composiciones (por ejemplo, formulaciones unitarias) que comprenden los dos o más compuestos/agentes en mezcla (por ejemplo, dentro de la misma dosis unitaria);
- composiciones que comprenden material en el que los dos o más compuestos/agentes están química/fisicoquímicamente ligados (por ejemplo, por entrecruzamiento, aglomeración molecular o unión a un resto de vehículo común);
- composiciones que comprenden material en el que los dos o más compuestos/agentes están química/fisicoquímicamente co-empaquetados (por ejemplo, dispuestos en o dentro de vesículas lipídicas, partículas (por ejemplo, micro o nanopartículas) o gotas de emulsión);
- kits farmacéuticos, envases farmacéuticos o paquetes de paciente en los que los dos o más compuestos/agentes están co-empaquetados o co-presentados (por ejemplo, como parte de un conjunto de dosis unitarias);

Los ejemplos de compuestos/agentes combinados no físicamente asociados incluyen:

- material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes junto con instrucciones para la asociación extemporánea del al menos un compuesto/agente para formar una asociación física de los dos o más compuestos/agentes;
- material (por ejemplo, una formulación no unitaria) que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes junto con instrucciones para la terapia de combinación con los dos o más compuestos/agentes;
- material que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes junto con instrucciones para la administración a una población de pacientes en la que se ha administrado (o se está administrando) el otro u otros de los dos o más compuestos/agentes;
- material que comprende al menos uno de los dos o más compuestos/agentes en una cantidad o en una forma que se adapta específicamente para su uso en combinación con el otro u otros de los dos o más compuestos/agentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "terapia de combinación" pretende definir terapias que comprenden el uso de una combinación de dos o más compuestos/agentes (como se ha definido anteriormente). Por lo tanto, las referencias a "terapia de combinación", "combinaciones" y el uso de compuestos/agentes "en combinación" en esta solicitud pueden referirse a compuestos/agentes que se administran como parte del mismo régimen de tratamiento global. Como tal, la posología de cada uno de los dos o más compuestos/agentes puede diferir: cada uno puede administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes. Por lo tanto, se apreciará que los compuestos/agentes de la combinación pueden administrarse secuencialmente (por ejemplo, antes o después) o simultáneamente, ya sea en la misma formulación farmacéutica (es decir, conjuntamente), o en diferentes

formulaciones farmacéuticas (es decir, por separado). Simultáneamente en la misma formulación es en forma de una formulación unitaria, mientras que simultáneamente en diferentes formulaciones farmacéuticas es no unitaria. Las posologías de cada uno de los dos o más compuestos/agentes en una terapia de combinación también pueden diferir con respecto a la vía de administración.

5

Como se usa en el presente documento, la expresión "kit farmacéutico" define un conjunto de una o más dosis unitarias de una composición farmacéutica junto con medios dosificadores (por ejemplo, dispositivo de medición) y/o medios de administración (por ejemplo, inhalador o jeringa), opcionalmente todos contenidos dentro del envase exterior común. En los kits farmacéuticos que comprenden una combinación de dos o más compuestos/agentes, los compuestos/agentes individuales pueden ser formulaciones unitarias o no unitarias. La dosis o las dosis unitarias pueden estar contenidas dentro de un envase blíster. El kit farmacéutico puede comprender opcionalmente además instrucciones de uso.

10

Como se usa en el presente documento, la expresión "envase farmacéutico" define un conjunto de una o más dosis unitarias de una composición farmacéutica, opcionalmente contenida dentro del envase exterior común. En los envases farmacéuticos que comprenden una combinación de dos o más compuestos/agentes, los compuestos/agentes individuales pueden ser formulaciones unitarias o no unitarias. La dosis o las dosis unitarias pueden estar contenidas dentro de un envase blíster. El envase farmacéutico puede comprender opcionalmente además instrucciones de uso.

15

Como se usa en el presente documento, la expresión "paquete para paciente" define un envase, prescrito a un paciente, que contiene composiciones farmacéuticas para todo el transcurso del tratamiento. Los paquetes para pacientes normalmente contienen uno o más paquetes blíster. Los paquetes para pacientes tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en los que un farmacéutico divide el suministro de un paciente de un producto farmacéutico de un suministro a granel, en el que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el paquete del paciente, que normalmente falta en las recetas del paciente. Se ha demostrado que la inclusión de un prospecto mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico.

20

Las combinaciones de la invención pueden producir un efecto terapéuticamente eficaz en relación con el efecto terapéutico de los compuestos/agentes individuales cuando se administran por separado.

25

La expresión "agente auxiliar", como se usa en el presente documento, puede definir un compuesto/agente que produce una combinación eficaz (como se define en el presente documento) al combinarse con un compuesto de la fórmula (1) como se define en el presente documento. Por lo tanto, el agente auxiliar puede actuar como un complemento al compuesto de la fórmula (1) como se define en el presente documento, o puede contribuir de otro modo a la eficacia de la combinación (por ejemplo, produciendo un efecto sinérgico o aditivo o mejorando la tasa de respuesta, como se define en el presente documento).

30

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" define anticuerpos enteros (incluyendo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales (Mabs)). El término se usa también en el presente documento para referirse a fragmentos de anticuerpos, incluyendo F(ab), F(ab')₂, Fv, Fc3 y anticuerpos monocatenarios (y combinaciones de los mismos), que pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. El término "anticuerpo" también se usa en el presente documento para cubrir anticuerpos biespecíficos o bifuncionales que son anticuerpos híbridos sintéticos que tienen dos pares diferentes de cadena pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de métodos, incluyendo la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. También se incluyen por el término "anticuerpo" los anticuerpos quiméricos (anticuerpos que tienen un dominio de inmunoglobulina de anticuerpo constante humano acoplado a uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpo variable no humano, o fragmentos de los mismos). Por lo tanto, tales anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "humanizados". También se incluyen por el término "anticuerpo" los minicuerpos (véase el documento WO 94/09817), fusiones Fv-Fc monocatenarias y anticuerpos humanos producidos por animales transgénicos. El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos multiméricos y complejos de proteínas de orden superior (por ejemplo, anticuerpos heterodiméricos).

35

40

55 Corticosteroides

Definición y actividades biológicas: El término "corticosteroide" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de varias hormonas esteroides secretadas por la corteza de las glándulas suprarrenales y que están implicadas en uno o más de los siguientes procesos fisiológicos: respuesta al estrés, respuesta inmunitaria y

regulación de la inflamación, el metabolismo de los carbohidratos, el catabolismo de proteínas y los niveles de electrolitos en sangre. El término también incluye análogos sintéticos que comparten las propiedades que se han mencionado anteriormente. Los corticosteroides incluyen glucocorticoides y mineralocorticoides. Los glucocorticoides controlan el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas y son antiinflamatorios.

- 5 Los mineralocorticoides controlan los niveles de electrolitos y agua, principalmente promoviendo la retención de sodio en el riñón. Algunos corticosteroides tienen actividades glucocorticoideas y mineralocorticoideas duales. Por ejemplo, la prednisona (véase más adelante) y sus derivados, tienen una acción mineralocorticoide además de un efecto glucocorticoide. Todavía no se conocen el mecanismo o mecanismos celulares precisos por los que los corticosteroides producen efectos antidistróficos. Es probable un mecanismo multifactorial y los efectos de los
- 10 corticosteroides probablemente implican una reducción de la inflamación, la supresión del sistema inmunológico, la mejora en la homeostasis del calcio, la regulación por aumento de la expresión de proteínas compensatorias y un aumento de la proliferación de mioblastos.

- Problemas:* El uso de corticosteroides está asociado a efectos secundarios que varían de persona a persona y en la
- 15 dosificación del régimen utilizado, pero pueden ser graves. Los efectos secundarios más comunes son el aumento de peso y los cambios de humor. El aumento de peso (y los cambios concomitantes en la actividad muscular y el uso) pueden abrogar algunos de los beneficios del tratamiento. Un uso a largo plazo puede conducir a la supresión del crecimiento, cataratas, osteoporosis y atrofia muscular (que afecta a los mismos músculos proximales afectados en DMD y BMD). Estos efectos secundarios pueden limitar la eficacia a largo plazo de la terapia con
- 20 corticosteroides. Otros efectos secundarios incluyen hipertensión, diabetes, atrofia de la piel, mala cicatrización de heridas e inmunosupresión. Se evaluó Deflazacort con la esperanza de que tendría menos efectos secundarios que la prednisona.

- De acuerdo con la invención, la combinación comprende (o consiste esencialmente en) prednisona, prednisolona o
- 25 deflazacort. Deflazacort es un análogo oxazolina de la prednisona.

- Posología:* La prednisona puede administrarse a diario en dosis que varían de 0,3 a 1,5 mg/kg (típicamente 0,7 mg/kg). Algunos pacientes responden mejor a $\geq 2,5$ mg/kg cada dos días. Deflazacort tiene una equivalencia de dosis estimada de 1:1,3 en comparación con la prednisona, aunque la equivalencia biológica entre deflazacort y prednisona también depende de las acciones específicas bajo examen. Los corticosteroides (incluyendo deflazacort y
- 30 prednisona) se toman normalmente por vía oral, pero pueden administrarse por inyección intramuscular.

Ejemplos

- La actividad del compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol para su uso en el tratamiento de DMD
- 35 puede demostrarse en el siguiente ensayo predictivo y cribados.

1. Ensayo de indicador de luciferasa (células H2K murinas)

- La línea celular usada para el cribado es una línea celular H2K de ratón *mdx* immortalizada que se ha transfectado
- 40 de manera estable con un plásmido que contiene un fragmento de ≈ 5 kb del promotor de la utrofina A que incluye el primer exón no traducido ligando a un gen indicador de luciferasa. En condiciones de baja temperatura y medio que contiene interferón, las células permanecen como mioblastos. Éstas se colocan en placas de 96 pocillos y se cultivan en presencia de compuesto durante tres días. Después, se determina el nivel de luciferasa mediante lisis celular y lectura de la salida de luz a partir del gen de luciferasa expresado utilizando un luminómetro de placa. En la
- 45 Figura 1 se muestra un ejemplo de la respuesta a la dosis farmacológica de compuestos en el ensayo.

2. Ratón *mdx*

- Se priorizaron los datos obtenidos a partir de los datos de ADMET y se priorizaron los compuestos con la mejor
- 50 actividad luciferasa *in vitro* y datos de ADMET razonables para las pruebas en el estudio de prueba de concepto de *mdx* en el que el desenlace era identificar si cualquiera de los compuestos tenía la capacidad de aumentar los niveles de la proteína utrofina en músculo deficiente en distrofina en comparación con animales control dosificados únicamente con vehículo.

- 55 Había dos animales a los que se les inyectó hasta 50 mg/kg (por ejemplo, 10 mg/kg) de compuesto administrado por vía i.p. a diario durante 28 días más controles de edad coincidente. Se tomaron muestras de músculo y se procesaron para el seccionado (para identificar aumentos en la tinción del sarcolema de utrofina) e inmunotransferencia de tipo Western (para identificar aumentos globales en los niveles de utrofina).

La Figura 2 muestra un ejemplo de secciones de músculo TA teñidas con anticuerpo específico para utrofina de ratón. La comparación con el músculo *mdx* inyectado únicamente con vehículo muestra un aumento en la cantidad de utrofina unida al sarcolema. También se extirparon músculos de los ratones tratados anteriormente y se procesaron para la transferencia de tipo Western y se tiñeron con anticuerpos específicos (véase la Figura 3). De nuevo, el uso de músculo en el que se dosificó CPD-A muestra un aumento significativo en los niveles globales de utrofina presente tanto en el músculo de pata TA como en el diafragma. Ambos ratones expuestos a CPD-A (V2 y V3) mostraron un aumento de los niveles de expresión de utrofina en comparación con el control. Después, se repitieron los datos de regulación por aumento positivos del primer estudio de 28 días en un estudio adicional de 28 días con dos ratones. Un total de tres compuestos diferentes han mostrado por duplicado la capacidad de aumentar el nivel de expresión de utrofina en el ratón *mdx* al administrarse a diario por vía i.p. durante 28 días. Estos datos demuestran la capacidad del compuesto, al administrarse por vía i.p., de provocar un aumento significativo en los niveles de utrofina que se encuentran en el músculo *mdx* y, por lo tanto, aporta la confianza de que este enfoque mejorará la enfermedad, ya que todos los datos publicados hasta la fecha demuestran que cualquier aumento de los niveles de utrofina por encima de tres veces tiene efectos funcionales significativos sobre el músculo deficiente en distrofina.

Mantenimiento de la línea celular indicadora H2K/mdx/Utro A

Se realizaron pases de la línea celular indicadora H2K/mdx/Utro A dos veces a la semana hasta $\leq 30\%$ de confluencia. Las células se cultivaron a $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de un CO_2 al 10% . Para eliminar los mioblastos para la colocación en placas, se incubaron con tripsina/EDTA hasta que comenzó a desprenderse la monocapa.

Medio de crecimiento

DMEM Gibco 41966
FCS al 20%
Pen/Estrep. al 1%
Glutamina al 1%
10 ml de extracto de embrión de pollo
Interferón (1276 905 Roche) Añadir $10\text{ }\mu\text{l}/50\text{ ml}$ de medio recién preparado

Ensayo de luciferasa para placas de 96 pocillos

Las células de la línea celular indicadora H2K/mdx/Utro A se colocaron en placas de 96 pocillos (Falcon 353296, blancas, opacas) a una densidad de aproximadamente 5000 células/pocillo en $190\text{ }\mu\text{l}$ de medio de crecimiento normal. Después, las placas se incubaron a $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ en presencia de CO_2 al 10% durante 24 h. Los compuestos se dosificaron añadiendo $10\text{ }\mu\text{l}$ de compuesto diluido a cada pocillo dando una concentración final de $10\text{ }\mu\text{M}$. Después, las placas se incubaron durante 48 h más. Después, las células se lisaron *in situ* siguiendo los protocolos del fabricante (sistema de ensayo de luciferasa Promega Steady-Glo (E2520)). Después, se realizó un recuento durante 10 segundos usando luminómetro de placa (Victor1420).

Almacenamiento de compuestos

Los compuestos para cribad se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ como soluciones madre 10 mM en DMSO al 100% hasta que se necesitaron.

Inyección de ratones *mdx* con compuestos

Se seleccionaron *mdx* de una colonia de cría para el ensayo. A los ratones se les inyectó a diario vehículo o 10 mg/kg de compuesto usando la vía intraperitoneal (i.p.). Los ratones se pesaron y los compuestos se diluyeron en DMSO al 5% , Tween al $0,1\%$ en PBS.

Se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical en los puntos de tiempo deseados y se extirparon los músculos para el análisis.

Análisis de músculosInmunohistoquímica

- 5 Se diseccionaron los tejidos para el seccionado, se sumergieron en OCT (Bright Cryo-M-Bed) y se congelaron sobre isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Se cortaron criosecciones de 8 μ M no fijadas en un criostato de Bright, y se almacenaron a -80 °C.

10 Cuando estuvieron listas para la tinción, las secciones se bloquearon en suero de ternero fetal al 5 % en PBS durante 30 min. Los anticuerpos primarios se diluyeron en reactivo de bloqueo y se incubaron sobre las secciones durante 1,5 h en una cámara húmeda, y después se lavaron tres veces durante 5 min en PBS. También se diluyeron los anticuerpos secundarios en reactivo de bloqueo, se incubaron durante 1 h en la oscuridad en una cámara húmeda. Finalmente, las secciones se lavaron tres veces durante 5 min en PBS y el cubreobjetos se montó con Hydromount. Se analizaron los portaobjetos usando un microscopio fluorescente Leica.

Resultados

La actividad biológica se evalúa usando el ensayo de indicador luciferasa en células H2K murinas, y se clasifica como se indica a continuación:

- + Hasta un 200 % con respecto a control
 ++ Entre el 201 % y el 300 % con respecto a control
 +++ Entre el 301 % y el 400 % con respecto a control
 ++++ Por encima del 401 % con respecto a control

Tabla 1: Compuesto hecho por los métodos descritos en el presente documento

Ejemplo	Nombre Químico	Actividad
390	5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol	+++

Método 1B (Compuestos I)30 **2-Bencil-5-nitrobenzo[d]oxazol**

A 2-amino-4-nitrofenol (300 mg, 1,95 mmol) en dioxano (2,5 ml) se le añadió cloruro de 2-fenilacetilo (290 μ l, 2,15 mmol) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción se calentó en el microondas a 210 °C durante 15 min. Después de la refrigeración, la mezcla se vertió lentamente en hidróxido sódico acuoso 1 M (50 ml), y el precipitado resultante se filtró y se lavó con agua. El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna eluyendo usando un gradiente (acetato de etilo/hexanos, 1:7 v/v a acetato de etilo/hexanos, 1:5 v/v) para proporcionar 165 mg (33 %) del compuesto del título (**TR de LCMS** = 6,47 min, MH^+ 255,2) **¹H NMR (DMSO)**: 8,60 (1 H, d, *J* 2,4 Hz), 8,30 (1 H, dd, *J* 9,0, 2,4 Hz), 7,95 (1 H, d, *J* 9,0 Hz), 7,43-7,27 (5H, m), 4,44 (2H, s)

40 El compuesto que se indica a continuación se preparó siguiendo el mismo método general. El cloruro de ácido usado era un compuesto disponible en el mercado o se sintetizó a partir del ácido carboxílico correspondiente usando condiciones estándar.

5-(Etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol

45 **TR de LCMS** = 6,94 min, MH^+ 338,1; **¹H NMR (DMSO)**: 8,90 (1 H, a), 8,34 (1 H, d, *J* 1,4 Hz), 8,30 (1 H, dd, *J* 8,6, 1,7 Hz), 8,24-8,05 (4H, m), 7,99 (1 H, dd, *J* 8,5, 1,8 Hz), 7,73-7,64 (2H, m), 3,41 (2H, c, *J* 7,3 Hz), 1,15 (3H, t, *J* 7,3 Hz)

50 Efecto sinérgico de combinaciones con prednisona

El efecto de las combinaciones del compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol con un corticosteroide (prednisolona) se examinó midiendo la fatiga inducida por un régimen de ejercicio forzado en ratones *mdx*.

55 Se obligó a ratones *mdx* machos de cuatro a cinco semanas de edad a hacer ejercicio (30 min de carrera en cinta andadora horizontal a 12 m/min dos veces a la semana el mismo día y a la misma hora) durante un transcurso de tratamiento de cinco semanas. Cada grupo de tratamiento incluía 6 ratones.

Al final del transcurso de tratamiento, se indujo el agotamiento por carrera en una cinta andadora horizontal a 5 m/min durante 5 min, con aumentos de velocidad progresivos de 1 m/min cada minuto hasta el agotamiento. Después, se midió la distancia recorrida total.

5

El tratamiento incluía dosificar (ip) 50 mg/kg de 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol a diario durante 5 semanas, en solitario y en combinación con prednisolona. Los grupos sedentario y de vehículo en solitario actuaron como controles negativos.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Muestran que la prednisolona (PDN) y 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol (CMPD1) pueden actuar en sinergia para reducir la fatiga inducida por ejercicio en el ratón *mdx*.

10

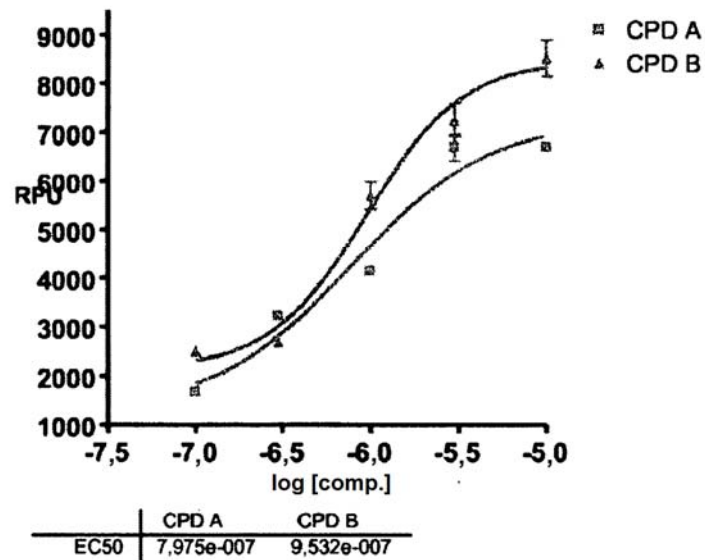
Equivalentes

Los ejemplos anteriores se presentan con el propósito de ilustrar la invención y no deben interpretarse como si
15 impusieran alguna limitación al alcance de la invención. Será evidente fácilmente que pueden hacerse numerosas modificaciones y alteraciones en las realizaciones específicas de la invención que se ha descrito anteriormente y se ilustra en los ejemplos, sin apartarse de los principios subyacentes de la invención. Se pretende que todas estas modificaciones y alteraciones estén incluidas por esta solicitud, que está limitada por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende (o que consiste esencialmente en) el compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol y un corticosteroide seleccionado entre prednisona, prednisolona y deflazacort.
5
2. La combinación de la reivindicación 1, en la que el corticosteroide y el compuesto están físicamente asociados.
3. La combinación de la reivindicación 2, en la que el corticosteroide y el compuesto están: (a) en mezcla
10 (por ejemplo, dentro de la misma dosis unitaria); (b) química/fisicoquímicamente ligados (por ejemplo, por entrecruzamiento, aglomeración molecular o unión a un resto de vehículo común); (c) química/fisicoquímicamente co-empaquetados (por ejemplo, dispuestos en o dentro de vesículas lipídicas, partículas (por ejemplo, micro o nanopartículas) o gotas de emulsión); (d) sin mezclar, pero co-empaquetados o co-presentados (por ejemplo, como parte de un conjunto de dosis unitarias).
15
4. La combinación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en un método de tratamiento terapéutico y/o profiláctico de Distrofia muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker o caquexia
5. Un envase farmacéutico, kit o paquete para paciente que comprende una combinación como se define
20 en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. Un corticosteroide seleccionado entre prednisona, prednisolona y deflazacort para su uso en terapia de combinación con el compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol.
- 25 7. El compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol para su uso en terapia de combinación con un corticosteroide seleccionado entre prednisona, prednisolona y deflazacort.
8. El corticosteroide para su uso de la reivindicación 6, o compuesto para su uso de la reivindicación 7, en el que la terapia de combinación comprende el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de Distrofia muscular de
30 Duchenne, Distrofia muscular de Becker o caquexia.
9. Un corticosteroide seleccionado entre prednisona, prednisolona y deflazacort para su uso en el tratamiento o profilaxis de Distrofia muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker o caquexia en un paciente sometido a tratamiento con el compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol.
35
10. El compuesto 5-(etilsulfonil)-2-(naftalen-2-il)benzo[d]oxazol para su uso en el tratamiento o profilaxis de Distrofia muscular de Duchenne, Distrofia muscular de Becker o caquexia en un paciente sometido a tratamiento con un corticosteroide seleccionado entre prednisona, prednisolona y deflazacort.

Figura 1 Inducción de luciferasa dependiente de la dosis



CPD A - 5-amino-2-(5,6-dimetilbenzo[d]oxazol-2-il)fenol

CPD B - 2-(4-(dietilamino)fenil)-6-metil-2H-benzo[d][1,2,3]triazol-5-amina

Figura 2 Un ejemplo de secciones de músculo TA teñidas con anticuerpo específico para utrofina de ratón

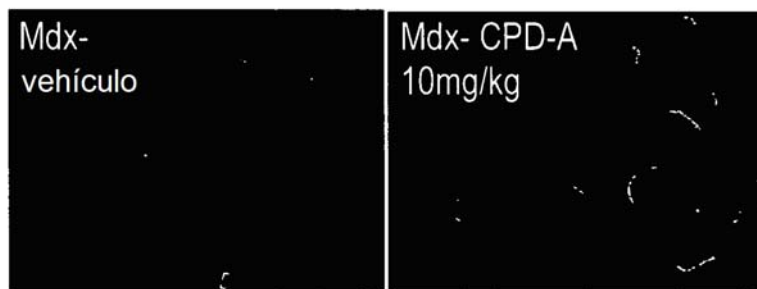


Figura 3 Ratones expuestos a CPD-A (V2 y V3) mostraron un aumento de los niveles de expresión de utrofina en comparación con el control:

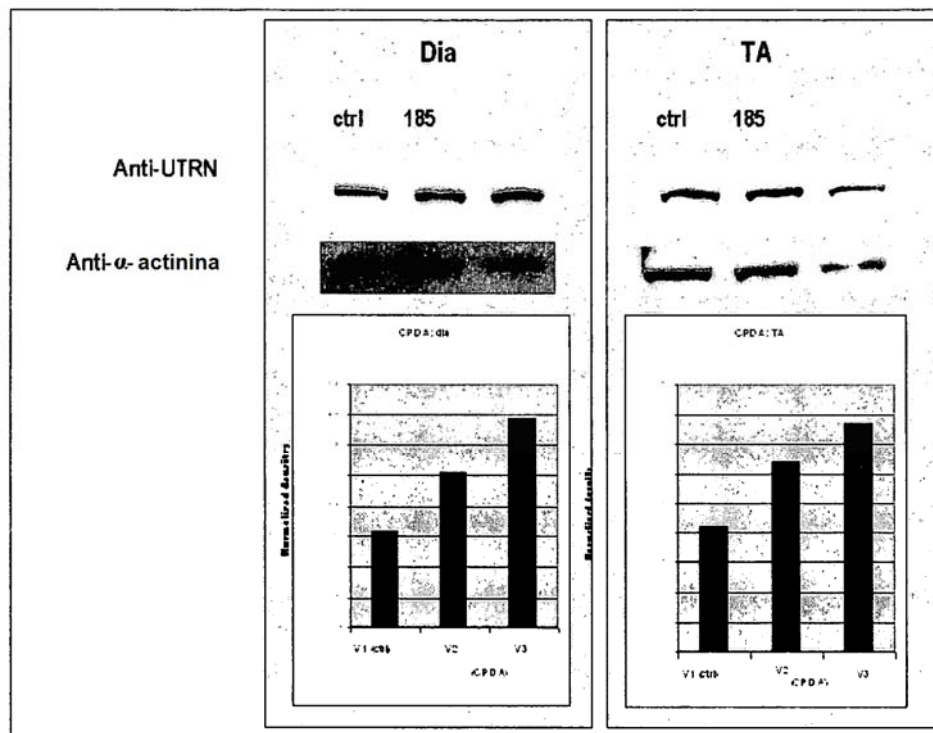
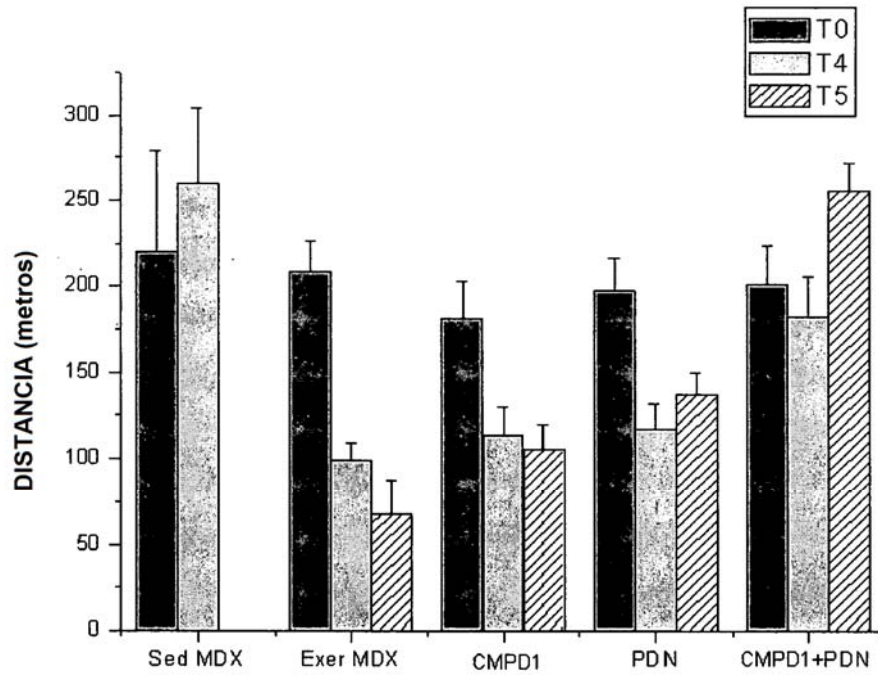


Figura 4 Sinergia con prednisona en ensayo de reducción de la fatiga



Resistencia a carrera en cinta andadora, expresada como carrera de distancia máxima (en metros) a T0, después de 4 (T4) y 5 semanas (T5). Cada barra es la media $\pm$ S.E.M de 3-7 animales