

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 512**

51 Int. Cl.:

A61K 31/435 (2006.01)

C07D 215/08 (2006.01)

A61P 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/EP2013/069298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13762527 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2903612**

54 Título: **Derivados de tetrahydroquinolina y su uso como inhibidores de Epac**

30 Prioridad:

02.10.2012 EP 12306201

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

20.03.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (25.0%);
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11 (25.0%) y
UNIVERSITÉ D'ORLÉANS (25.0%)**

72 Inventor/es:

**FISCHMEISTER, RODOLPHE;
BISSERIER, MALIK;
BOUYSSOU, PASCAL;
LEZOUALC'H, FRANK;
BLONDEAU, JEAN-PAUL y
COURILLEAU, DELPHINE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 749 512 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

Derivados de tetrahydroquinolina y su uso como inhibidores de Epac

5 **[0001]** La invención se refiere a derivados de tetrahydroquinolina, su uso como inhibidores de Epac y sus usos farmacéuticos.

[0002] La adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (cAMP) es un segundo mensajero universal que desempeña un papel crucial en la transducción de señales intracelulares de diversos estímulos que controlan una amplia diversidad de eventos celulares incluyendo secreción, proliferación y diferenciación celular, migración, y apoptosis. Se ha demostrado que la Epac (proteína de intercambio directamente activada por AMP cíclica) del factor de intercambio de guanina (GEF) contribuye a la señalización de cAMP en muchos procesos (M. Breckler et al., *Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications*, Cell. Signal. 23 (2011) 1257-1266).

15 **[0003]** Hay dos isoformas de Epac, Epac1 y Epac2, que consisten ambas en una región reguladora que se une directamente a cAMP y una región catalítica que promueve el intercambio de GDP (Guanosina difosfato) por GTP (Guanosina-5'-trifosfato) en las isoformas de GTPasas pequeñas de tipo Ras Rap1 y Rap2. En ausencia de AMPc, la región reguladora que contiene el dominio de unión a AMPc interactúa directamente con la región catalítica e inhibe su actividad de GEF. La unión de cAMP a Epac induce grandes cambios conformacionales dentro de la proteína y libera el efecto autoinhibidor de la región N-terminal, lo que lleva a la activación de Rap.

[0004] Las dos isoformas de Epac difieren en que Epac1 tiene un único dominio de unión a nucleótidos cíclico (CNB), mientras que Epac2 tiene dos dominios CNB, llamados CNB-A y CNB-B, que están ubicados en ambos lados del dominio DEP (Dominio Dishevelled, Egl-10 y Pleckstrina). El dominio CNB N-terminal adicional en Epac2 tiene una baja afinidad por cAMP, y su eliminación no afecta a la regulación de Epac2 en respuesta a los agonistas (J. de Rooij, H. Rehmann, M. van Triest, et al., *Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs*, J. Biol. Chem. 275 (2000) 20829-20836).

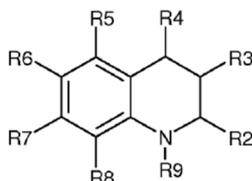
[0005] Epac desempeña papeles importantes en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos tales como formación de memoria, inflamación y remodelación cardíaca (J.M. Enserink, et al., *A novel Epac-specific cAMP analog demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK*, Nat. Cell Biol. 4 (2002) 901-906; Breckler et al., 2011). Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar antagonistas de Epac. También existe la necesidad de proporcionar compuestos que inhiban los efectores aguas abajo tales como Rap 1 y Ras después de la activación de Epac por los agonistas de Epac. También existe la necesidad de proporcionar antagonistas de Epac que puedan usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades en las que Epac está involucrada, tales como inflamación, cáncer, enfermedades vasculares, enfermedades renales, enfermedades cognitivas y enfermedades cardíacas.

[0006] El objetivo de la invención es proporcionar nuevos antagonistas de Epac.

40 **[0007]** Otro objetivo de la invención es proporcionar nuevos antagonistas de Epac que inhiban los efectores aguas abajo de Epac, incluso cuando Epac se ha activado previamente por agonistas.

[0008] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos antagonistas de Epac que pueden ser útiles para la prevención y/o el tratamiento de inflamación, cáncer, enfermedades vasculares, enfermedades renales, enfermedades cognitivas y enfermedades cardíacas.

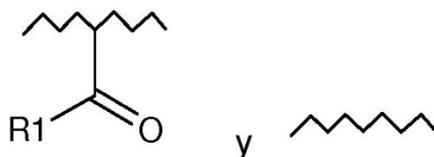
[0009] Por lo tanto, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula (I):



(I)

50 en la que:

- R9 es



es la unión al átomo de nitrógeno de la tetrahydroquinolina;

5 - R1, R2, R3, R4 y R8 se eligen independientemente del grupo que consiste en: H, alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₁₀), arilo (C₆-C₁₀), alquilen (C₁-C₆)-arilo (C₆-C₁₀) y heteroarilo (C₃-C₁₀); estando dichos grupos arilo y heteroarilo sustituidos posiblemente por al menos un sustituyente elegido de OH, NH₂, NO₂, alquilo (C₁-C₆) y halógeno;

- R5 es un átomo de halógeno;

10

- R6 y R7 se eligen independientemente del grupo que consiste en H y átomos de halógeno;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas o sus estructuras cristalinas polimórficas, racematos, diastereómeros o enantiómeros,

15 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en la que está involucrada la proteína Epac, y en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en inflamación, cáncer, enfermedades vasculares, enfermedades renales y enfermedades cardíacas, y

en el que dicho compuesto de fórmula (I) es un inhibidor selectivo de la isoforma Epac 1.

20 **[0010]** Los inventores han descubierto sorprendentemente que los derivados de tetrahydroquinolina inhiben la proteína Epac. Esta inhibición conduce a la inhibición de la activación de Rap1 y Ras inducida por Epac. Aún más sorprendente, los derivados de tetrahydroquinolina inhiben los efectores aguas abajo de Epac Rap1 y Ras tras la activación de Epac por agonistas de Epac.

25 **[0011]** Además, se ha demostrado que estos derivados de tetrahydroquinolina son inhibidores farmacológicos de la función biológica de Epac, ya que bloquean un proceso biológico dependiente de Epac1, la señalización de hipertrofia de miocitos cardíacos. Estudios previos demostraron que, en respuesta a una estimulación prolongada de β-AR (receptores beta adrenérgicos), Epac indujo la hipertrofia de miocitos cardíacos (Morel E; et al., *cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy* Circ Res. 2005 Dec 9;97(12):1296-304. Epub 2005 Nov 3; Metrich M. et al., *Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy*. Circ Res. 2008 Apr 25;102(8):959-65. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164947. Epub 2008 Mar 6).

30 **[0012]** Según la invención, los compuestos de fórmula (I) son inhibidores selectivos de Epac1. En una realización, los inhibidores selectivos de Epac1 son compuestos que exhiben un efecto inhibitor sobre la isoforma Epac1. Más particularmente, generalmente exhiben un efecto inhibitor sobre Epac1 y un efecto inhibitor moderado o nulo sobre la isoforma Epac2.

40 **[0013]** Por "inhibidor selectivo de Epac1" puede entenderse la capacidad de los inhibidores de Epac1 para afectar a la isoforma Epac1 particular, con preferencia a la otra isoforma Epac2. Los inhibidores selectivos de Epac1 pueden tener la capacidad de discriminar entre estas dos isoformas y, por lo tanto, afectan esencialmente a la isoforma Epac1.

45 **[0014]** En una realización, pueden exhibir una relación de inhibición de Epac1 frente a Epac2 de al menos 10 veces. En una realización, los compuestos de fórmula (I) no inhiben la proteína cinasa A (también llamada PKA). En una realización, los compuestos de fórmula (I) no son inhibidores competitivos de AMPc.

[0015] El término "inhibidor" debe entenderse como "antagonista".

50 **[0016]** Por "una enfermedad en la que está implicada la proteína Epac" se entiende una enfermedad en la que la proteína Epac se expresa o sobreexpresa, y/o muta.

55 **[0017]** El término "alquilo (C₁-C₁₀)" significa un grupo hidrocarburo alifático saturado o insaturado que puede ser lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena. Los grupos alquilo preferidos tienen de 1 a 4 átomos de carbono en la cadena, los grupos alquilo preferidos son en particular grupos metilo o etilo. "Ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo o propilo, están unidos a una cadena de alquilo lineal.

60 **[0018]** El término "alquilen (C₁-C₆)-" significa un radical divalente hidrocarburo alifático saturado o insaturado que puede ser lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, un alquilen (C₁-C₆)-arilo (C₆-C₁₀) preferido es un grupo bencilo.

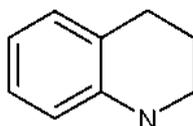
[0019] Por "cicloalquilo (C₃-C₁₀)" se entiende un grupo hidrocarburo saturado cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, en particular grupos ciclopropilo o ciclohexilo.

5 **[0020]** El término "arilo (C₆-C₁₀)" se refiere a un sistema anular hidrocarburo monocíclico, bicíclico o tricíclico aromático en el que cualquier átomo del anillo apto para sustitución puede estar sustituido por un sustituyente. Los ejemplos de restos arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo.

10 **[0021]** El término "heteroarilo (C₃-C₁₀)" se refiere a un sistema anular hidrocarburo monocíclico, bicíclico o tricíclico aromático, en el que cualquier átomo del anillo apto para sustitución puede estar sustituido por un sustituyente, y en el que uno o más átomos de carbono son reemplazados por uno o más heteroátomos tales como uno o más átomos de nitrógeno, uno o más átomos de oxígeno y uno o más átomos de sulfuro; por ejemplo, 1 o 2 átomos de nitrógeno, 1 o 2 átomos de oxígeno, 1 o 2 átomos de sulfuro o una combinación de diferentes heteroátomos, tal como 1 átomo de nitrógeno y 1 átomo de oxígeno. Los grupos heteroarilo preferidos son grupos piridilo, pirimidilo y oxacilo.

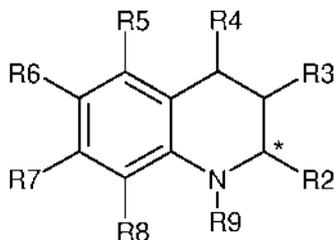
15 **[0022]** El término "halógeno" se refiere a los átomos del grupo 17 de la tabla periódica e incluye en particular átomos de flúor, cloro, bromo y yodo, más preferiblemente átomos de flúor, cloro y bromo.

20 **[0023]** Por "tetrahydroquinolina" se entiende el siguiente grupo:



25 **[0024]** Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo asimétricamente sustituido se pueden aislar en formas ópticamente activas o racémicas. Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tal como por resolución de formas racémicas o por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. Se prevén todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas y todas las formas isoméricas geométricas de un compuesto, a menos que la estereoquímica o la forma isomérica se indiquen específicamente. En una realización, el átomo de carbono al que se hace referencia con (*) en la fórmula (I) con R₂ a R₉ como se ha definido anteriormente puede ser (R) o (S):

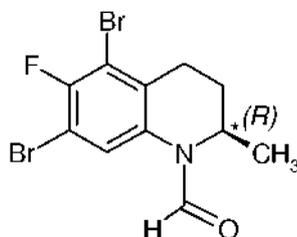
30



(I)

35 **[0025]** En una realización, es (R). En una realización particular, se prefiere la forma enantiomérica (R) del compuesto de fórmula (I) y, más particularmente, la siguiente forma enantiomérica:

35

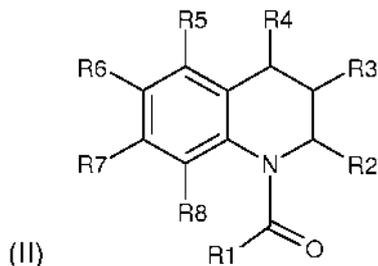


40 **[0026]** En otra realización, la forma enantiomérica (R) del compuesto de fórmula (I) es un antagonista de cAMP más potente que la forma racémica y enantiomérica (S) del compuesto de fórmula (I). En una realización, la forma enantiomérica (R) del compuesto de fórmula (I) es un inhibidor selectivo de Epac1. Dicha forma enantiomérica (R) puede inhibir la actividad GEF de Epac1 con 10 veces más eficiencia que la forma enantiomérica (S).

[0027] El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de la invención y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Las sales

de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos, mientras que las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables, véase Berge, et al. ((1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1). Por ejemplo, las sales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, así como sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, fumárico, metanosulfónico y toluenosulfónico, y similares.

10 **[0028]** En una realización particular, los compuestos de la invención tienen la siguiente fórmula (II):



en la que

15

- R1, R2, R3, R4 y R8 se eligen independientemente del grupo que consiste en: H, alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₁₀), arilo (C₆-C₁₀), alquilen (C₁-C₆)-arilo (C₆-C₁₀) y heteroarilo (C₃-C₁₀); estando dichos grupos arilo y heteroarilo sustituidos posiblemente por al menos un sustituyente elegido de OH, NH₂, NO₂, alquilo (C₁-C₆) y halógeno;

20 - R5 es un átomo de halógeno;

- R6 y R7 se eligen independientemente del grupo que consiste en H y átomos de halógeno;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas o sus estructuras cristalinas polimórficas, racematos, diastereómeros o enantiómeros,
25 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad en la que está involucrada la proteína Epac.

[0029] En una realización particular, en la fórmula (II), como se ha definido anteriormente, R1 es H.

30 **[0030]** Las realizaciones anteriores se refieren a la fórmula (I) o a la fórmula (II).

[0031] En una realización particular, R2 es H o un alquilo (C₁-C₁₀).

En una realización particular, R2 es un alquilo (C₁-C₁₀). Preferentemente, R2 es un alquilo (C₁-C₄).

Más preferentemente, R2 es un grupo metilo. En otra realización, R2 es H. Preferentemente, R2 es H o un grupo
35 metilo.

[0032] En una realización particular, R3 es H.

En otra realización, R4 es H.

En otra realización, R8 es H.

40 En una realización, R3, R4 y R8 son H.

[0033] En una realización particular, el grupo heteroarilo (C₃-C₁₀) se elige del grupo que consiste en grupos piridilo, pirimidilo y oxazilo.

45 **[0034]** En otra realización, el grupo arilo (C₆-C₁₀) es un grupo fenilo.

[0035] En otra realización, el alquilen (C₁-C₆)-arilo (C₆-C₁₀) es un grupo bencilo.

[0036] En una realización particular, R5 se elige del grupo que consiste en F, Cl, Br e I.

50

[0037] Preferentemente, R5 es Br.

[0038] En una realización particular, R6 se elige del grupo que consiste en H, F, Cl, Br e I.

En una realización particular, R6 se elige del grupo que consiste en F, Cl, Br e I.

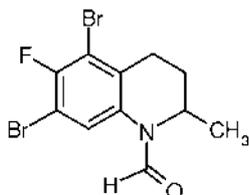
55 En otra realización, R6 es F. En otra realización, R6 es H. Preferentemente, R6 es H o F.

[0039] En una realización particular, R7 se elige del grupo que consiste en H, F, Cl, Br e I.
 En una realización particular, R7 se elige del grupo que consiste en F, Cl, Br e I.
 En otra realización, R7 es Br. En otra realización, R7 es H. Preferentemente, R7 es H o Br.

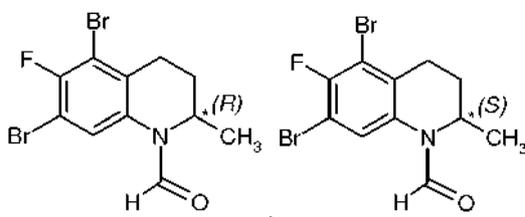
5 **[0040]** En una realización preferente, R1 es H y R5 es Br.
 En otra realización preferente, al menos dos de R5, R6 y R7 son halógeno.

[0041] Las realizaciones particulares mencionadas anteriormente se pueden combinar entre sí.
 Algunos compuestos específicos para el uso definido anteriormente tienen las siguientes fórmulas:

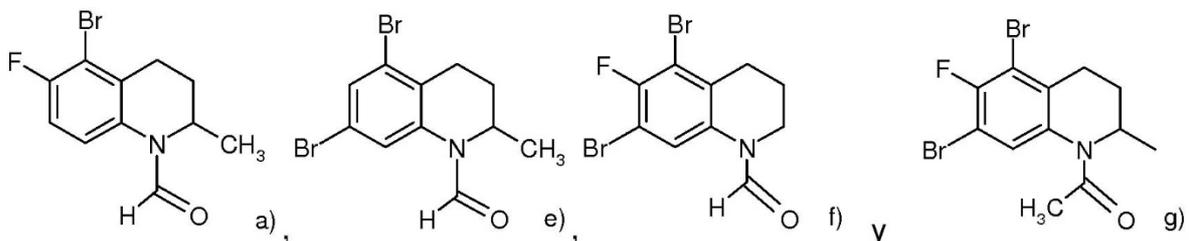
10



nombrado aquí CE3F4,

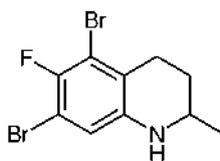


15



[0042] La presente solicitud también divulga el siguiente compuesto:

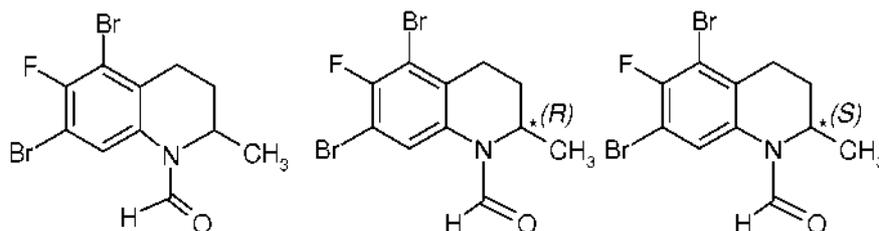
20



h).

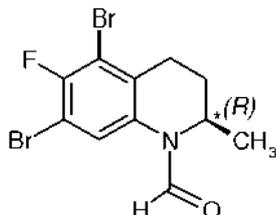
[0043] Más particularmente, algunos compuestos específicos para el uso como se ha definido anteriormente tienen las siguientes fórmulas:

25



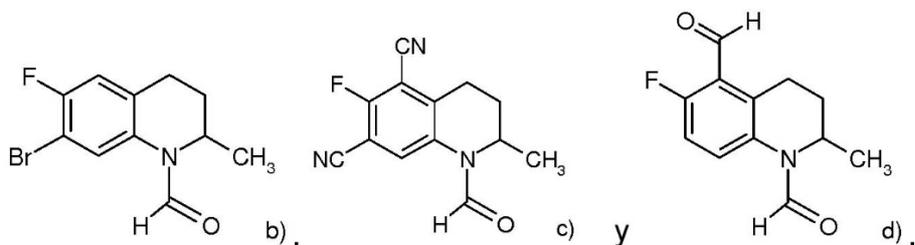


[0044] En una realización, el compuesto de fórmula (I) es:



5

[0045] La presente solicitud también describe los siguientes compuestos:



10

Preparación de los compuestos de fórmula (I):

[0046] Los compuestos de fórmula (I) pueden sintetizarse según los procedimientos publicados previamente en P. Bouyssou et al., J. Heterocyclic Chem., 29, 895, 1992. Los procedimientos de preparación de los compuestos de fórmula (I) son bien conocidos.

[0047] La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende un compuesto que tiene la fórmula (I) para su uso como se ha definido anteriormente, en asociación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20

[0048] La presente divulgación también se refiere a un fármaco, que comprende un compuesto que tiene la fórmula (I) para su uso como se ha definido anteriormente.

[0049] Aunque es posible que los compuestos que tienen la fórmula (I) se administren en solitario, se prefiere presentarlos como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas, tanto para uso veterinario como humano, útiles según la presente invención comprenden al menos un compuesto que tiene la fórmula (I) como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y posiblemente otros ingredientes terapéuticos.

[0050] En ciertas realizaciones preferidas, los principios activos necesarios en la terapia de combinación pueden combinarse en una única composición farmacéutica para administración simultánea.

[0051] Como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" y las variaciones gramaticales del mismo, ya que se refieren a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos no deseados tales como náuseas, mareos, malestar gástrico y similares.

[0052] La preparación de una composición farmacológica que contiene principios activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita limitarse basándose en la formulación. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución, o suspensiones, en líquido antes del uso. La preparación también se puede emulsionar. En particular, las composiciones farmacéuticas pueden

formularse en forma de dosificación sólida, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, grageas o gránulos.

[0053] La elección del vehículo y el contenido de sustancia activa en el vehículo se determinan generalmente según la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto activo, el modo particular de administración y las disposiciones que deben observarse en la práctica farmacéutica. Por ejemplo, se pueden utilizar excipientes tales como lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dicálcico y agentes desintegrantes tales como almidón, ácidos alginicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco para preparar comprimidos. Para preparar una cápsula, es ventajoso usar lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se usan suspensiones acuosas, pueden contener agentes emulsionantes o agentes que facilitan la suspensión. También pueden usarse diluyentes tales como sacarosa, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol y cloroformo o mezclas de los mismos.

[0054] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una formulación adecuada a seres humanos y animales mediante administración tópica o sistémica, incluyendo oral, rectal, nasal, bucal, ocular, sublingual, transdérmica, rectal, tópica, vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intraarterial, intramuscular, intravenoso, intradérmico, intratecal y epidural), intracisternal e intraperitoneal. Se apreciará que la ruta preferida puede variar, por ejemplo, con la afección del receptor.

[0055] Las formulaciones pueden prepararse en forma de dosificación unitaria por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Dichos procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, moldeando el producto.

[0056] La invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula (I) como se ha definido anteriormente, para su uso para el tratamiento y/o la prevención de inflamación, cáncer, enfermedades vasculares incluyendo aterogénesis, aterosclerosis y restenosis postangioplastia, enfermedades renales que incluyen nefropatía diabética y enfermedades cardíacas.

[0057] La presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto que tiene la fórmula (I) como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de inflamación, cáncer, enfermedades vasculares incluyendo aterogénesis, aterosclerosis y restenosis postangioplastia, enfermedades renales que incluyen nefropatía diabética, trastornos cognitivos y enfermedades cardíacas.

[0058] Por "inflamación" se entienden fenómenos por los cuales el cuerpo humano se defiende contra la agresión y que puede manifestarse en diversos síntomas tales como dolor, hinchazón, calor o enrojecimiento de la piel.

[0059] Por el término "cáncer" se entienden tumores sólidos y/o cánceres hematológicos diseminados y/o su metástasis. Los términos "metástasis" o "enfermedades metastásicas" se refieren a tumores secundarios que están formados por células de un tumor primario que se han trasladado a otra localización. El término "cánceres hematológicos" se refiere a los tipos de cáncer que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos, tales como mielomas, linfomas o leucemias.

[0060] Los trastornos cognitivos son una categoría de trastornos de salud mental que afectan principalmente al aprendizaje, la memoria, la percepción y la resolución de problemas, e incluyen amnesia, demencia y delirio, más particularmente la enfermedad de Alzheimer.

[0061] Las enfermedades cardíacas indican más específicamente hipertrofia cardíaca, arritmias cardíacas, valvulopatías, disfunción diastólica, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica, miocarditis, cardiomiopatías hipertróficas y dilatadas. Cabe señalar que además de Rap1, se ha demostrado que Epac1 activa la GTPasa pequeña H-Ras en diferentes tipos de células, incluidos los cardiomiocitos primarios (Keiper et al., 2004; Metrich et al., 2008; Metrich et al., 2010a, 2010b; Schmidt et al., 2001).

[0062] Por lo tanto, la invención también se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente, para su uso para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cardíacas que se seleccionan del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, arritmias cardíacas, valvulopatías, disfunción diastólica, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica, miocarditis, cardiomiopatías hipertróficas y dilatadas, preferiblemente hipertrofia cardíaca.

[0063] La presente divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente, para su uso en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de una enfermedad en la que está implicada la proteína Epac, comprendiendo dicho procedimiento la administración de un medicamento cantidad aceptable de un compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente para un paciente que lo necesita, preferiblemente en el que la enfermedad se selecciona de inflamación, cáncer, enfermedades vasculares que incluyen aterogénesis, aterosclerosis

y restenosis postangioplastia, enfermedades renales, incluyendo nefropatía diabética, enfermedades cognitivas y enfermedades cardíacas.

[0064] En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

Descripción de las figuras:

10 [0065]

La figura 1 muestra la actividad inhibitoria de CE3F4 sobre la actividad de intercambio de Epac1. La actividad de intercambio de nucleótidos de Epac1 se midió en función del tiempo (en segundos) en ausencia del compuesto 007 (curva con cuadrados) o en presencia de 2 μM del compuesto 007, ya sea en solitario (curva con círculos de color negro) o con 25 μM de compuesto 009 (curva con triángulos) o con 20 μM de CE3F4 (curva con círculos de color blanco).

Las figuras 2A, 2B y 2C muestran la actividad inhibitoria de CE3F4 sobre la activación de Rap1 inducida por Epac.

Las figuras 3A, 3B y 3C muestran la actividad inhibitoria de CE3F4 sobre la activación de Ras inducida por Epac.

La figura 3A muestra la actividad inhibitoria de CE3F4 en la activación de Ras inducida por Epac en células HEK293.

La figura 3B muestra la actividad inhibitoria de CE3F4 sobre la activación de Ras inducida por Epac en miocitos cardíacos neonatales de rata.

La figura 3C muestra la actividad inhibitoria de CE3F4 sobre la activación de Ras inducida por Epac en células HEK293 que sobreexpresan β_1 -AR.

Las figuras 4A y 4B muestran que CE3F4 impide la remodelación cardíaca inducida por Epac.

La figura 4A muestra la inhibición de la activación transcripcional de ANF-Luc inducida por Iso por CE3F4.

La figura 4B muestra la inhibición de la activación transcripcional de NFAT-Luc inducida por Iso por CE3F4.

La figura 5 muestra las velocidades iniciales de la actividad de GEF de Epac1 activada por 20 μM de 007 en presencia de concentraciones crecientes de CE3F4 racémico (círculos de color blanco), (*R*)-CE3F4 (cuadrados de color negro), (*S*)-CE3F4 (diamantes de color negro), y compuesto f (triángulos de color blanco).

La figura 6 muestra la velocidad inicial del intercambio de GDP catalizado por Epac1, Epac2(AB) o Epac2(B), en presencia o ausencia de agonistas y de compuestos inhibidores. La actividad dependiente de agonista se obtuvo por sustracción de la actividad constitutiva de intercambio de GDP, medida en presencia de proteínas Epac pero en ausencia de agonistas e inhibidores.

La figura 6A muestra la velocidad inicial del intercambio de GDP catalizado por Epac1 (barras de color negro),

Epac2(AB) (barras de color blanco) y Epac2(B) (barras sombreadas) en incubación con 50 μM de racémico CE3F4 y con 50 μM de 007 o 300 μM de AMPc, como se indica debajo del eje x.

La figura 6B muestra Epac1 (círculos de color negro) o Epac2B (cuadrados de color blanco) activados por 300 μM de cAMP, y la velocidad inicial de intercambio de GDP en presencia de concentraciones crecientes de (*R*)-CE3F4.

La figura 6C muestra la velocidad inicial de intercambio de GDP catalizado por Epac1 (barras sombreadas) o Epac2(B) (barras de color negro) medida en presencia de 30 μM de CE3F4 racémico o los compuestos a) de h), y 300 μM de cAMP como agonista.

Los resultados se expresan en relación con los valores de control medidos en ausencia de inhibidor, que se establecieron al 100 %. $p < 0,01$ % para la comparación global de Epac2(B) y Epac1 (prueba de rango con signo de par coincidente de Wilcoxon). $p < 5$ % o menos para la comparación de Epac2(B) y Epac1 a inhibir por cada compuesto (prueba t de Student de una cola).

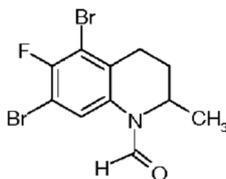
[0066] Los siguientes ejemplos representan algunas realizaciones específicas de la invención y no pueden considerarse limitantes.

50 EJEMPLOS

[0067] En los siguientes ejemplos:

- "CE3F4" se refiere al compuesto específico que tiene la siguiente fórmula:

55



CE3F4 y los compuestos relacionados a), b), c), d), g), y h) se sintetizaron según los procedimientos descritos en P.

Bouyssou, et al., *Synthesis of 7- and 5,7-substituted-6-fluoro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: convenient precursors of quinolone antibacterial agents*, J. Heterocyclic Chem. 29 (1992) 895-898.

- El compuesto f) se sintetizó a partir de 6-fluoroquinolina por reducción y formilación de este compuesto para dar 6-fluoro-1-formil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina, que después se bromó para dar el compuesto f).

- 5 - el compuesto e) se sintetizó a partir de 3,5-dibromoanilina mediante una síntesis de Skraup para dar 5,7-dibromoquinolina seguido de reducción del anillo que contiene nitrógeno y formilación de nitrógeno en la posición 1.
 - Los enantiómeros (R) y (S) de CE3F4 se derivaron de los enantiómeros (R) y (S) de 6-fluoro-2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (6-FTHQ). (R) y (S)-6-FTHQ se obtuvieron según los procedimientos descritos en J.F. Gerster, et al., *Synthesis, absolute configuration, and antibacterial activity of 6,7-dihydro-5,8-dimethyl-9-fluoro-1-oxo-1H,5H-benzol[ij]quinolizine-2-carboxylic acid*, J. Med. Chem. 30 (1987) 839-843 y después se formilaron y se bromaron para dar, respectivamente, (R)-CE3F4 y (S)-CE3F4.

Los espectros de masas y la resonancia magnética nuclear de estos compuestos fueron idénticos a los informados anteriormente para CE3F4 racémico (Bouyssou P., 1990. *Contribution a l'etude des quinolones carboxyliques de structure type Benzo [i,j] Quinolizine, relation structure activite*. Ph.D. Thesis. Orleans University, Francia).

- 15 - Mediciones de rotación óptica se realizaron a 589 nm, 20 °C y c = 10 mg/ml en cloroformo, con una precisión de $\pm 1^\circ$, utilizando un polarímetro Perkin Elmer modelo 341. (R)-CE3F4 es levorrotatorio con $[\alpha]_D = -12 \pm 1^\circ$, mientras que (S)-CE3F4 es dextrorrotatorio con $[\alpha]_D = +11 \pm 1^\circ$.

- El "Compuesto 007" se refiere al agonista de Epac, 8-(4-clorofeniltio)-2'-O-metiladenosina-3',5'-monofosfato cíclico, obtenido de Biolog, Bremen, Alemania. El "Compuesto 007" es un análogo de AMPc que activa Epac, pero no PKA.

- 20 - El "Compuesto 009" se refiere a 8-(4-clorofeniltio)-guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, obtenido de Biolog, Bremen, Alemania.

- "Sp-007" se refiere a un agonista de Epac que penetra en la membrana, Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS (Christensen et al., 2003).

- La isoprenalina (también llamada "Iso") se obtuvo a partir de Sigma-Aldrich.

- 25 - BODIPY FL 2'-(o-3')-O-(W-(2-aminoetil)uretano), sal bis(trietilamonio) (Bodipy-GDP) se obtuvo en Invitrogen.

Ejemplo 1: Características cinéticas de la inhibición de Epac por CE3F4

- 30 **[0068]** Los efectos de CE3F4 sobre la actividad de intercambio de Epac-1 se estudiaron como se indica a continuación.

Protocolo:

- 35 **[0069]** Se midió la actividad de intercambio de nucleótidos de Epac1:

- en ausencia del compuesto 007,
- o en presencia de 2 μ M del compuesto 007, en solitario o con 25 μ M del compuesto 009,
- o con 20 μ M de CE3F4.

- 40 **[0070]** Se estudiaron variaciones de URF (unidades relativas de fluorescencia) en función del tiempo y se ajustaron a exponenciales individuales. Los valores informados son la media \pm SEM (n = 3). (Véanse Material y procedimientos).

Resultados:

- 45 **[0071]** La figura 1 muestra que una dosis única de CE3F4 inhibió la reacción de intercambio inducida por Epac1 más 007 (2 μ M) en un grado similar al efecto inhibitorio de 009 a 25 μ M.

Ejemplo 2: Efectos de CE3F4 sobre los efectores aguas abajo de Epac en células cultivadas

- 50 1) Efectos de CE3F4 sobre la activación de Rap1 inducida por Epac1:

[0072] La capacidad de CE3F4 para bloquear la activación de Rap1 inducida por Epac1 en células HEK293 cultivadas se probó según el siguiente experimento.

55 Protocolo:

[0073] Las células HEK293 se transfectaron con el vector de control de pcDNA3 o con Epac1 (véase la figura 2A).

- 60 **[0074]** Las células HEK293 se transfectaron con Epac1 y 24 h después de la transfección, las células se preincubaron, o no, con CE3F4 durante 30 minutos y después se trataron o no con Sp-007 (10 μ M) durante 10 minutos (véase la figura 2B).

- 65 **[0075]** Las células HEK293 que sobreexpresan β 1AR (receptores adrenérgicos Beta-1) y transfectadas con

Epac1 se trataron previamente, o no, con CE3F4 y se estimularon, o no, con Iso (10 μ M) durante 10 min (véase la figura 2C).

- 5 **[0076]** Las cantidades de Rap1-GTP se determinaron mediante ensayos desplegables (véase Material y procedimientos). El gráfico de barras representa la media \pm S.E.M. de 5 (figuras 2A, 2B) o 3 (figura 2C) experimentos independientes. Los resultados se expresan como el porcentaje de células de control no estimuladas.

Resultados:

- 10 **[0077]** La figura 2A muestra que con el vector de control, incluso en presencia de Sp-007, la relación Rap1-GTP/Rap1 total es menor que para las células transfectadas con Epac1, y que, en presencia de Sp-700, las células transfectadas con Epac1 tuvieron mayor nivel de Rap1-GTP. Sp-007 indujo una activación robusta de Rap1 en células que sobreexpresan Epac1 en comparación con las células de control transfectadas con el vector vacío.
- 15 **[0078]** CE3F4 (20 μ M) evitó el aumento en la cantidad de Rap1-GTP después del tratamiento con 10 μ M de Sp-007 (figura 2B). De manera similar, CE3F4 disminuyó la activación de Rap1 inducida por Epac1 después de la estimulación del receptor adrenérgico β_1 (β_1 -AR) por isoprenalina (Iso, 10 μ M) (figura 2C).

2) Efectos de CE3F4 sobre la activación de H-Ras inducida por Epac1:

- 20 **[0079]** Los efectos de CE3F4 para prevenir la activación de H-Ras inducida por Epac1 se determinaron mediante extracción de H-Ras cargado con GTP a partir de lisados celulares con el dominio de unión a Ras inmovilizado de Raf1.

25 Protocolo:

- [0080]** Las células HEK293 (figura 3A) o los miocitos cardíacos neonatales de rata (figura 3B) se transfectaron con Epac1. 24 h después de la transfección, las células se preincubaron, o no, con CE3F4 durante 30 min, y después se trataron, o no, con Sp-007 (10 μ M) durante 10 minutos. En la figura 3C, las células HEK293 que sobreexpresan β_1 -AR y transfectadas con Epac1 se trataron previamente, o no, con 20 μ M de CE3F4 durante 30 min y se estimularon, o no, con Iso durante 10 min. Las cantidades de H-Ras-GTP se determinaron mediante ensayos desplegables. El gráfico de barras representa la media \pm S.E.M. de 5 (figura 3A) o 2 (figura 3B, 3C) experimentos independientes. Los resultados se expresan como el porcentaje de células de control no estimuladas.

35 Resultados:

[0081] Como se observó para Rap1, la cantidad de Ras-GTP inducida por Sp-007 o Iso disminuyó en presencia de CE3F4 en HEK293 y miocitos cardíacos primarios de rata (figuras 3A, 3B y 3C).

- 40 **[0082]** Conclusión: En conjunto, estos datos muestran que CE3F4 es eficaz en la prevención de la activación de Rap1 y Ras inducida por Epac en células cultivadas.

Ejemplo 3: CE3F4 previene la hipertrofia de miocitos cardíacos inducida por Epac

- 45 **[0083]** Los posibles efectos biológicos de CE3F4 sobre el crecimiento de miocitos cardíacos inducidos por Epac después de la estimulación con β -AR se investigaron como se indica a continuación.
ANF (factor natriurético auricular) es un marcador de hipertrofia de miocitos.
NFAT es un factor nuclear involucrado en la señalización pro-hipertrofica de Epac (véase Metrich et al., 2010b).
Los promotores ANF y NFAT se fusionaron con el gen de luciferasa de luciérnaga (ANF-Luc) (NFAT-Luc) para detectar
50 ANF y NFAT mediante el ensayo de luciferasa de luciérnaga (véase Material y procedimientos).

Protocolo:

A) La activación transcripcional de ANF-Luc inducida por Iso se bloquea por CE3F4:

- 55 **[0084]** Los cardiomiocitos neonatales de rata se cotransfectaron con ANF-Luc y Epac1 o el vector vacío pcDNA3 como control. Un día después de la transfección, las células se trataron previamente, o no, con CE3F4 (20 μ M) durante 30 min y se estimularon, o no, con Iso (10 μ M) durante 8 h. Después, las células se ensayaron para determinar la actividad de luciferasa.

60 B) La activación transcripcional de NFAT-Luc inducida por iso se bloquea por CE3F4:

- [0085]** Se transfectaron cardiomiocitos neonatales con NFAT-Luc. Un día después, las células se trataron previamente, o no, con CE3F4 (20 μ M) durante 30 min y se estimularon, o no, con Iso (10 μ M) durante 8 h. Al día siguiente, las células se ensayaron para determinar la actividad de luciferasa.

[0086] Los resultados se normalizaron para controlar cada experimento, y se expresaron como media \pm S.E.M de 4 (figura 4A) o 5 (figura 4B) experimentos independientes realizados por triplicado.

5 Resultados:

[0087] Iso aumentó ANF como se muestra en la figura 4A. El efecto de Iso se potenció en cardiomiocitos que sobreexpresaban Epac (figura 4A). Es importante destacar que el tratamiento de los miocitos cardiacos con CE3F4 inhibió significativamente la actividad transcripcional del gen ANF-Luc inducida por Iso (figura 4A).

10

[0088] Según este hallazgo, CE3F4 evitó la actividad transcripcional de NFAT inducida por Iso (figura 4B).

[0089] Conclusión: Estos datos indican que CE3F4 es un inhibidor farmacológico de la función biológica de Epac.

15

Ejemplo 4: (R)-CE3F4 es un enantiómero más potente que antagoniza la activación de Epac1 por cAMP que el (S)-CE3F4.

[0090] La figura 5 muestra un ensayo de inhibición de respuesta a la dosis representativo en el que se midió la actividad de GEF de Epac1 activado con 007 hacia Rap1 en presencia de concentraciones crecientes de CE3F4 racémico o de sus enantiómeros individuales (R)-(-)-CE3F4 y (S)-(+)-CE3F4. La curva de respuesta a la dosis para el enantiómero (R) se desplaza a la izquierda con respecto a la obtenida con el racemato y con el enantiómero (S), lo que demuestra que el (R)-(-)-CE3F4 es un inhibidor de Epac más potente.

[0091] Se ensayó también el compuesto f): la curva respuesta a la dosis no fue significativamente diferente (ensayo F) de la obtenida con (S)-CE3F4. Cada punto experimental es la media de los valores de velocidad inicial calculados a partir de experimentos de línea temporal por triplicado.

[0092] Los valores de CI_{50} para el racemato, los enantiómeros y el compuesto f) se determinaron varias veces independientemente:

30

	CE50 media (μ m)	DE	n	p
CE3F4	10,7	1,4	6	<1 %
(R)-CE3F4	5,8	0,8	9	<1 %
(S)-CE3F4	56	7	8	NS
Compuesto f)	50	5	4	NS

[0093] (R)-CE3F4 inhibió la actividad de GEF de Epac1 con una CI_{50} que era aproximadamente 2 veces inferior a la obtenida con el CE3F4 racémico, y aproximadamente 10 veces inferior a los valores de CI_{50} de (S)-CE3F4 y el compuesto f). Los valores de CI_{50} se calcularon usando Graphpad Prism, según un modelo de respuesta a la dosis de cuatro parámetros. (C) Media \pm DE n = 4 a 9 determinaciones independientes de los valores de CI_{50} para cada inhibidor.

35

Ejemplo 5: (R)-CE3F4 y sus análogos inhiben diferencialmente Epac1 y Epac2

[0094] Epac1, Epac2(AB) que posee los dominios tanto CNB-A como CNB-B, o Epac2(B) que se elimina de su dominio CNB-A, se activaron saturando las concentraciones de 007 (50 μ M) o cAMP (300 μ M).

40

[0095] La figura 6A muestra que, cualquiera que sea el agonista utilizado, la actividad GEF de Epac1 fue mucho más inhibida por 50 μ M de CE3F4 racémico que la actividad de GEF de Epac2(AB) o Epac2(B). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en los efectos inhibitorios del CE3F4 racémico sobre la actividad de GEF de Epac2(AB) o de Epac2(B). Después, se usó (R)-CE3F4 para estudiar la inhibición dependiente de la concentración de las actividades de GEF de Epac1 y Epac2(B) activadas por cAMP (300 μ M). Los resultados se expresan como el % de la velocidad inicial del intercambio de GDP medido en ausencia de CE3F4 racémico. *, $p < 1$ %; ns (no significativo), $p > 5$ % mediante la prueba t de Student de dos colas.

45

[0096] La figura 6B muestra que la curva de respuesta a la dosis obtenida con Epac2(B) está fuertemente desplazada hacia la derecha con respecto a la obtenida con Epac1. A partir de dos experimentos independientes de respuesta a la dosis, tales como los que se muestran en la figura 6B, la CI_{50} media de (R)-CE3F4 fue de 4,2 μ M para Epac1 y 44 μ M para Epac2(B). Los resultados se expresan como el % de la velocidad inicial del intercambio de GDP medido en ausencia de (R)-CE3F4. $p < 0,1$ % en comparación de los ajustes (CI_{50}) basados en la prueba F de suma extra de cuadrados (Graphpad Prism).

55

[0097] Figura 6C: Se compararon Epac1 y Epac2(B) activados por AMPc por su capacidad de inhibirse por varios análogos estructurales de CE3F4. Todos ellos están en forma racémica, excepto el compuesto f). La figura 6C muestra los resultados de un experimento representativo, expresado como las potencias inhibitorias relativas de los diversos análogos (30 μ M), medidos en presencia de AMPc (300 μ M) como el agonista.

5

[0098] Los compuestos a), e) y f) mostraron propiedades antagónicas hacia ambas isoformas de Epac incluso si eran antagonistas de AMPc más débiles hacia Epac2(B) que hacia Epac1 mediante la prueba de rango con signo de par coincidente de Wilcoxon de dos colas (valor $p < 1\%$). Los compuestos g) y h) mostraron propiedades antagónicas hacia Epac1.

10

[0099] El antagonista más fuerte de la activación de Epac1 y Epac 2(B) por cAMP fue el propio CE3F4. Un estudio de respuesta a la dosis (no mostrado) indicó que la Cl_{50} del CE3F4 racémico era de 11 μ M para Epac1 y 66 μ M para Epac2(B) cuando se activaron con 300 μ M de cAMP.

15 **[0100]** Los compuestos comparativos b), c) y d), que no están incluidos por la fórmula (I) de los compuestos de la invención, no mostraron actividad inhibitoria significativa en ambas isoformas de Epac.

Material y procedimientos:

20 Medición de la activación *in vitro* de Epac1

[0101] Procedimiento utilizado para determinar la actividad de intercambio de Epac1:

Con respecto a la figura 1, se utilizó un procedimiento "multipunto" (línea temporal). Todos los componentes, excepto el agonista (007), se mezclaron en un pocillo y la actividad de intercambio de Epac1 se inició por inyección del agonista. GST-Rap1 se precargó con un derivado fluorescente de GDP, y el intercambio de nucleótidos catalizado por Epac1 se midió utilizando un gran exceso de GDP no fluorescente, aprovechando la diferencia espectroscópica entre el GDP libre y el marcado con fluorescencia unido a Rap1. El principio del procedimiento es similar al informado, en particular, por Van den Berghe et al. (1997; Oncogene 15, 845), excepto que aquí se usó GDP marcado por Bodipy FL (bGDP), en lugar de 2',3'-bis(O)-N-metilnitriloil-GDP (mant-GDP).

30 **[0102]** Para determinar la actividad de intercambio de Epac1, se incubaron 200 nM de GST-Rap1A purificado precargado con bGDP a 22 °C en tampón de intercambio (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTE 5 mM, glicerol al 5 %, NP40 al 0,01 %), en presencia de 100 nM de GST-Epac1 purificado, 20 μ M de GDP no marcado, y concentraciones definidas de compuesto 007, compuesto 009 y CE3F4. Los experimentos se realizaron en placas negras de 384 pocillos (Corning Inc. Ref. 3573) en un volumen final de 30 μ l. Se midió la fluorescencia de bGDP (Ex = 480 nm; Em = 535 nm) usando un lector de placa multietiqueta (Envision Xcite, Perkin-Elmer).

40 **[0103]** Procedimiento utilizado para medir la cantidad de Rap1-GTP o Ras-GTP inducida por Epac: véase el ensayo desplegable.

Cultivo celular:

45 **[0104]** Los miocitos cardíacos se aislaron como se ha descrito previamente por Wollert y col. (1996). Las células HEK293 que expresaban de forma estable el receptor β_1 -adrenérgico (β_1 -AR) fueron un obsequio del Dr. Shenoy (Universidad de Duke). Las células HEK293 se mantuvieron en MEM con FBS (suero fetal bovino; 10 %) y penicilina-estreptomicina (1 %). Todos los medios, sueros y antibióticos utilizados en el cultivo celular se adquirieron en Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia).

50 Plásmido y transfección:

[0105] Las construcciones de plásmidos se proporcionaron generosamente de la siguiente manera: El promotor ANF de rata se fusionó con el gen indicador de luciferasa de luciérnaga (ANF-Luc) por el Dr. K. Knowlton, la construcción plasmídica de Epac y Rap1 (Epac1WT) por los Dres. J. L. Bos y J. de Gunzburg, respectivamente. El plásmido indicador de luciferasa de luciérnaga dirigido por cuatro sitios de unión consenso NFAT (NFAT-Luc) se adquirió en Stratagene. Se realizaron experimentos de transfección transitoria de células HEK y miocitos cardíacos primarios con el reactivo X-treme GENE 9 (Roche Applied Science) y Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies) en presencia de varias cantidades de construcciones plasmídicas según las instrucciones del fabricante.

60 Ensayo de luciferasa de luciérnaga:

[0106] Las células se lisaron y se detectó luminiscencia usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante con Tecan Infinite.

65 Ensayo desplegable:

[0107] Los experimentos desplegables de Ras y Rap1 se realizaron usando una proteína de fusión GST que contenía respectivamente el dominio de unión a Ras de Raf1-RBD y el dominio de unión a Rap1 de Ral-GDS como se ha descrito previamente (Metrich et al., 2008). Las células se dejaron en privación durante 1 h antes de la estimulación en MEM libre con penicilina-estreptomicina (1 %). Después de la estimulación, las células se lisaron en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM; MgCl₂ 20 mM; ácido desoxicólico al 0,5 %; SDS al 0,1 %; Triton X-100 al 1 %; PMSF 1 mM; inhibidores de proteasa y fosfatasa) y se incubaron 500 µg de proteína con GST-Raf1-RBD (para Ras) o Ral-GDS (para Rap1) acoplada a perlas de glutatión-Sepharose (Amersham Biosciences) durante 1 h a 4 °C. Después, las perlas se lavaron tres veces en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, MgCl₂ 20 mM, Triton X-100 al 1 %; PMSF 0,1 mM; inhibidores de proteasa y fosfatasa). Las muestras Rap1-GTP o Ras y los lisados totales correspondientes se separaron en geles SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Pharmacia Biotech). Las membranas se revelaron con el kit Dura (Pierce).

15 Expresión de proteína recombinante:

[0108] Las secuencias de referencia de proteína de NCBI para Epac1 y Epac2 humanas son NP_006096 y NP_008954, respectivamente. La Epac1 humana recombinante (residuos 149-881), eliminada de su dominio Disheveled, Egl-10 y Pleckstrina (DEP), y la Rap1A humana se produjeron con GST como etiqueta de fusión (D. Courilleau et al., *Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac*, J. Biol. Chem. 287 (2012) 44192-44202).

[0109] La Epac2(AB) humana (aminoácidos 43-1011) lleva los dominios tanto CNB-A como CNB-B. La Epac2(B) humana (aminoácidos 283-1011) carece de los primeros 283 aminoácidos de Epac2. Por lo tanto, se elimina de sus dominios CNB-A y DEP, pero conserva el dominio CNB-B y la región catalítica completa. Epac2(AB) se obtuvo por restricción HindIII/NotI y Epac2(B) se obtuvo por restricción Ssp1/Not1 de un ADNc de Epac2A humano (un obsequio de Ann M Graybiel, Department of Brain and Cognitive Sciences, MIT, Cambridge). Ambos fragmentos de ADNc se insertaron en pET41a (Novagen), expresado en Rosetta 2(DE3) de *Escherichia coli* (Novagen), y las proteínas de fusión etiquetadas con GST se purificaron mediante perlas de ácido de níquel-nitrilotriacético (Qiagen), como se describe en D. Courilleau, et al., *Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac*, J. Biol. Chem. 287 (2012) 44192-44202).

Ensayo de la actividad de GEF *in vitro*:

[0110] El intercambio de GDP *in vitro* catalizado por Epac se midió usando isoformas de Epac recombinantes purificadas y Rap1A cargadas con Bodipy-GDP, como se describe en D. Courilleau, et al (mencionado anteriormente). La actividad de GEF de las proteínas Epac se inició por inyección del agonista. Las soluciones madre de CE3F4 y sus análogos (12 mM en DMSO al 100 %) se mantuvieron a -20 °C y se diluyeron en tampón de ensayo (0,67 % de concentración final de DMSO) justo antes de su uso para ensayos de intercambio de GDP. La liberación de Bodipy-GDP se midió en tiempo real como la descomposición de la fluorescencia. Se ajustó un solo exponencial a los datos de la línea temporal utilizando el programa Graphpad Prism. La velocidad inicial (Vi) del intercambio de GDP en Rap1 se calculó como se describe en D. Courilleau et al.).

Análisis estadístico

45 Ejemplos 1 a 3:

[0111] Todos los datos se expresan como medias ± error estándar de la media. Las diferencias en las variables cuantitativas se examinaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) o prueba t de dos colas emparejada. Valor de p <0,05 (*), valor de p <0,01 (**) y valor de p <0,001 (***). Todos los análisis se realizaron usando GraphPad Prism.

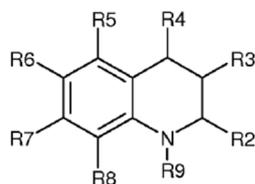
Ejemplos 4 y 5:

55 **[0112]** Los datos se expresan como media ± DE. Las diferencias en las variables cuantitativas se examinaron mediante la prueba t de Student de una o dos colas sin emparejar. Los valores de CE₅₀ y CI₅₀ se calcularon según un modelo de respuesta a la dosis de cuatro parámetros y se compararon sobre la base de la prueba de suma de cuadrados F adicional, usando Graphpad Prism. Las pruebas de rangos con signo de par coincidente de Wilcoxon de dos colas se realizaron usando GraphPad Prism.

60

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (I):



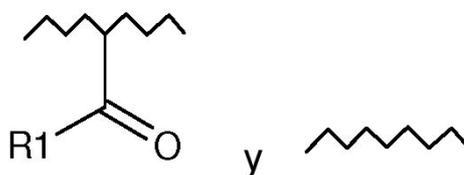
(I)

5

en la que:

- R9 es

10



es la unión al átomo de nitrógeno de la tetrahydroquinolina;

15 - R1, R2, R3, R4 y R8 se eligen independientemente del grupo que consiste en: H, alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₁₀), arilo (C₆-C₁₀), alquilen (C₁-C₆)-arilo (C₆-C₁₀) y heteroarilo (C₃-C₁₀); estando dichos grupos arilo y heteroarilo sustituidos posiblemente por al menos un sustituyente elegido de OH, NH₂, NO₂, alquilo (C₁-C₆) y halógeno;

- R5 es un átomo de halógeno;

20 - R6 y R7 se eligen independientemente del grupo que consiste en H y átomos de halógeno;

o sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos o sales hidratadas o sus estructuras cristalinas polimórficas, racematos, diastereómeros o enantiómeros,

para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o de uno o más de sus síntomas en los que está involucrada la proteína Epac, y

25 en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en inflamación, cáncer, enfermedades vasculares, enfermedades renales y enfermedades cardíacas, y

en el que dicho compuesto de fórmula (I) es un inhibidor selectivo de la isoforma Epac 1.

30 2. El compuesto de fórmula (I) para su uso según la reivindicación 1, en el que las enfermedades cardíacas se seleccionan del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, arritmias cardíacas, valvulopatías, disfunción diastólica, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca isquémica, miocarditis, cardiomiopatías hipertróficas y dilatadas.

35 3. El compuesto de fórmula (I) para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad es nefropatía diabética.

4. El compuesto de fórmula (I) para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho síntoma es dolor inflamatorio.

40 5. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R1 es H.

6. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que R2 es H o un alquilo (C₁-C₁₀).

45

7. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R5 y/o R6 se elige del grupo que consiste en F, Cl, Br e I.

50 8. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R6 es H o F.

9. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que R7 se elige del grupo que consiste en H, F, Cl, Br e I.

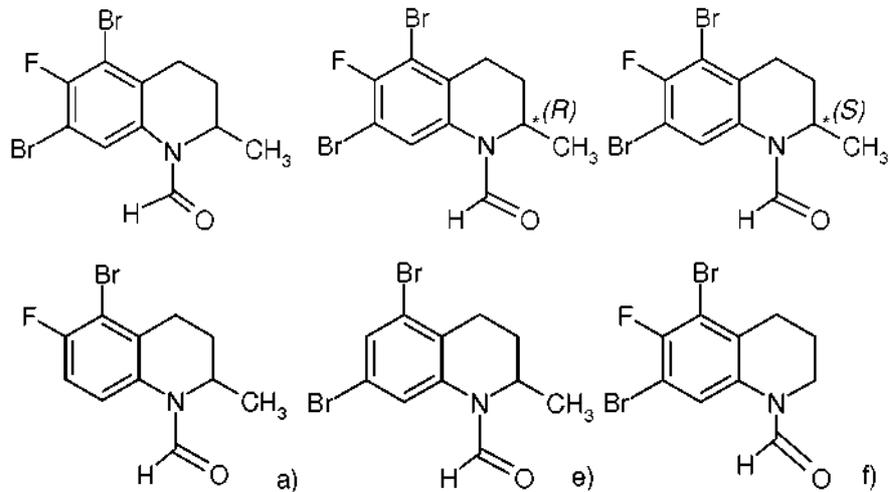
10. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R7 es H o Br.

11. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que R1 es H y R5 es Br.

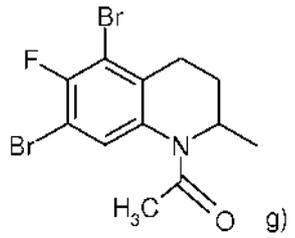
10 12. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que al menos dos de R5, R6 y R7 son halógeno.

13. El compuesto de fórmula (I) para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que tiene una de las siguientes fórmulas:

15

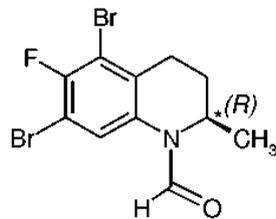


20 y



14. Un compuesto que tiene la siguiente fórmula:

25



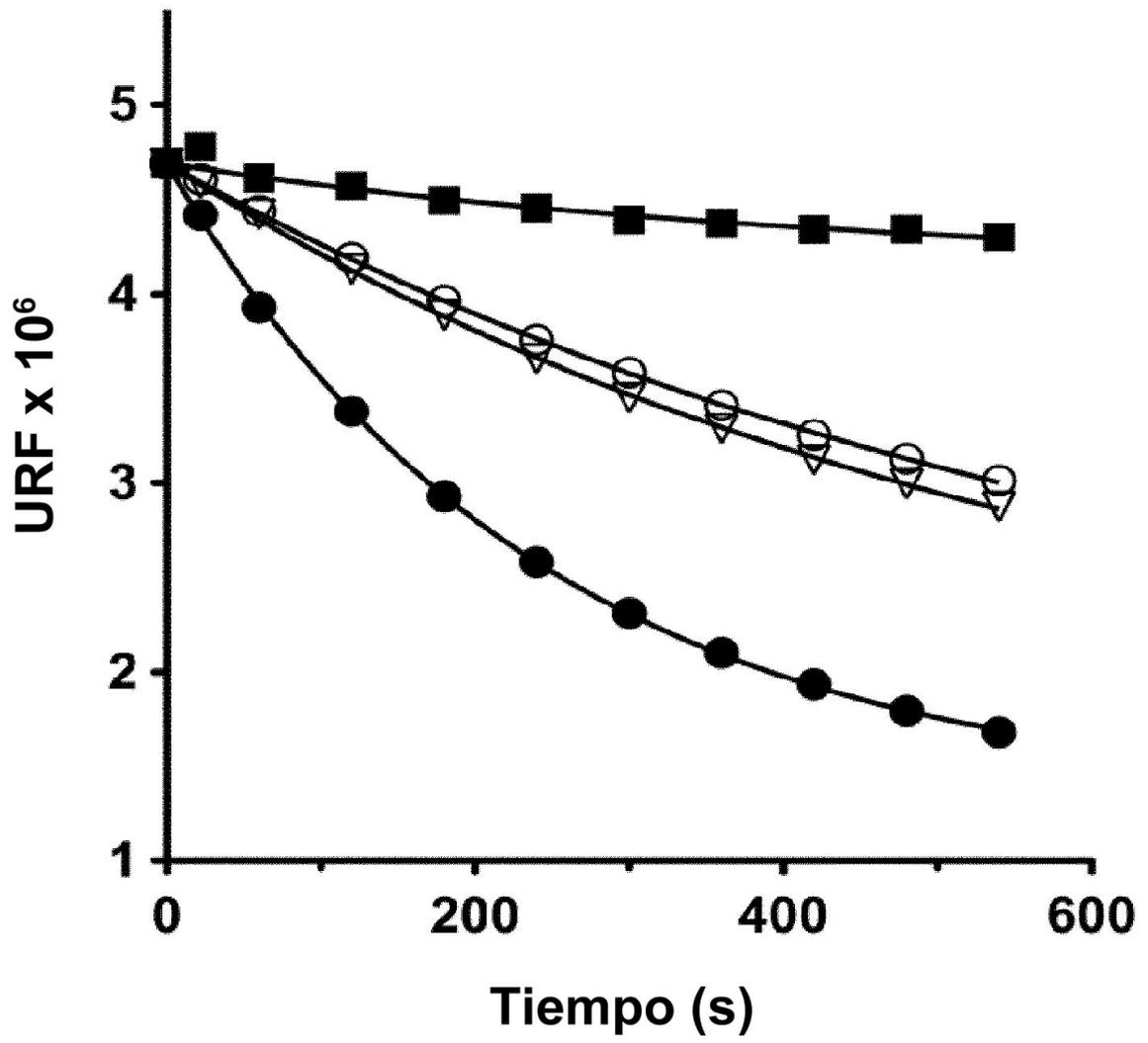


FIG.1

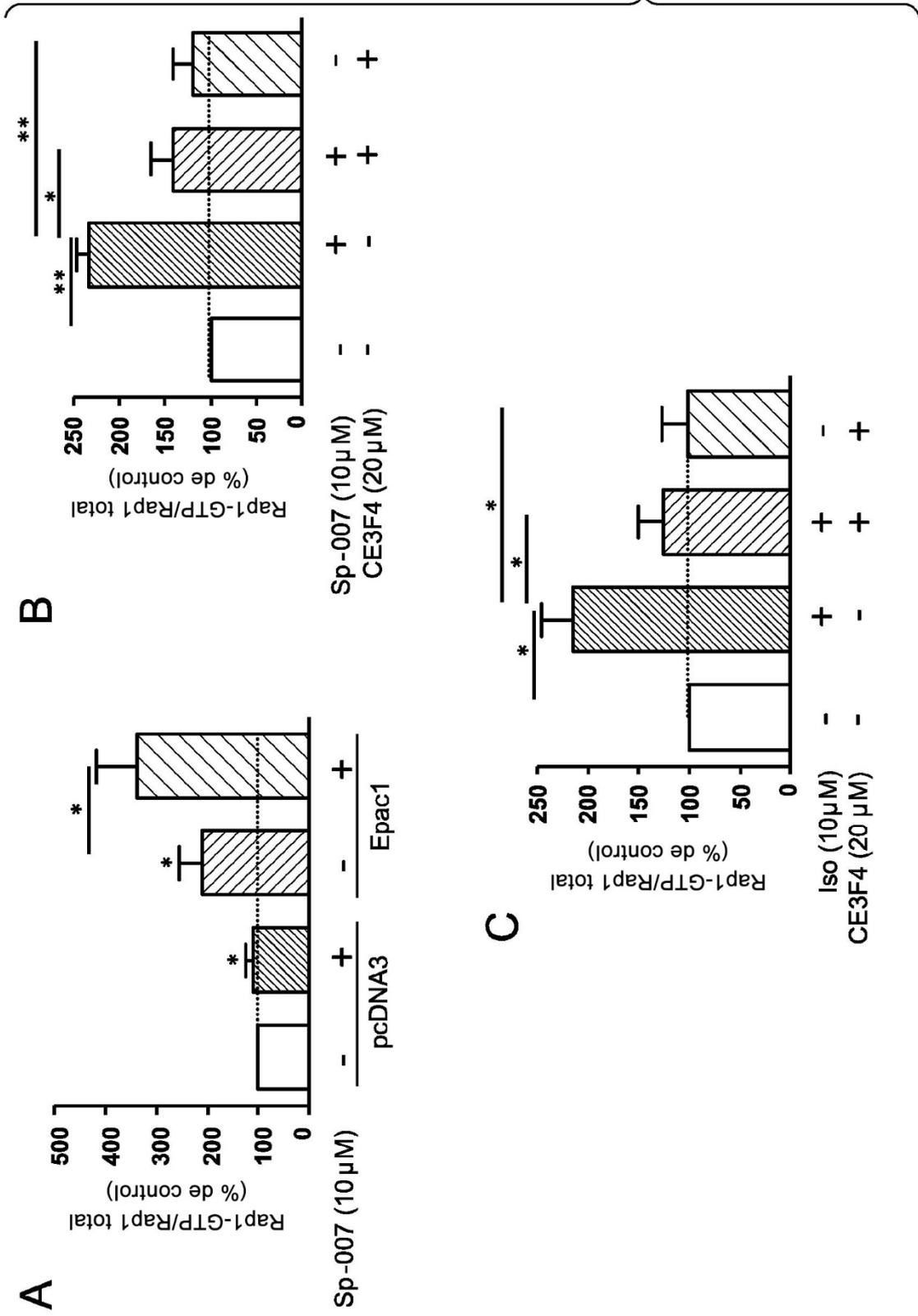
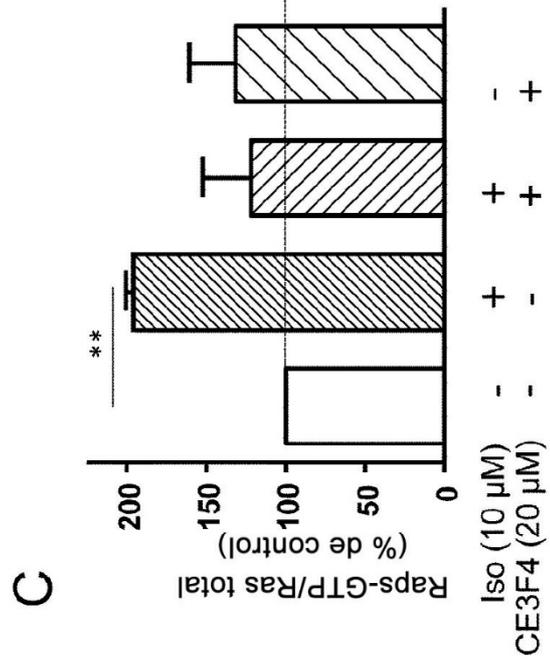
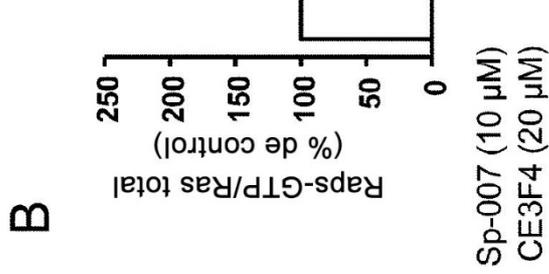
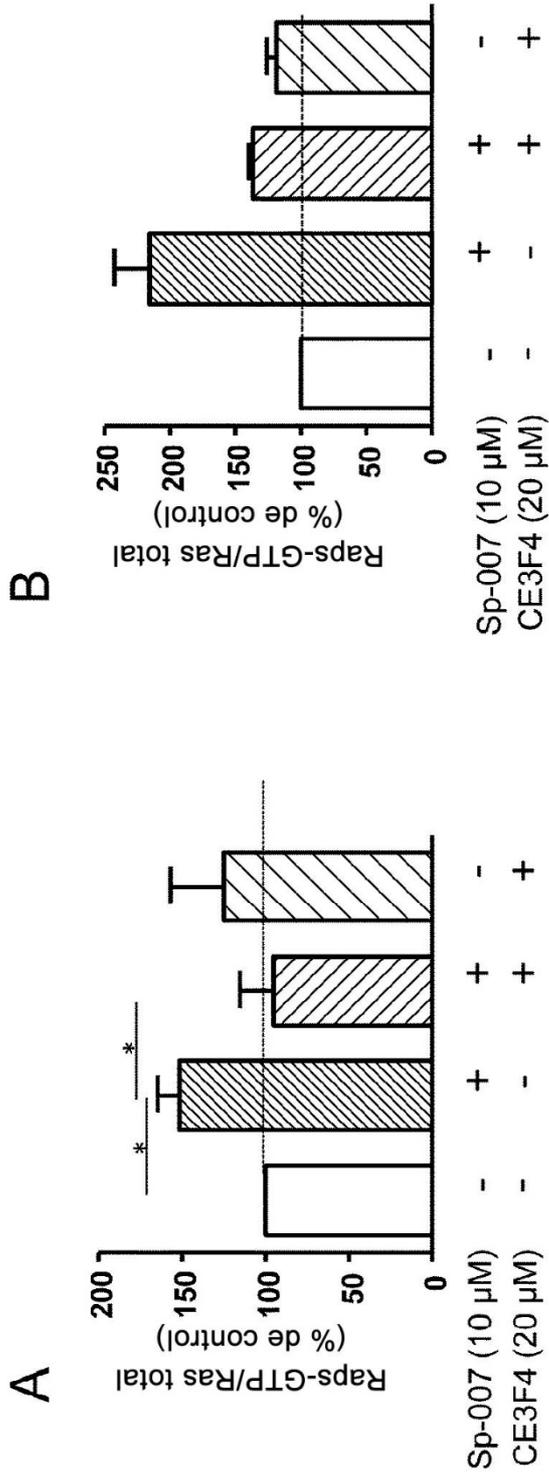


FIG.2

FIG.3



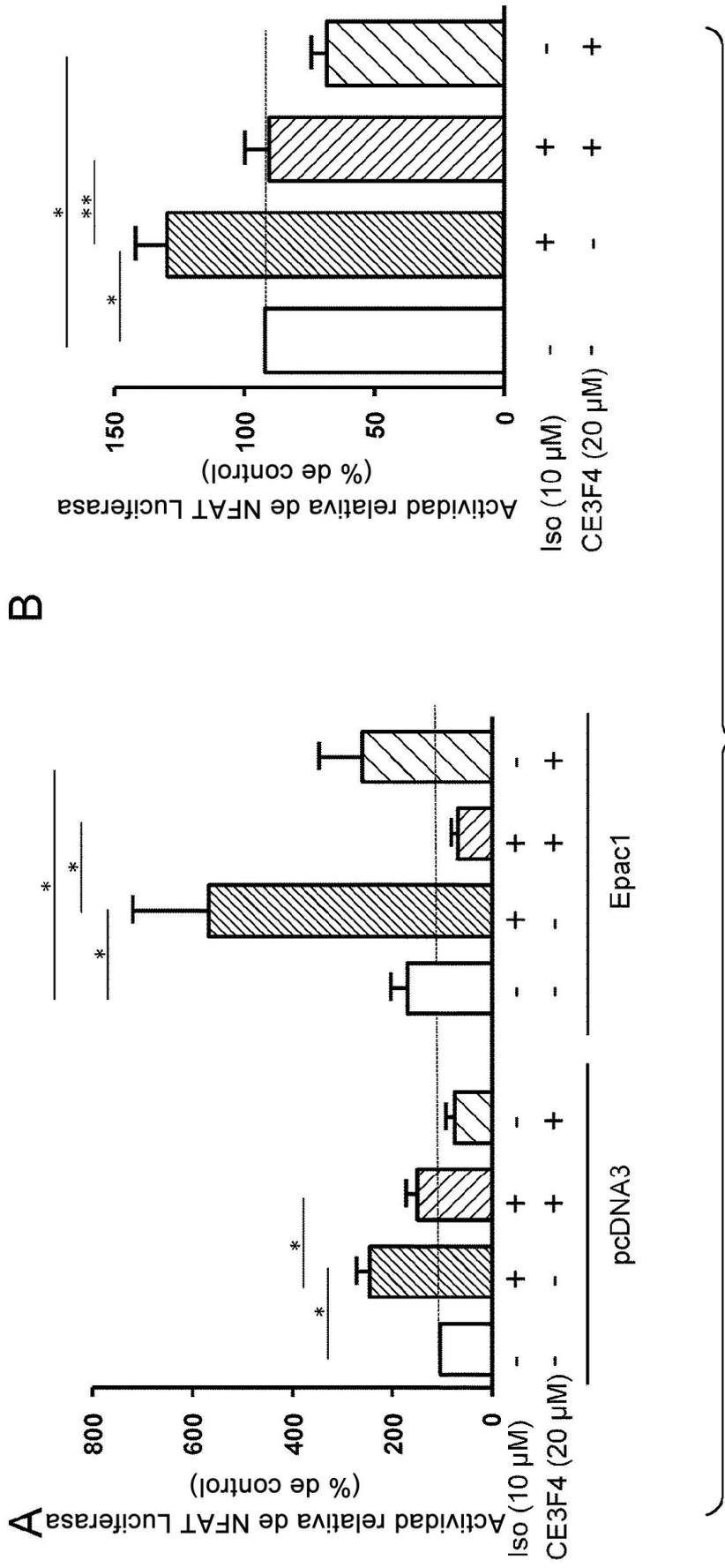


FIG.4

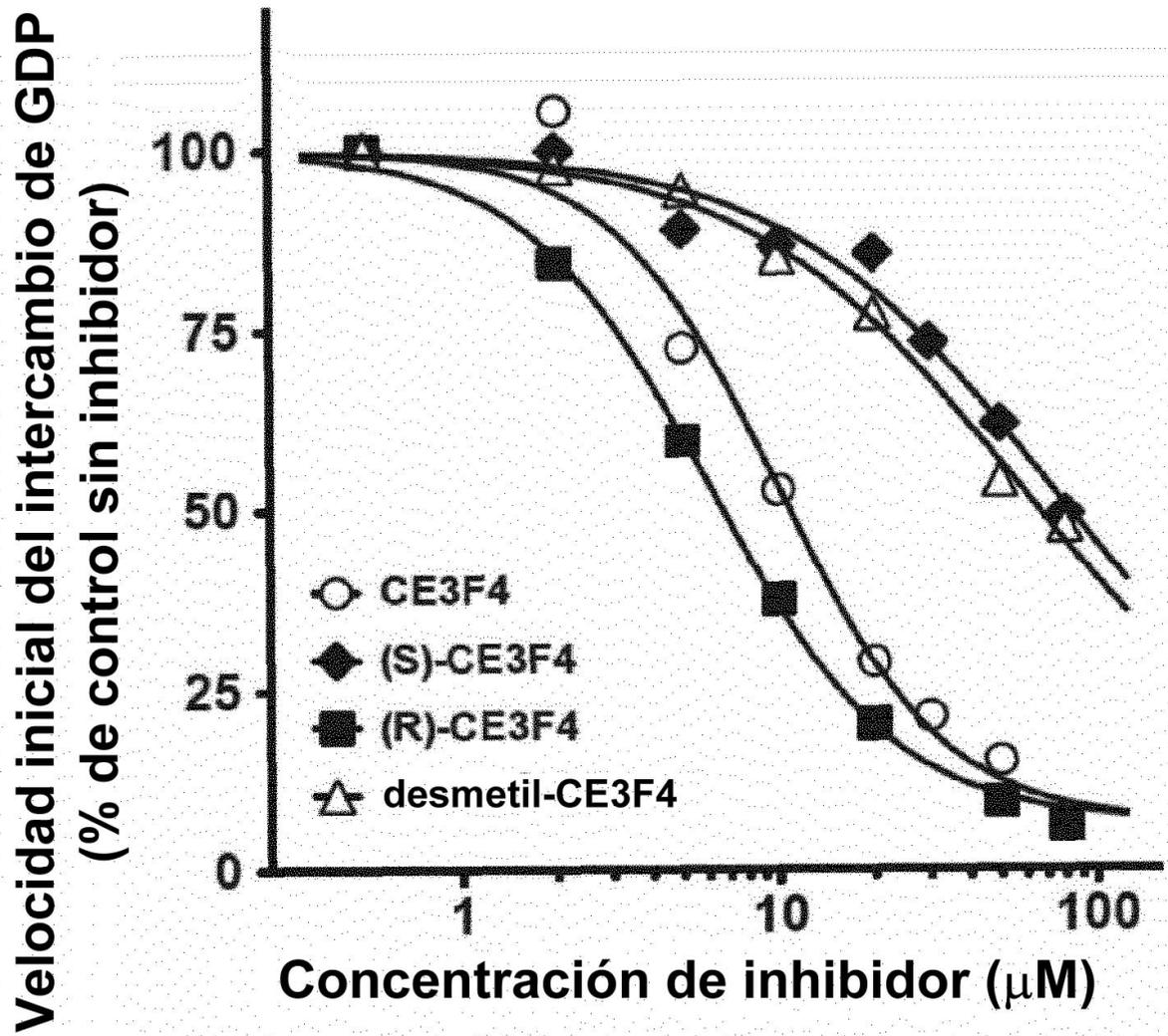
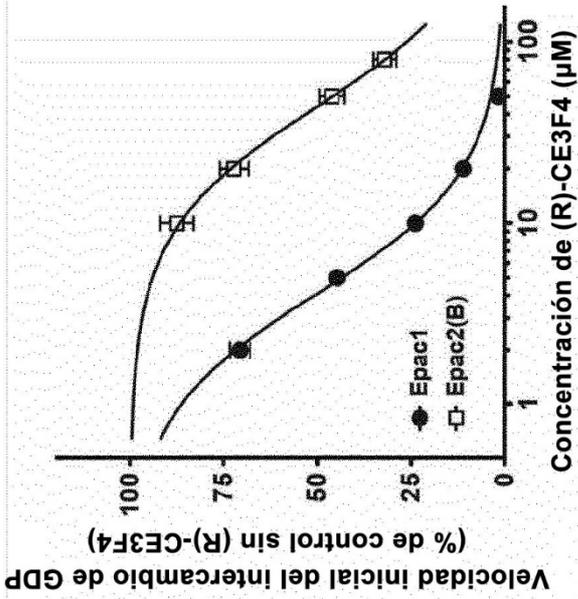
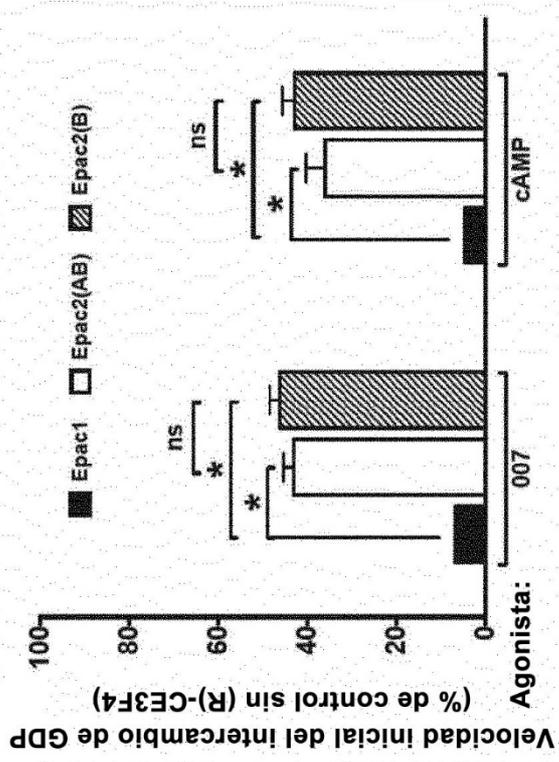


FIG.5

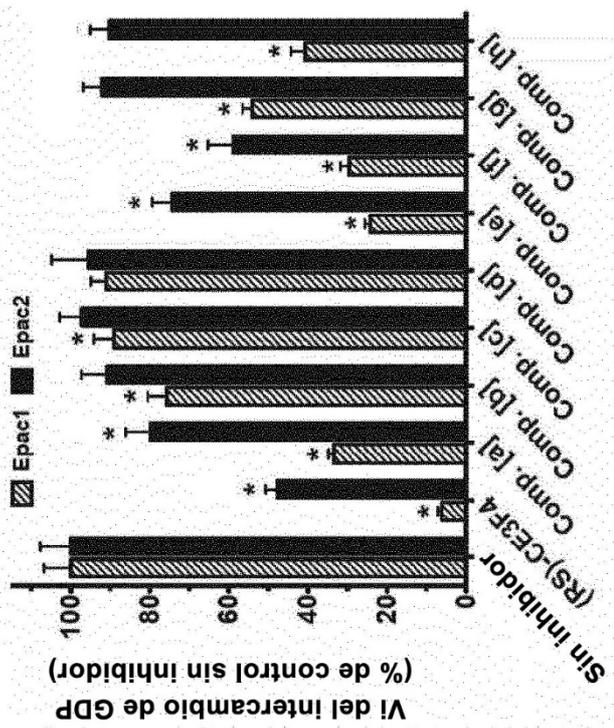
FIG.6



B



A



C