



MD 4489 C1 2018.01.31

## REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4489** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *C07D 281/10* (2006.01)  
*A61K 31/554* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)  
*A61P 19/08* (2006.01)

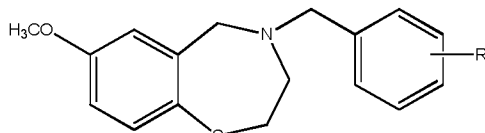
## (12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2014 0119 (22) Data depozit: 2013.04.17  (31) Nr.: 61/625890; 12167732.2 (32) Data: 2012.04.18; 2012.05.11 (33) Țara: US; EP (41) Data publicării cererii: 2015.04.30, BOPI nr. 4/2015	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.06.30, BOPI nr. 6/2017  (85) 2014.11.11 (86) PCT/EP2013/057958, 2013.04.17 (87) WO 2013/156505 A1, 2013.10.24
(71) Solicitanți: LES LABORATOIRES SERVIER, FR; ARMGO PHARMA INC, US (72) Inventatori: YAN Jiaming, US; BELVEDERE Sandro, US; WEBB Yael, US; BERTRAND Marc, FR; VILLENEUVE Nicole, FR; MARKS ANDREW R., US; PEGLION Jean-Louis, FR (73) Titulari: LES LABORATOIRES SERVIER, FR; ARMGO PHARMA INC, US (74) Mandatar autorizat: SIMANENKOVA Tatiana	

(54) Derivați de 1,4-benzotiazepină, procedeu de sinteză a lor, compoziții farmaceutice care le conțin și utilizarea acestora pentru tratarea sau prevenirea afecțiunilor care implică modularea receptorilor de rianodină

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la derivați ai 1,4-benzotiazepinei reprezentați prin formula structurală (I):



(I)

unde R este COOH, și la sărurile acceptabile farmaceutice ale acestora.

2  
Se descrie utilizarea compușilor menționați pentru tratarea stărilor, tulburărilor și a bolilor asociate cu receptorii rianodinei (RyRs), care reglează funcționarea canalelor de calciu în celule.

Invenția dezvăluie, de asemenea, compoziții farmaceutice care conțin compuși descriși și utilizarea acestora pentru tratarea bolilor și a stărilor asociate cu RyRs, în special a tulburărilor sistemului cardiac, osteomuscular și nervos central.

Revendicări: 27

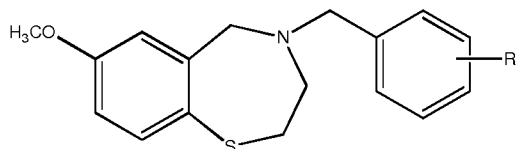
Figuri: 11

MD 4489 C1 2018.01.31

**(54) 1,4-Benzothiazepine derivatives, method for the synthesis thereof, pharmaceutical compositions comprising the same, and use thereof for treating and preventing disorders involving modulation of ryanodine receptors**

**(57) Abstract:**

1  
The present invention relates to 1,4-benzothiazepine derivatives represented by the structure of Formula (I):



(I)

wherein R is COOH, and pharmaceutically acceptable salts thereof.

2

The invention describes the use to treat disorders and diseases associated with ryanodine receptors (RyRs) that regulate calcium channel functioning in cells.

The invention also discloses pharmaceutical compositions comprising the compounds and uses thereof to treat diseases and conditions associated with RyRs, in particular cardiac, musculoskeletal and central nervous system disorders.

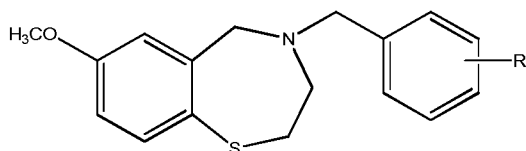
Claims: 27

Fig.: 11

**(54) Производные 1,4-бензотиазепина, способ их синтеза, фармацевтические композиции их содержащие и их применение для лечения или предотвращения нарушений вызванных модуляцией рецепторов рианодина**

**(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к производным 1,4-бензотиазепина, представленными структурной формулой (I):



(I)

где R является COOH, и к их фармацевтически приемлемым солям.

Описано использование указанных соединений в лечении состояний,

2

нарушений и заболеваний, связанных с рецепторами рианодина (RyRs), которые регулируют функционирование кальциевых каналов в клетках.

Изобретение также раскрывает фармацевтические композиции, включающие описанные соединения и их использование для лечения заболеваний и состояний, связанных с RyRs, в частности заболеваний сердечной, костно-мышечной и центральной нервной систем.

П. формулы: 27

Фиг.: 11

**Descriere:****(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**DOMENIUL INVENȚIEI

5 Prezentă invenție se referă la derivați ai 1,4-benzotiazepinei și utilizarea lor în tratarea tulburărilor și bolilor asociate cu receptorii rianodinei (RyRs), care reglează funcționarea canalelor de calciu în celule. Invenția dezvăluie, de asemenea, compoziții farmaceutice care conțin acești compuși și utilizările acestora pentru tratarea bolilor și stărilor asociate cu RyRs, în special tulburările sistemului cardiac, muscular-osos și nervos central (SNC).

10 PREMISELE INVENȚIEI

Reticulul sarcoplasmic (RS) este o structură în celule care funcționează, printre altele, ca un depozit specializat de calciu ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular. RyRs sunt canale în RS, care se deschid și se închid pentru a regla eliberarea  $\text{Ca}^{2+}$  din RS în citoplasma intracelulară a celulei. Eliberarea  $\text{Ca}^{2+}$  în citoplasmă din RS sporește concentrația de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmic. Probabilitatea de deschidere a RyRs se referă la probabilitatea că un RyR este deschis în orice moment, și, prin urmare, este capabil să elibereze  $\text{Ca}^{2+}$  în citoplasmă din RS.

Există trei tipuri de RyR, toate fiind foarte omoloage: RyR1, RyR2 și RyR3. RyR1 se găsește predominant în mușchii scheletici, precum și în alte țesuturi, RyR2 se găsește predominant în inimă, precum și în alte țesuturi, și RyR3 se găsește în creier, precum și în alte țesuturi. RyR este un tetramer. O parte a complexului RyR este formată de patru polipeptide RyR în asociere cu patru proteine de legare FK506 (FKBP) (calstabin), în mod specific FKBP12 (calstabin1) și FKBP12.6 (calstabin2). Calstabin1 se leagă de RyR1 și RyR3, în timp ce calstabin2 se leagă de RyR2. Proteinele calstabin se leagă de RyR (o moleculă per subunitate RyR), stabilizează funcția RyR, facilitează deschiderea cuplată dintre RyRs învecinați și previn activarea anormală (scurgerea  $\text{Ca}^{2+}$ ) a canalului prin stabilizarea stării închise a canalului.

Receptorul 2 al rianodinei și bolile cardiace

30 În mușchiul striat cardiac, RyR2 este cel mai mare canal de eliberare a  $\text{Ca}^{2+}$  necesar pentru cuplarea de excitație-contrație (EC) și contracția musculară. În timpul cuplării EC, depolarizarea membranei celulare cardiaco-musculare în timpul fazei zero a potențialului de acțiune activează canalele de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaj-dependente. În schimb, influxul de  $\text{Ca}^{2+}$  prin canalele voltaj-dependente deschise inițiază eliberarea  $\text{Ca}^{2+}$  din RS prin RyR2. Acest proces este cunoscut ca eliberarea  $\text{Ca}^{2+}$  indusă de  $\text{Ca}^{2+}$ . Eliberarea  $\text{Ca}^{2+}$  indusă de  $\text{Ca}^{2+}$  și mediată de RyR2 activează ulterior proteinele contractile în celula cardiacă, ceea ce duce la contracția musculară cardiacă.

35 Fosforilarea RyR2 de kinaza proteică A (PKA) este o parte importantă a reacției "luptă sau zboară", care sporește cuplarea EC cardiacă prin mărirea cantității de  $\text{Ca}^{2+}$  eliberat pentru un anumit declanșator. Această cale de semnalizare oferă un mecanism prin care activarea sistemului nervos simpatic (SNS), ca răspuns la stres, duce la creșterea debitului cardiac. 40 Fosforilarea RyR2 de PKA duce la disocierea parțială a calstabin2 din canal, care la rândul său, duce la creșterea probabilității de deschidere, precum și la creșterea eliberării de  $\text{Ca}^{2+}$  din RS în citoplasma intracelulară.

Insuficiența cardiacă (IC) se caracterizează printr-o stare hiperadrenergică susținută, în care nivelurile de catecolamine serice sunt ridicate cronic. O consecință a acestei stări hiperadrenergice cronice este hiperfosforilarea persistentă a RyR2 de PKA, astfel încât 3-4 din cele patru Ser2808 în fiecare canal homotetrameric RyR2 sunt fosforilate cronic (Marx SO, et al. Cell, 2000;101(4):365-376). În special, hiperfosforilarea cronică a RyR2 de PKA este asociată cu eliminarea subunității canal-stabilizare calstabin2 din complexul macromolecular al canalului RyR2. Eliminarea proteinei calstabin duce la o "scurgere" 50 diastolică a  $\text{Ca}^{2+}$  din RS din complexul RyR, ceea ce contribuie la contractilitate redusă (Marx et al., 2000). Datorită activării curenților de depolarizare spre interior, această "scurgere" diastolică a  $\text{Ca}^{2+}$  din RS este asociată, de asemenea, cu aritmii cardiace fatale (Lehnart et al, J Clin Invest. 2008;118(6):2230-2245). Într-adevăr, șoarecii creați cu RyR2 fără site de fosforilare de PKA sunt protejați de progresia IC după infarctul miocardic (IM) 55 (Wehrens XH et al. Proc Natl Acad Sci SUA. 2006;103(3):511-518). În plus, hiperfosforilarea cronică de PKA a RyR2 în IC este asociată cu remodelarea complexului macromolecular RyR2 care include eliminarea fosfatazelor (Marx et al. 2000) PP1 și PP2a (defosforilarea defectuoasă Ser2808) și fosfodiesterazei (PDE4D3) de tip 4 specifică adenosin monofosfatului ciclic (AMPC) din complexul RyR2. Eliminarea PDE4D3 din

complexul RyR2 cauzează creșterea durabilă a nivelurilor locale de AMPc (Lehnart SE, et al., *Cell* 2005;123(1):25–35). Astfel, scurgerea diastolică a  $Ca^{2+}$  din RS contribuie la progresia IC și aritmie. Mai mult decât atât, un raport recent a demonstrat că șoarecii activați cu RyR2-S2808D+/+ (acid aspartic înlocuind serina 2808), care imită hiperfosforilarea constitutivă a RyR2 de PKA, arată eliminarea calstabin2 și RyR2 neetanș. Șoarecii cu RyR2-S2808D+/+ dezvoltă cardiomiopatie dependentă de vârstă, demonstrează oxidarea și nitrozilarea sporită a RyR2, un conținut redus al depozitului de  $Ca^{2+}$  în RS, și scurgere diastolică crescută a  $Ca^{2+}$  din RS. După infarctul miocardic, șoarecii cu RyR2-S2808D+/+ demonstrează o mortalitate sporită comparativ cu puii WT. Tratamentul cu S107, un derivat al 1,4-benzotiazepinei care stabilizează interacțiunile dintre RyR2 și calstabin2 (WO 2007/024717 [1]), a inhibat scurgerea diastolică a  $Ca^{2+}$  din RS mediată de RyR2 și a redus progresia IC atât în șoarecii WT, cât și cei RyR2-S2808D+/+ (Shan et al., *J Clin Invest.* 2010 Dec 1;120(12):4375-87).

Mai mult decât atât, RyR2 conține circa 33 de reziduuri de tiol libere, fapt ce îl face foarte sensibil la starea celulară de oxidoreducere. Oxidarea cistinei facilitează deschiderea RyR și scurgerea  $Ca^{2+}$  din RS. Shan et al., 2010, a demonstrat că oxidarea și nitrozilarea RyR2 și disocierea subunității de stabilizare calstabin2 din RyR2 induce scurgerea  $Ca^{2+}$  din RS.

Tahicardia ventriculară polimorfă catecolaminergică (TVPC) este o tulburare ereditară la persoanele cu inima cu o structură normală. S-a stabilit că peste 50 de mutații diferite ale RyR2 sunt legate de TVPC. Pacienții cu TVPC suferă de sincopă și moarte subită cardiacă (MSC), de la vârstă timpurie până la adultă, și la 35 de ani mortalitatea este de până la 50%. Persoanele cu TVPC au aritmii ventriculare atunci când sunt supuși la efort fizic, însă nu dezvoltă aritmii în timpul odihnei. Mutațiile RyR2 asociate cu TVPC duc la canale RyR2 "neetanș" din cauza legării reduse a subunității calstabin2 (Lehnart et al., 2008). Șoarecii heterozigoți pentru mutația R2474S în RyR2 (șoareci RyR2-R2474S) prezintă convulsii spontane tonico-clonice generalizate (care au apărut în absența aritmiilor cardiace), aritmii ventriculare induse prin efort fizic, și MSC. Tratamentul cu S107 a sporit legarea calstabin2 de canalul mutant RyR2-R2474S, a inhibat scurgerea canalului, a prevenit aritmiile cardiace și a ridicat pragul de convulsii (Lehnart et al., 2008).

#### Receptorul 1 al rianodinei și bolile musculoscheletice

Contractia mușchilor scheletici este activată prin eliberarea  $Ca^{2+}$  din RS prin RyR1. Depolarizarea membranei (T)-tubulare transversale activează senzorul de tensiune (Cav1.1) al receptorului dihidropiridină, care la rândul său activează canalele RyR1 printr-o interacțiune directă proteină-proteină cauzând eliberarea depozitelor de  $Ca^{2+}$  din RS.  $Ca^{2+}$  se leagă de troponina C permițând apariția punților transversale de actină-miozină și scurtarea sarcomerului.

În condiții de stres muscular prelungit (de ex., în timpul alergării maratonului) sau de o boală, cum ar fi insuficiența cardiacă, ambele fiind caracterizate prin activarea cronică a SNS, funcția musculaturii scheletice este afectată, probabil din cauza cuplării CE modificate. În special, cantitatea de  $Ca^{2+}$  eliberat din RS în timpul fiecărei contracții a mușchiului este redusă, pot avea loc eliberări anormale de  $Ca^{2+}$ , și recaptarea  $Ca^{2+}$  este încetinită (Reiken, S, et al. 2003. *J. Cell Biol.* 160:919–928). Aceste observații sugerează că efectele nocive ale activării cronice a SNS pe musculatura scheletică pot fi din cauza, cel puțin în parte, defectelor în semnalizarea  $Ca^{2+}$ .

Complexul macromolecular RyR1 constă dintr-un tetramer al subunității RyR1 560-kDa care formează un eșafodaj pentru proteinele care reglează funcția canalelor, inclusiv PKA și fosfodiesteraza 4D3 (PDE4D3), fosfataza proteică 1 (PP1) și calstabin1. Proteina de ancorare a kinazei A (mAKAP) fixează PKA și PDE4D3 de RyR1, în timp ce spinofilina fixează PP1 de canal (Marx et al. 2000; Brillantes et al., *Cell*, 1994, 77, 513-523; Bellinger et al. *J. Clin. Invest.* 2008, 118, 445-53). Subunitățile catalitice și de reglementare ale PKA, PP1, și PDE4D3 reglează fosforilarea RyR1 mediată de PKA la Ser2843 (Ser2844 în șoarece). S-a demonstrat că fosforilarea RyR1 mediată de PKA la Ser2844 crește sensibilitatea canalului față de  $Ca^{2+}$  citoplasmatic, reduce afinitatea de legare a calstabin1 pentru RyR1, și destabilizează starea închisă a canalului (Reiken et al., 2003; Marx, S.O. et al., *Science*, 1998, 281:818-821). Concentrațiile de calstabin1 în musculatura scheletică sunt de circa 200 nM și fosforilarea RyR1 de PKA reduce afinitatea de legare a calstabin1 pentru RyR1 de la circa 100-200 nM până la peste 600 nM. Astfel, în condiții fiziologice, reducerea afinității de legare a calstabin1 pentru RyR1, care rezultă din fosforilarea RyR1 de PKA la Ser2843, este suficientă pentru a reduce substanțial cantitatea de calstabin1 prezentă în complexul RyR1.

Hiperfosforilarea cronică a RyR1 de PKA la Ser2843 (definită ca fosforilarea PKA a 3 sau 4 situsuri din cele 4 situsuri PKA Ser2843 prezente în fiecare homotetramer RyR1) duce la canale "neetanșe" (adică, canale predispușe la deschidere în repaus), care contribuie la disfuncția musculaturii scheletice asociată cu stări hiperadrenergice persistente, cum sunt cele care apar la persoanele cu insuficiență cardiacă (Reiken et al., 2003).

Mai mult decât atât, reglarea RyR1 prin modificări posttranslaționale, altele decât fosforilare, cum ar fi de nitrozilarea grupărilor de sulfhidril liber pe reziduuri de cistină (*S*-nitrozilare), precum și oxidarea canalelor, au dus la creșterea activității canalelor RyR1. S-a constatat că *S*-nitrozilarea și oxidarea RyR1 reduc legarea calstabin1 de RyR1.

Anterior Bellinger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 2008, 105(6):2198-2002) au raportat că în timpul efortului fizic excesiv la șoareci și oameni, RyR1 este hiperfosforilat progresiv de PKA, *S*-nitrozilat și epuizat de PDE4D3 și calstabin1, ducând la canale "neetanșe" care cauzează scăderea capacității fizice la șoareci. Tratamentul cu S107 a împiedicat eliminarea calstabin1 din complexul RyR1, a îmbunătățit generarea de forțe și capacitatea fizică, și a redus activitatea calpainei de protează neutră dependentă de  $Ca^{2+}$  și concentrațiile plasmatice de creatin kinază.

Distrofia musculară Duchenne (DMD) este una dintre principalele boli genetice letale a copilăriei. DMD este X-linkat, afectând 1 din 3500 de băieți noi-născuți și de obicei duce la moartea până la vârsta de ~30 ani din cauza insuficienței respiratorii sau cardiace. Mutațiile distrofinei asociate cu DMD duc la pierderea completă a proteinei de distrofină, perturbând astfel legătura dintre citoscheletul subsarcolemei și matricea extracelulară. Această legătură este esențială pentru protejerea și stabilizarea musculaturii contra leziunilor induse de contracție. În prezent, nu există nici un remediu pentru DMD și majoritatea tratamentelor în clinică sunt paliative. Intervențiile emergente în studiile clinice din Faza I/II reprezintă ignorarea exonului, inhibarea miostatinei, și suprareglarea utropinei. Cu toate acestea, există probleme legate de livrarea sistemică, susținerea ignorării exonului, și suprareglarea utropinei. În plus, în studiile clinice din Faza I/II, inactivarea miostatinei pentru creșterea dimensiunii musculare nu a dus la îmbunătățirea forței sau funcției musculare. Instabilitatea sarcolemei din cauza mutațiilor în distrofină are un efect de cascadă. Un efect major este concentrația crescută de  $Ca^{2+}$  citosolic, ceea ce duce la activarea proteazelor dependente de  $Ca^{2+}$  (calpaine). Un alt efect este inflamația și activitatea sporită iNOS, care poate provoca oxidarea/nitrozilarea proteinelor, lipidelor, și ADN-ului. Patologia musculară DMD este progresivă și depășește cu mult instabilitatea sarcolemei. Astfel patologia este conformă cu instabilitatea sarcolemei sporind susceptibilitatea la o altă leziune. S-a demonstrat recent că oxidarea sau nitrozilarea excesivă a RyR1 poate perturba interacțiunea calstabin1 cu complexul RyR1, ceea ce duce la neetanșetatea RyR1 și slăbiciune musculară într-un model de șoarece cu distrofie musculară (mdx), și că tratamentul cu S107 îmbunătățește indicii funcției musculare în acest model de șoarece (Bellinger, A. et al. 2009, Nature Medicine, 15:325-330).

Pierderea masei musculare și a forței (sarcopenie) legată de vârstă contribuie la invaliditate și creșterea mortalității. Andersson, D. et al. (Cell Metab. 2011 Aug 3;14(2):196-207) au raportat că RyR1 de la șoarecii în vârstă (24 de luni) este oxidat, nitrozilat cu cisteină, și epuizat de calstabin1, comparativ cu RyR1 de la adulții mai tineri (3-6 luni). Această remodelare a complexului de canale RyR1 a dus la canale "neetanșe" cu probabilitate crescută de deschidere, ceea ce duce la scurgerea calciului intracelular în mușchii scheletici. Tarea șoarecilor în vârstă cu S107 a stabilizat legarea calstabin1 de RyR1, a redus scurgerea calciului intracelular, a diminuat speciile reactive de oxigen (SRO), și a îmbunătățit eliberarea  $Ca^{2+}$  tetanic, forța specifică musculaturii, precum și capacitatea fizică.

Publicațiile internaționale de brevet PCT WO 2005/094457 [2], WO 2006/101496 [3] și WO 2007/024717 dezvăluie derivați ai 1,4-benzotiazepinei și utilizarea lor în tratamentul tulburărilor cardiace, musculare scheletice și cognitive, printre altele.

Publicația internațională de brevet PCT WO 2008/060332 [4] se referă la utilizarea derivaților 1,4-benzotiazepinei pentru tratarea oboselii musculare la subiecții care suferă de diverse patologii, cum ar fi distrofia musculară, sau la subiecții care suferă de oboseală musculară ca urmare a efortului fizic durabil, prelungit și/sau extenuant, sau stresului cronic.

Publicația internațională de brevet PCT WO 2008/021432 [5] se referă la utilizarea derivaților 1,4-benzotiazepinei pentru tratamentul și/sau prevenirea bolilor, tulburărilor și stărilor care afectează sistemul nervos.

Publicația internațională de brevet PCT WO 2012/019076 [6] se referă la utilizarea derivaților 1,4-benzotiazepinei pentru tratamentul și/sau prevenirea leziunii de ischemie/reperfuzie cardiacă. Fauconnier et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(32): 13258-63 a relatat că scurgerea RyR mediată de activarea caspazei-8 duce la leziunea ventriculului stâng după ischemia-reperfuzia miocardică, și că tratamentul cu S107 a inhibat scurgerea  $Ca^{2+}$  din RS, a redus aritmiile ventriculare, mărimea infarctului, și remodelarea ventriculului stâng peste 15 de zile după reperfuzie.

Publicația internațională de brevet PCT WO 2012/019071 [7] se referă la utilizarea derivaților 1,4-benzotiazepinei pentru tratamentul și/sau prevenirea sarcopeniei.

Publicația internațională de brevet PCT WO 2012/037105 [8] se referă la utilizarea derivaților 1,4-benzotiazepinei pentru tratamentul și/sau prevenirea tulburărilor și bolilor neuronale induse de stres.

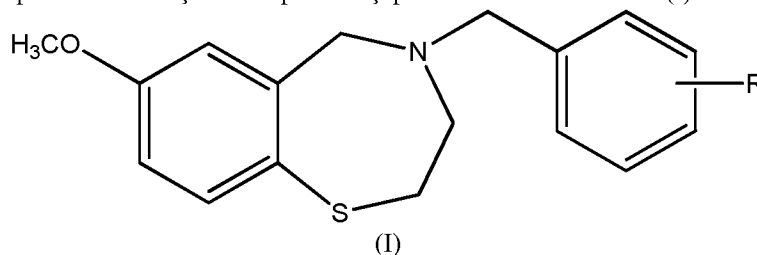
Există necesitatea de a identifica noi compuși eficienți pentru tratarea tulburărilor și bolilor asociate cu RyRs, inclusiv tulburările și bolile musculare scheletice și cardiace. Mai exact, rămâne necesitatea de a identifica noi substanțe care pot fi utilizate pentru tratarea tulburărilor asociate cu RyR, de exemplu, prin repararea scurgerii în canalele RyR, și sporirea legării proteinelor calstabin de RyRs fosforilați de PKA/oxidați/nitrozilați, și de RyRs mutați care altminteri au redus afinitatea pentru, sau nu se leagă de, calstabin.

#### ESENȚA INVENȚIEI

Prezenta invenție propune noi derivați ai 1,4-benzotiazepinei, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora. În unele variante de executare, compușii din prezenta invenție sunt stabilizatori ai canalelor de calciu ai receptorului rianodinei (RyR), denumiți uneori "Rycals<sup>TM</sup>". Prezenta invenție propune, de asemenea, procedee de utilizare a acestor compuși pentru tratarea tulburărilor și bolilor asociate cu RyRs.

Compușii prezentei invenții reprezintă o selecție dintre derivații 1,4-benzotiazepinei descriși în WO 2007/024717. WO 2007/024717 descrie compuși cu o structură similară, cu toate acestea, după cum se descrie în continuare în prezenta, s-a constatat că acești compuși sunt foarte instabili și astfel utilitatea lor terapeutică în calitate de medicamente este limitată. Problema care stă la baza prezentei cereri este, așadar, furnizarea derivaților alternativi ai 1,4-benzotiazepinei care nu sunt doar farmacologic activi, ci și posedă proprietăți favorabile, cum ar fi stabilitate metabolică înaltă, și astfel sunt adecvați în calitate de medicamente în tratarea bolilor și stărilor asociate cu RyR, de exemplu tulburările cardiace, musculare scheletice și ale sistemului nervos central (SNC). S-a descoperit în mod neașteptat că compușii cu formula (I) sunt stabili, precum și farmacologic activi, oferind astfel o soluție tehnică problemei care stă la baza prezentei invenții.

Compușii prezentei invenții sunt reprezentați prin structura cu formula (I):



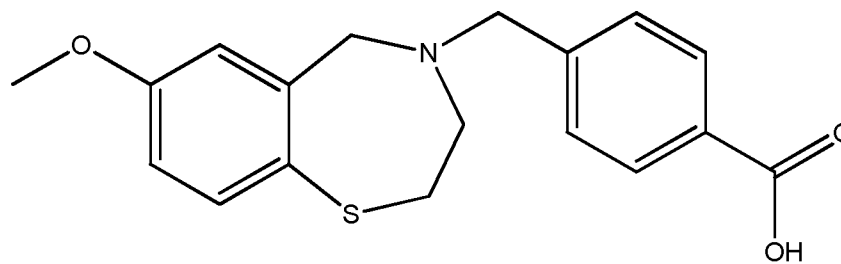
unde

R este COOH;  
și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora.

Compușii cu Formula (I) pot fi prezenți sub formă de sare cu un acid sau bază acceptabilă farmaceutic. Astfel de săruri sunt selectate, de preferință, din grupul ce constă din săruri de sodiu, potasiu, magneziu, hemifumarat, hidroclorură și hidrobromură, fiecare posibilitate reprezentând o variantă de executare separată a prezentei invenții. O sare preferată în prezent este sarea de sodiu. O altă sare preferată în prezent este sarea de hemifumarat.

În unele variante de executare specifice, compusul este selectat din grupul ce constă din compusul 1, compusul 4 și compusul 6, și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora. Structurile acestor compuși sunt descrise mai jos.

Intr-o variantă de executare preferată, compusul este reprezentat prin structura compusului (1):



(1)

sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora.

În unele variante de executare, compusul 1 este furnizat ca compusul de bază. Totuși, în  
5 alte variante de executare compusul 1 este furnizat sub formă de sare cu un acid sau bază  
acceptabilă farmaceutic. De preferință, o asemenea sare este selectată din grupul ce constă  
din săruri de sodiu, potasiu, magneziu, hemifumarat, hidrociorură și hidrobromură, fiecare  
posibilitate reprezentând o variantă de executare separată a prezentei invenții. O sare  
10 preferată în prezent este sarea de sodiu. O altă sare preferată în prezent este sarea de  
hemifumarat.

Prezenta invenție propune, de asemenea, procedee de sinteză a compușilor invenției,  
precum și sărurilor acestora.

Prezenta invenție propune, de asemenea, compoziții farmaceutice care cuprind unul sau  
mai mulți compuși ai invenției, și cel puțin un aditiv sau excipient, de ex., substanțe de  
15 umplere, diluanți, lianți, agenți de dezintegrare, soluții tampon, coloranți, emulgatori, agenți  
de îmbunătățire a aromei, gelifianți, agenți de alunecare, conservanți, agenți de solubilizare,  
stabilizatori, agenți de suspendare, îndulcitori, agenți de tonicitate, agenți de umectare,  
emulgatori, agenți de dispersare, agenți de umflare, agenți de întârziere, lubrifianti,  
absorbantți, și agenți de creștere a vâscozității. Compozițiile pot fi prezentate în capsule,  
20 granule, pulberi, soluții, pliculețe, suspensii, sau formă de dozare comprimat.

Prezenta invenție propune, de asemenea, procedee de tratare sau prevenire a diverselor  
tulburări, boli și stări asociate cu RyRs, cum ar fi tulburările și bolile cardiace, cognitive  
musculo-scheletice, ale SNC și neuromusculare, care includ administrarea unui subiect, care are  
nevoie de un astfel de tratament, a unei cantități de un compus cu Formula (I) sau o sare a  
25 acestuia, eficientă pentru a preveni sau trata o tulburare sau boală asociată cu un RyR. Prezenta  
invenție propune, de asemenea, un procedeu de prevenire sau tratare a unei scurgeri în RyR  
(inclusiv RyR1, RyR2 și RyR3) la un subiect, inclusiv administrarea subiectului a unei cantități de  
un compus cu Formula (I) sau o sare a acestuia, eficientă pentru prevenirea sau tratarea unei  
scurgeri în RyR.

30 În plus, prezenta invenție propune un procedeu de modulare a legării RyRs și proteinelor  
calstabin la un subiect, inclusiv administrarea subiectului respectiv a unei cantități de un  
compus cu Formula (I) sau o sare a acestuia, eficientă pentru a modula cantitatea de calstabin  
legată de RyR.

Prezenta invenție se referă în continuare la utilizarea unui compus cu Formula (I) pentru  
35 fabricarea unui medicament pentru tratamentul și/sau prevenirea tulburărilor, bolilor și  
stărilor asociate cu RyRs, cum ar fi tulburările și bolile cardiace, musculo-scheletice și  
cognitive/SNC. Într-o altă variantă de executare, prezenta invenție se referă la utilizarea unui  
compus cu Formula (I) pentru fabricarea unui medicament pentru prevenirea sau tratarea unei  
scurgeri în RyR. Într-o altă variantă de executare, prezenta invenție se referă la utilizarea  
40 unui compus cu Formula (I) pentru fabricarea unui medicament pentru modularea cantității  
de proteine calstabin legate de RyR.

Procedeele invenției pot fi aplicate într-un sistem *in vitro* (de ex., culturi de celule sau  
țesuturi) sau *in vivo* (de ex., într-un animal neuman sau om).

În unele variante de executare, compușii invenției sunt furnizați în combinație cu terapia  
45 de ignorare a exonului, de ex. oligonucleotide antisens (OA), astfel încât să sporească  
ignorarea exonului într-un ARNm de interes, de ex., gena DMD, așa cum este descris mai  
jos. Alte trăsături caracteristice și avantaje ale prezentei invenții vor deveni evidente din  
următoarea descriere detaliată și figuri.

50

DESCRIEREA SUCCINTĂ A FIGURILOR

**Figura 1A** Imunoblot cu anticorp calstabin2 ce arată legarea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA în absența (-) sau prezența a 100 nM de compus 1. (+): calstabin ce se leagă de RyR2 nefosforilat de PKA. S36 (US 7,544,678 [9]), este utilizat ca martor pozitiv.

5 **Figura 1B** Imunoblot cu anticorp calstabin2 ce arată legarea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA în absența (-) sau prezența a 100 nM de compus 2, compus 3, compus 4. (+): calstabin ce se leagă de RyR2 nefosforilat de PKA. S36 este utilizat ca martor pozitiv.

10 **Figura 1C** Imunoblot cu anticorp calstabin1 ce arată legarea calstabin1 de RyR1 fosforilat de PKA în absența (Neg) sau prezența concentrațiilor indicate de compus 1 sau compus 4. (Poz): calstabin ce se leagă de RyR1 nefosforilat de PKA. S36 este utilizat ca martor pozitiv.

15 **Figura 2** Figura 2A: Imunoblot cu anticorp calstabin1 ce arată concentrațiile de calstabin1 în complexe RyR1 imunoprecipitate din lizatele tibiale la șoareci cărora li s-a administrat vehiculul (50:50 DMSO/PEG), izoproterenol de unul singur (ISO) sau izoproterenol împreună cu concentrațiile indicate de compus 1 în pompe osmotice. S36 este utilizat ca martor la 3.6 mM. Figura 2B: cuantificarea % calstabin1 care se leagă din nou de RyR1.

20 **Figura 3** Model de insuficiență cardiacă cronică la șobolani indusă de leziunea de ischemie-reperfuzie (I/R). Pentru protocolul I/R, artera coronară descendentă anterioară stângă (DAS) a fost astupată timp de 1 oră.

25 **Figura 4** Volumele ventriculului stâng (VS) și fracția de ejeție (FE) la șobolani tratați cu compusul 1 în doză de 5 mg/kg/zi (5MK) sau 10 mg/kg/zi (10MK) în apa de băut comparativ cu animalele tratate cu vehiculul (H<sub>2</sub>O) și operate fals. Insuficiența cardiacă cronică a fost indusă de leziunea de ischemie-reperfuzie (I/R). Artera DAS a fost astupată timp de 1 oră; tratamentul a început peste o săptămână după reperfuzie și a continuat timp de 3 luni. Parametrii ecocardiografici au fost obținuți peste 1, 2 sau 3 luni de tratament. Figura 4A: VS Volumul diastolic final; Figura 4B: VS Volumul sistolic final; Figura 4C: FE. Figurile 4A și 4B: §  $P < 0,001$  față de animalele operate fals; \*  $P < 0,05$  față de vehicul; †  $P < 0,001$  față de vehicul. Figura 4C: §  $P < 0,001$  față de animalele operate fals; †  $P < 0,001$  față de vehicul.

30 **Figura 5** Figurile 5A-C ilustrează greutatea corporală (GC) (5A), mărimea infarctului (5B), și greutatea VS (5C), și Figura 5D prezintă conținutul de collagen la șobolani tratați cu compusul 1 în doză de 5 mg/kg/zi (5MK) și 10mg/kg/zi (10MK) în apă de băut comparativ cu animalele tratate cu vehicul (H<sub>2</sub>O) și operate fals. Insuficiența cardiacă cronică a fost indusă de leziunea de ischemie-reperfuzie (I/R). Artera DAS a fost astupată timp de 1 oră; tratamentul a început peste o săptămână după reperfuzie și a continuat timp de 3 luni. Parametrii au fost măsurați după 3 luni de tratament. Figurile 5A-C: nesemnificativ. Figura 5D: †††  $P < 0,001$  față de animalele operate fals; \*  $P < 0,05$  față de vehicul.

40 **Figura 6** Hemodinamica invazivă: Tensiunea sistolică a ventriculului stâng (TS VS) (6A), dP/dtmax (6B); și dP/dtmin (6C) la șobolani tratați cu compusul 1 în doză de 5 mg/kg/zi (5MK) sau 10mg/kg/zi (10MK) în apa de băut comparativ cu animalele tratate cu vehicul (H<sub>2</sub>O) și operate fals. Insuficiența cardiacă cronică a fost indusă de leziunea de ischemie-reperfuzie (I/R). Artera DAS a fost astupată timp de 1 oră; tratamentul a început peste o săptămână după reperfuzie și a continuat timp de 3 luni. Parametrii hemodinamici au fost măsurați după 3 luni de tratament. Figura 6A: nesemnificativ. Figura 6B: §  $P < 0,05$  față de animalele operate fals; \*  $P < 0,05$  față de vehicul. Figura 6C: †  $P < 0,01$  față de animalele operate fals; \*  $P < 0,05$  față de vehicul.

**Figura 7** Concentrațiile plasmatiche din compusul 1 ( $\mu\mu$ ) față de perioada zilei.

50 **Figura 8** FE la șobolani tratați cu compusul 1 sau compusul A în doză de 5 mg/kg/zi (5MK) în apă de băut comparativ cu animalele tratate cu vehiculul (H<sub>2</sub>O) și operate fals. Artera DAS a fost astupată timp de 1 oră; tratamentul a început peste o săptămână după reperfuzie și a continuat timp de 3 luni. Parametrii ecocardiografici au fost obținuți după 1, 2 sau 3 luni de tratament. §  $P < 0,001$  față de animalele operate fals; \*  $P < 0,05$  față de vehicul; †  $P < 0,001$  față de vehicul.

55 **Figura 9** Efectul compusului 1 asupra activității fizice spontane a șoarecilor mdx și WT comparativ cu martorii tratați cu vehicul (H<sub>2</sub>O).  $P < 0,001$  pentru zilele 1 -19 de activitate la șoarecii mdx cărora li s-au administrat doze de 10 și 50 mg/kg/zi (doza țintă) în apa de băut, comparativ cu grupul de control cărora i s-a administrat vehiculul.

**Figura 10** Raportul specific forță-frecvență a mușchiului EDL. (A) Șoarecii mdx tratați cu compusul 1 (5, 10 și 50 mg/kg/zi (doză țintă)) administrat în apa de băut, comparativ cu martorii tratați cu vehiculul (H<sub>2</sub>O) (n=5). p<0,05, pentru doza de 50 mg/kg/zi, la frecvențe de 150 Hz și mai mult. (B) WT, C57BL/6, șoarecii tratați cu compusul 1 (50 mg/kg/zi (doză țintă)) administrat în apa de băut, comparativ cu martorii tratați cu vehiculul (H<sub>2</sub>O) (n=4)

**Figura 11** Greutatea corporală medie (12A) și consumul de apă mediu (12B) al șoarecilor mdx și WT tratați cu vehiculul (H<sub>2</sub>O) sau compusul 1 (50 mg/kg/zi (doza țintă)) administrat în apa de băut.

#### DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

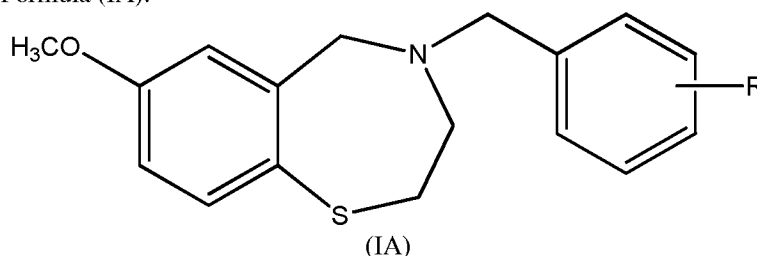
Se va înțelege că descrierea detaliată și exemplele specifice, cu indicarea diverselor variante de executare ale invenției sunt prezentate doar cu titlu de ilustrare, deoarece diverse schimbări și modificări în spiritul și domeniul de aplicare a invenției vor deveni evidente specialiștilor în domeniu din această descriere detaliată.

Așa cum este utilizat aici și în revendicările anexate, formele de singular "un", "o" includ referiri de plural, dacă conținutul nu indică clar altfel. Toate publicațiile, cererile de brevet, brevetele și alte referințe menționate aici sunt incluse prin referire în totalitatea lor.

Termenul "Rycals<sup>TM</sup>" se referă la stabilizatori ai canalelor de calciu ai receptorului rianodinei, reprezentați prin compuși cu Formula generală (I) sau (IA) așa cum este prevăzut de invenție, precum și prin compuși specifici desemnați prin numere numerice așa cum este prevăzut de invenție, și denumiți în mod colectiv în prezenta ca "compus(și) al(ai) invenției".

#### Compuși

În unele variante de executare, compușii din prezenta invenție sunt reprezentați prin structura cu Formula (IA):



unde

R este COOH sau un bioizoster al acestuia, COOR<sup>1</sup> sau CN; și

R<sup>1</sup> este un alchil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora.

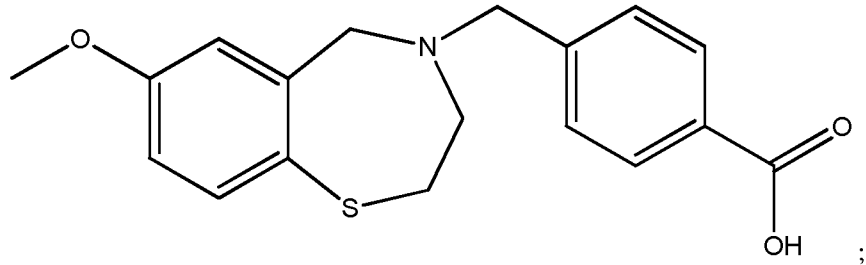
În unele variante de executare preferențiale, R în Formula (IA) este un acid carboxilic (COOH). În alte variante de executare preferențiale, R în Formula (IA) este un bioizoster al acidului carboxilic, de exemplu tetrazol. În mod alternativ, bioizosterul acidului carboxilic poate fi un heterociclu acid cum ar fi 1,2,4-oxadiazol-5(4H)-onă, 1,2,4-tiadiazol-5(4H)-onă, 1,2,4-oxadiazol-5(4H)-tionă, 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-tionă, 4-metil-1H-1,2,4-triazol-5(4H)-tionă, acidul 5-fluoroorotic, și altele. Bioizosteri suplimentari ai acidului carboxilic sunt descriși, de ex., în Hamada, Y. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006; 16:4354-4359; Herr, R.J. et al., Bioorg. Med. Chem. 2002; 10: 3379-3393; Olesen, P.H., Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2001; 4: 471; Patani, G.A. et al., J. Chem. Rev. 1996; 96:3147; Kimura, T. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006; 16: 2380-2386; and Kohara, Y. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995; 5(17): 1903-1908. Conținutul fiecăreia dintre referințele sus-menționate este inclus aici prin referință.

Intr-o variantă de executare preferențială, compușii prezentei invenții sunt reprezentați prin structura cu Formula (IA), unde R este COOH și săruri acceptabile farmaceutic ale acestuia (și anume, un compus cu formula (I)).

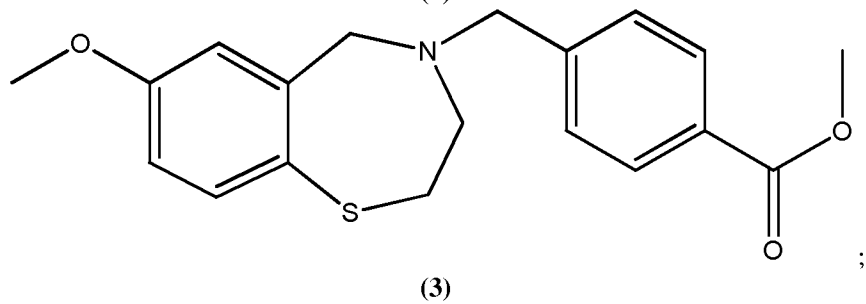
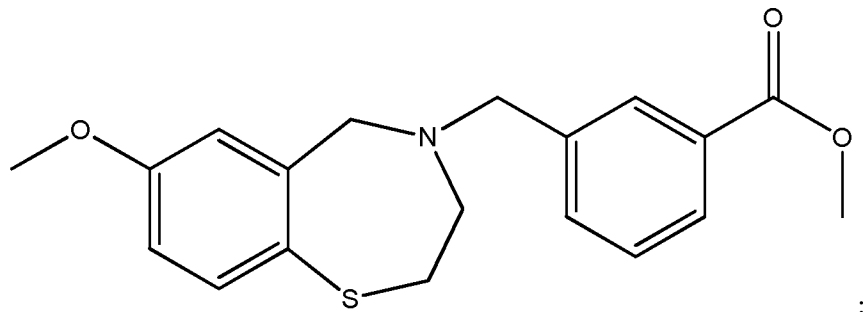
În alte variante de executare preferențiale, R în Formula (IA) este la poziția 4 a inelului fenil (de ex., poziția 7 a inelului benzotiazepinei). Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de executare separată a prezentei invenții. Compușii cu Formula (IA) sau (I) pot fi prezenți sub formă de sare cu un acid sau o bază acceptabilă farmaceutic. Astfel de săruri sunt selectate, de preferință, din grupul ce constă din săruri de sodiu, potasiu, magneziu, hemifumarat, hidrociorură și hidrobromură, fiecare posibilitate reprezentând o variantă de executare

separată a prezentei invenții. O sare preferată în prezent este sarea de sodiu. O altă sare preferată în prezent este sarea de hemifumarat.

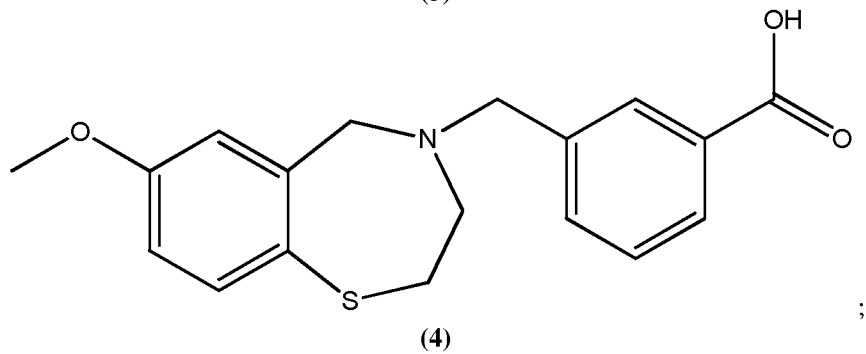
În unele variante de executare specifice, compusul este selectat din grupul ce constă din compusul 1, compusul 2, compusul 3, compusul 4, compusul 5, compusul 6, compusul 7, compusul 8, compusul 9, compusul 10, compusul 11, și compusul 12, precum și săruri acceptabile farmaceutic ale acestora. Acești compuși sunt reprezentați prin următoarele structuri:

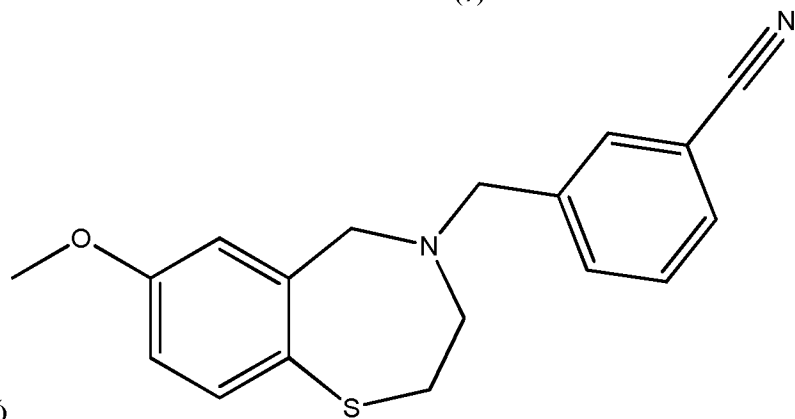
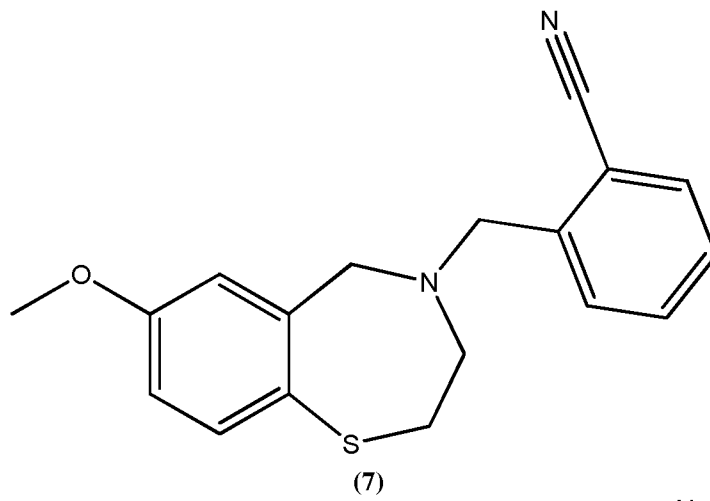
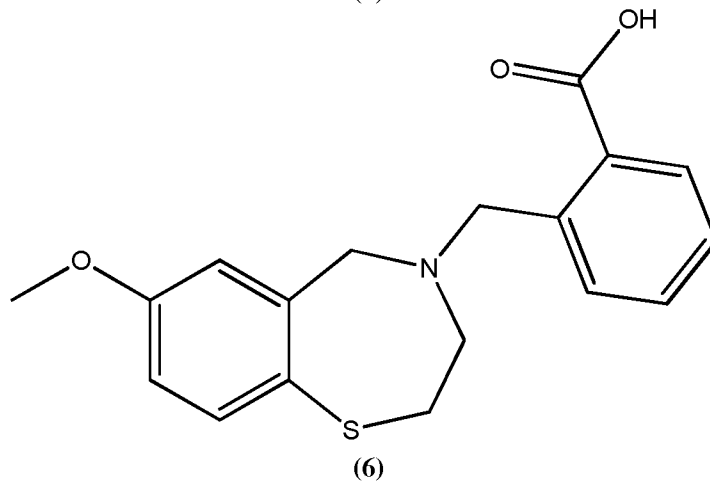
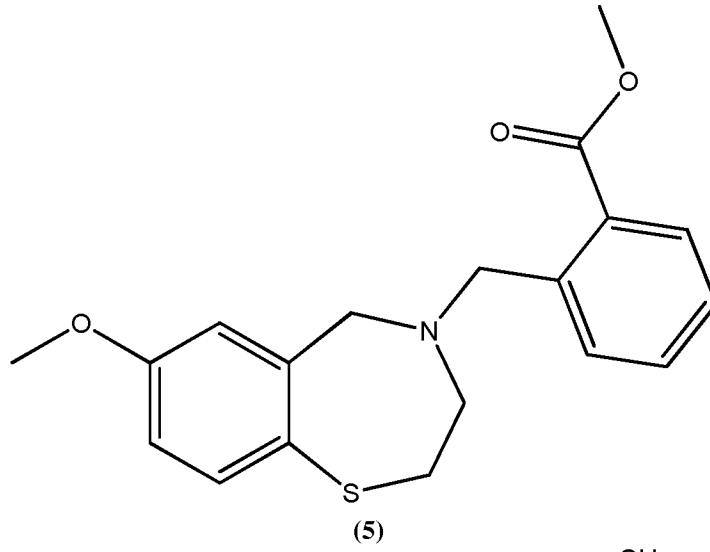


10



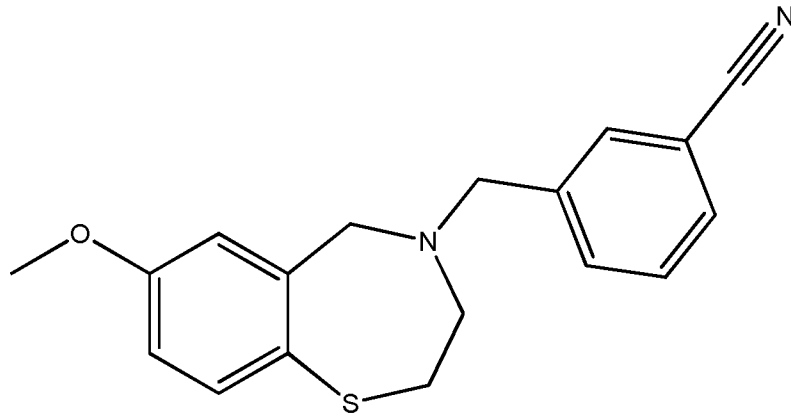
15





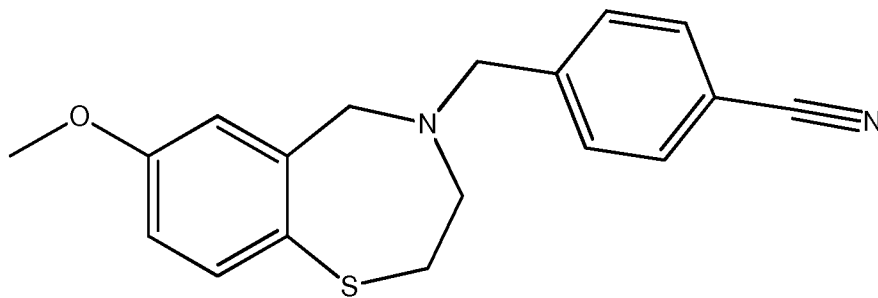
5

Ö



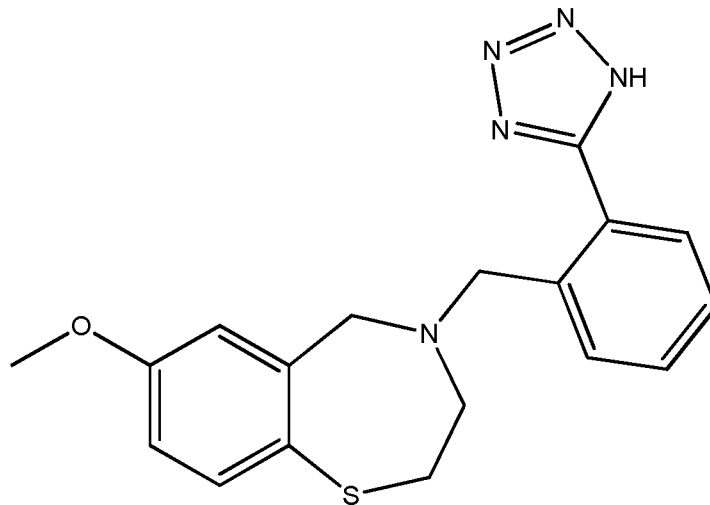
(8)

;



(9)

;

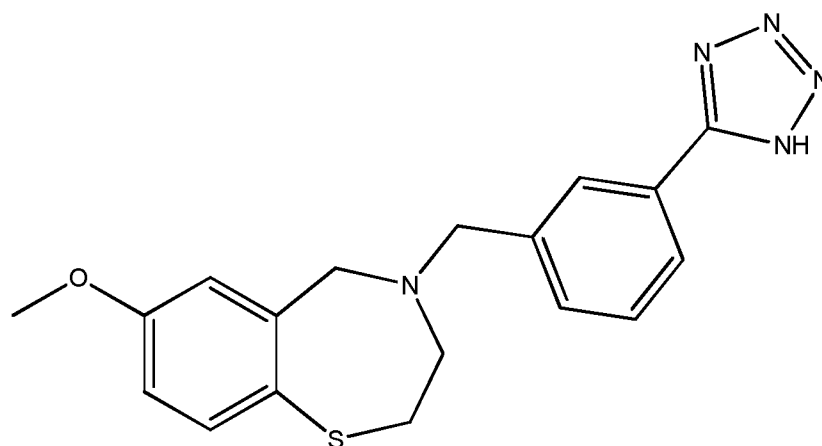


(10)

;

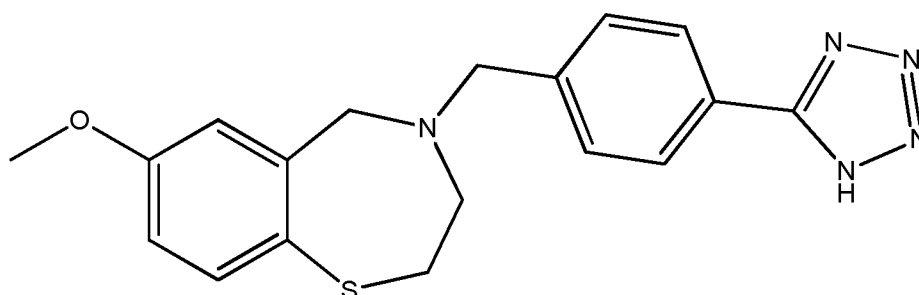
5

10



; și

(11)



(12)

5

Definiții chimice:

Termenul "alchil", în modul utilizat în prezenta, se referă la o hidrocarbură saturată, liniară sau ramificată având de la 1 până la 4 atomi de carbon ("alchil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>"). Grupări alchil reprezentative includ, dar nu se limitează la metil, etil, propil, izopropil, butil, sec-butil, și terț-butil. Gruparea alchil poate fi nesubstituită sau substituită cu una sau mai multe grupări selectate dintre halogen, haloalchil, hidroxi, alcoxi, haloalcoxi, cicloalchil, aril, heterociclic, heteroaril, amido, alchilamido, dialchilamido, nitro, amino, ciano, N<sub>3</sub>, oxo, alchilamino, dialchilamino, carboxil, tio, tioalchil și tioaril.

15

Compușii prezentei invenții pot exista sub forma lor tautomeră. Toate aceste forme tautomere sunt examinate aici ca parte a prezentei invenții.

Toți stereoizomerii compușilor prezentei invenții (de exemplu, cei care pot exista datorită atomilor de carbon asimetrici pe diverși substituenți), inclusiv formele enantiomerice și formele diastereomerice, sunt examinate în cadrul domeniului de aplicare al acestei invenții. Stereoizomerii individuali ai compușilor invenției pot fi, de exemplu, substanțial liberi de alți izomeri (de ex., ca un izomer optic pur sau substanțial pur având o activitate specificată), sau pot fi amestecați, de exemplu, ca racemați, sau ca amestecuri îmbogățite cu un stereoizomer. Centrele chirale din prezenta invenție pot avea configurația S sau R așa cum este definit de Recomandările IUPAC 1974. Formele racemice pot fi descompuse prin metode fizice, cum ar fi, de exemplu, cristalizarea fracționată, separarea sau cristalizarea derivaților diastereomerici sau separarea prin cromatografia pe coloană chirală. Izomerii optici individuali pot fi obținuți din racemați prin orice metodă adecvată, inclusiv, fără limitare, metode convenționale, cum ar fi, de exemplu, formarea sării cu un acid sau bază optic activă, urmată de cristalizare.

30

Compușii prezentei invenții sunt, după prepararea lor, de preferință izolați și purificați pentru a obține o compoziție care conține o cantitate în greutate egală sau mai mare de circa 90% de compus, circa 95% de compus, și chiar mai preferabil mai mare de circa 99% de compus (compus "substanțial pur"), care apoi este utilizat sau preparat conform descrierii din prezenta. Astfel de compuși "substanțial puri" ai prezentei invenții sunt, de asemenea, examinați aici ca parte a prezentei invenții.

35

Utilizarea terapeutică

Prezenta invenție propune compuși care sunt capabili să trateze stări, tulburări și boli asociate cu RyRs. Mai concret, prezenta invenție propune compuși care sunt capabili să oprească o scurgere în canalele RyR, care pot fi canale RyR1, RyR2 și/sau canale RyR3. 5  
Intr-o variantă de executare, compușii invenției sporesc asocierea și/sau inhibă disocierea RyR și calstabin (de ex., RyR1 și calstabin1; RyR2 și calstabin2; și RyR3 și calstabin1). "Stări, tulburări și boli asociate cu RyRs" înseamnă tulburări și boli care pot fi tratate și/sau prevenite prin modularea RyRs și includ, fără limitare, tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, disfuncții cognitive, 10  
boli și tulburări neuromusculare, îmbunătățirea funcției cognitive, tulburări și boli osoase, cașexia legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită, și sindromul morții subite a sugarului.

Astfel, într-o variantă de executare, prezenta invenție se referă la un procedeu de tratare sau prevenire a unei stări selectate din grupul ce constă din tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, disfuncții cognitive, 15  
boli și tulburări neuromusculare, tulburări și boli osoase, cașexie legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită, și sindromul morții subite a sugarului, sau pentru îmbunătățirea funcției cognitive, procedeul respectiv cuprinzând etapa de administrare unui subiect care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic de un compus cu Formula (I) sau (IA) așa cum este descris aici, sau o sare a acestuia, pentru a efectua un astfel de tratament. Un compus preferat în prezent este un compus cu Formula (I). 20

În altă variantă de executare, prezenta invenție se referă la utilizarea unei cantități eficiente de compus cu Formula (I) sau (IA), așa cum este descris aici, sau o sare a acestuia, 25  
pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea sau prevenirea unei stări selectate din grupul ce constă din tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, boli și tulburări neuromusculare, disfuncții cognitive, tulburări și boli osoase, cașexie legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită, și sindromul morții subite a sugarului, sau pentru îmbunătățirea funcției cognitive. Un compus preferat în prezent este un compus cu Formula (I). 30

În altă variantă de executare, prezenta invenție se referă la un compus cu Formula (I) sau (IA), așa cum este descris aici, sau o sare a acestuia, pentru utilizarea în fabricarea unui medicament pentru tratarea sau prevenirea unei stări selectate din grupul ce constă din 35  
tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, disfuncții cognitive, boli și tulburări neuromusculare, tulburări și boli osoase, cașexie legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită, și sindromul morții subite a sugarului, sau pentru îmbunătățirea funcției cognitive. Un compus preferat în prezent este un compus cu Formula (I).

Intr-o variantă de executare, starea, tulburarea sau boala este asociată cu o funcție anormală a RyR1. În altă variantă de executare, starea, tulburarea sau boala este asociată cu o funcție anormală a RyR2. În altă variantă de executare, starea, tulburarea sau boala este asociată cu o funcție anormală a RyR3. Fiecare posibilitate reprezintă o variantă de executare separată a prezentei invenții. 40

Tulburări și boli cardiace includ, dar nu se limitează la, tulburări și boli ale bățăilor neregulate ale inimii, tulburări și boli ale bățăilor neregulate ale inimii induse prin efort fizic, insuficiență cardiacă, insuficiență cardiacă congestivă, insuficiență cardiacă cronică, insuficiență cardiacă acută, insuficiență cardiacă sistolică, insuficiență cardiacă diastolică, insuficiență cardiacă acută decompensată, leziune de ischemie/reperfuzie (I/R) cardiacă (inclusiv leziune I/R ca urmare a angioplastiei coronariene sau ca urmare a trombolizei în timpul infarctului miocardic (IM)), boala pulmonară obstructivă cronică, precum și hipertensiunea arterială. Tulburări și boli ale bățăilor neregulate ale inimii includ, dar nu se limitează la aritmia atrială și ventriculară, fibrilația atrială și ventriculară, tahiaritmia atrială și ventriculară, tahicardia atrială și ventriculară, tahicardia ventriculară polimorfă catecolaminergică (TVPC), și variantele acestora induse prin efort fizic. 45  
50

Compușii invenției sunt, de asemenea, utili în tratarea oboselii musculare, care se poate datora efortului fizic prelungit sau efortului fizic de mare intensitate, sau poate fi cauzat de boli musculoscheletice. Exemple de tulburări și boli musculare includ, dar nu se limitează la oboseala mușchilor scheletici, bolile miezului central, oboseala mușchilor scheletici indusă de efortul fizic, tulburările vezicii urinare, incontinență, oboseala musculară asociată cu 55

vârsta, sarcopenie, miopatii congenitale, miopatii și/sau atrofii ale mușchilor scheletici, cașexie legată de cancer, miopatie rod-core, miopatii mitocondriale [de ex., sindromul Kearns-Sayre, sindromul MELAS (miopatia mitocondrială, encefalopatia, acidoza lactică, și accidentul vascular cerebral), și sindromul MERRF (epilepsia mioclonică cu fibre roșii rugoase)], miopatii endocrine, boli cu stocare de glicogen muscular [de ex., boala Pompe, boala Andersen, și bolile Cori], mioglobinurii [de ex., boala McArdle, boala Tarui, și boala DiMauro], dermatomiozită, miozită osificantă, paralizie periodică familială, polimiozită, miozita cu corpi de incluziune, neuromiotonie, sindromul omului înțepenit, hipertermie malignă, crampe musculare comune, tetanie, myasthenia gravis, atrofia musculară spinală (AMS), atrofia musculară spinală și bulbară (AMSB, cunoscută, de asemenea, sub denumirea de atrofie musculară spinobulbară, atrofie bulbo-spinală, neuropatie bulbospinală X-linkată (NBSX), atrofie musculară spinală X-linkată tip 1 (AMSX), și boala Kennedy (KD)), și distrofia musculară. Tulburări preferate ale mușchilor scheletici includ, dar nu se limitează la oboseala mușchilor scheletici indusă de efort fizic, miopatia congenitală, distrofia musculară, oboseala musculară legată de vârstă, sarcopenie, boala miezului central, cașexia legată de cancer, tulburările vezicii urinare, și incontinența.

Exemple de distrofie musculară includ, dar nu se limitează la, distrofia musculară Duchenne (DMD), distrofia musculară Becker (DMB), distrofia musculară la nivelul membrelor-brâu (DMMB), distrofia musculară congenitală (DMC), distrofia musculară distală, distrofia facio-scapulo-humerală, distrofia musculară miotonică, distrofia musculară Emery-Dreifuss, și distrofia musculară oculo-faringiană, DMD fiind preferată în prezent.

Distrofia musculară congenitală, așa cum este utilizată în prezenta, se referă la distrofia musculară prezentă la naștere. DMC se clasifică conform mutațiilor genetice: 1) gene care codifică proteinele structurale ale membranei bazale saumatricei extracelulare afibrelor musculaturii scheletice; 2) gene care codifică glicoziltransferazele presupuse sau demonstrate, care la rândul lor afectează glicozilarea distroglicanului, o proteină a membranei externe a membranei bazale; și 3) altele. Exemple de DMC includ, dar nu se limitează la DMC cu deficit de laminina- $\alpha 2$  (MDC1A), Ullrich CMG (UCMDs 1, 2 și 3), sindromul Walker-Warburg (SWW), boala mușchi-ochi-creier (MOB), DMC Fukuyama (DMCF), DMC plus deficit al laminei secundare 1 (MDC1B), DMC plus deficit al laminei secundare 2 (MDC1C), DMC cu retardare mentală și pahigirie (MDC1D), și coloană vertebrală rigidă cu distrofie musculară tip1 (RSMD1).

Disfuncția cognitivă poate fi asociată cu sau include, dar nu se limitează la pierderea memoriei, pierderea memoriei dependente de vârstă, tulburarea de stres post-traumatic (TSPT), tulburarea de hiperactivitate și deficit de atenție (THDA), tulburarea din spectrul autismului (TSA), tulburarea de anxietate generalizată (TAG), tulburarea obsesiv-compulsivă (TOC), schizofrenia, tulburarea bipolară, sau depresia majoră.

Tulburările și bolile SNC includ, dar nu se limitează la boala Alzheimer (BA), neuropatie, convulsii, boala Parkinson (BP), și boala Huntington (BH).

Tulburările și bolile neuromusculare includ, dar nu se limitează la ataxie spinocerebelară (ASC), și scleroza laterală amiotrofică (SLA, boala Lou Gehrig).

În unele variante de executare, compușii prezentei invenții îmbunătățesc funcția cognitivă, care poate fi selectată din memoria de scurtă durată, memoria de lungă durată, atenție, învățare, precum și orice combinație a acestora.

În unele variante de executare, compușii prezentei invenții sunt utili în tratamentul cașexiei legate de cancer, și anume slăbiciunea musculară care este asociată cu cancerul în general, și, de preferință, slăbiciunea musculară în cancerul metastatic, cum ar fi metastazele osoase. Slăbiciunea musculară și atrofia musculară (cașexia) sunt simptome paraneoplastice obișnuite la bolnavii de cancer. Aceste stări cauzează oboseală semnificativă și reduce dramatic calitatea vieții pacienților. Prezenta invenție propune un procedeu pentru tratarea și prevenirea slăbiciunii musculare la un pacient ce suferă de cancer, bazat, în parte, pe descoperirea că, în anumite tipuri de cancer, de ex., cancer de prostată și de sân cu metastaze osoase, RyR1 este oxidat, ceea ce îl determină să devină "neetanș". S-a constatat, de asemenea, că prevenirea scurgerii prin administrarea compușilor Rycal îmbunătățește funcția musculară. Exemple de tipuri de cancer includ, dar nu se limitează la, cancerul de sân, cancerul de prostată, cancerul osos, cancerul pancreatic, cancerul pulmonar, cancerul de colon, și cancerul gastrointestinal.

Terapia cu ignorarea exonului:

În unele variante de executare, compușii prezentei invenții modulează (de ex. sporesc) matisarea (splicing-ul) mARN-ului prin consolidarea ignorării exonului antisens mediat. Această modulare a matisării se realizează în prezența oligonucleotidelor antisens (OA) care sunt specifice pentru secvențele de matisare ce prezintă interes. În unele variante de executare a invenției, compusul cu formula (I) sau (IA) și OA pot acționa sinergic, unde compusul cu formula (I) sau (IA) sporește ignorarea exonului mediat de OA. Astfel, în unele variante de executare, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea oricăroră dintre stările descrise în prezenta care sunt asociate cu RyR neetanș, care cuprinde în plus utilizarea unei OA antisens, care este specifică pentru o secvență de matisare într-o secvență mARN, pentru sporirea ignorării exonului în ARNm de interes.

O variantă de executare deosebită pentru sporirea ignorării exonului de compușii prezentei invenții se referă la distrofia musculară Duchenne (DMD). DMD este o boală recesivă letală X-linkată caracterizată prin slăbiciune musculară progresivă de-a lungul vieții unui pacient. DMD este cauzată în primul rând de eliminările multi-exon în afara cadrului în gena DMD care îndepărtează producerea de proteine distrofin. Pierderea expresiei distrofinei de sine stătător nu explică fiziopatologia DMD. Perturbarea complexului distrofină-glicoproteină (CDG), de asemenea, duce la stresul oxidativ, supraîncărcarea cu  $Ca^{2+}$  mitocondrial și apoptoză, influx crescut de  $Ca^{2+}$  în mușchi, și semnalizarea  $Ca^{2+}$  patologic. Nu există terapii curative pentru DMD, și unicul tratament farmacologic demonstrat este corticosteroizii, care pot prelungi capacitatea de deplasare, însă au efecte secundare semnificative. Ignorarea exonului mediat de oligonucleotide antisens reprezintă o abordare terapeutică promițătoare care vizează restabilirea cadrului de citire DMD și care permite expresia unui complex distrofină-glicoproteină intact. Până în prezent, concentrații reduse de proteină distrofină au fost produse în oameni prin metoda dată. Kendall et al. (Sci Transl Med, 2012, 4(164), p. 164ra160) a relatat că anumite molecule mici, cum ar fi Dantrolen și alți modulatori RyR, potențază ignorarea exonului ghidată de oligomeri antisens pentru a spori ignorarea exonului pentru restabilirea cadrului de citire ARNm, proteinei distrofină a sarcolemei, și complexului distrofină-glicoproteină în mușchii scheletici ai șoarecilor *mdx*, un model de șoarece DMD.

Astfel, într-o variantă de executare, prezenta invenție se referă la un procedeu de tratare a DMD, prin administrarea unui subiect, care are nevoie de aceasta, a unui compus cu formula (I) sau (IA) conform prezentei invenții, în combinație cu o oligonucleotidă antisens (OA) care este specifică pentru o secvență de matisare a unuia sau mai mulți exoni ai genei DMD, de exemplu exonul 23, 45, 44, 50, 51, 52 și/sau 53 al genei DMD. OA preferate includ, dar nu se limitează la OA care au ca țintă exonul DMD 23, 50 și/sau 51 al genei DMD, cum ar fi OA 2'-O-metil (2' OMe) fosforotioat sau fosforodiamidat morfolino (PMO). Exemple de astfel de OA includ, dar nu se limitează la Pro051/GSK2402968, AVI4658/Eteplirsen, și PMO E23 morfolino (5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3').

Termenul "cantitate eficientă", "cantitate suficientă" sau "cantitate eficientă terapeutică" de un agent, așa cum este utilizat în prezenta în mod alternativ, este acea cantitate suficientă pentru efectuarea rezultatelor benefice sau dorite, inclusiv rezultatele clinice și, ca atare, o "cantitate eficientă" sau variantele ei depind de contextul în care aceasta se aplică. Reacția este profilactică în unele variante de executare, în altele terapeutică, iar în altele o combinație a acestora. Termenul "cantitate eficientă" include, de asemenea, cantitatea de un compus al invenției, care este "eficientă terapeutică" și care evită sau atenuează substanțial efectele secundare nedorite.

Așa cum se utilizează în prezenta și precum este bine înțeles în domeniu, "tratament" este o abordare pentru obținerea rezultatelor benefice sau dorite, inclusiv a rezultatelor clinice. Rezultatele clinice benefice sau dorite pot include, dar nu se limitează la atenuarea sau ameliorarea unuia sau mai multor simptome sau stări, diminuarea extinderii bolii, starea stabilizată (adică, nămăruțirea) a bolii, prevenirea răspândirii bolii, întârzierea sau încetinirea progresiei bolii, ameliorarea sau alinarea stării bolii și remisiunea (fie parțială sau totală), detectabilă sau nedetectabilă. "Tratament" poate însemna, de asemenea, prelungirea supraviețuirii comparativ cu supraviețuirea așteptată, dacă nu se primește tratament.

Compoziții farmaceutice

Compușii invenției sunt preparați sub formă de compoziții farmaceutice pentru administrarea subiecților umani într-o formă compatibilă biologic adecvată pentru administrarea *in vivo*. Conform unui alt aspect, prezenta invenție propune o compoziție farmaceutică care cuprinde compuși ai invenției în amestec cu un diluant și/sau vehicul acceptabil farmaceutic. Vehiculul acceptabil farmaceutic este, de preferință, "acceptabil" în sensul că este compatibil cu celelalte ingrediente ale compoziției și nu este dăunător pentru cel care îl primește.

Compusul poate fi administrat de unul singur, dar, de preferință, este administrat cu unul sau mai multe vehicule acceptabile farmaceutic. Vehiculul acceptabil farmaceutic utilizat în prezenta poate fi selectat din diverse materiale organice sau anorganice care sunt utilizate ca materiale pentru preparate farmaceutice și care sunt introduse ca oricare sau mai multe dintre substanțele de umplere, diluanți, lianți, agenți de dezintegrare, soluții tampon, coloranți, emulgatori, agenți de îmbunătățire a aromei, gelifianți, agenți de alunecare, conservanți, agenți de solubilizare, stabilizatori, agenți de suspendare, îndulcitori, agenți de tonicitate, agenți de umectare, emulgatori, agenți de dispersare, agenți de umflare, agenți de întârziere, lubrifianți, absorbantți, și agenți de creștere a vâscozității.

Compușii prezentei invenții sunt administrați unui subiect uman sau animal prin proceduri cunoscute, inclusiv, fără limitare, prin administrare orală, sublinguală, bucală, parenterală (intravenoasă, intramusculară sau subcutanată), transdermică, per- sau transcutanată, intranasală, intravaginală, rectală, oculară, și respiratorie (prin inhalare). Compușii invenției pot fi administrați, de asemenea, unui subiect prin livrarea către mușchii subiectului, inclusiv, dar nu limitat la, mușchii cardiaci sau scheletici ai subiectului. Într-o variantă de executare, compusul se administrează subiectului prin livrarea orientată către celulele musculare cardiace printr-un cateter introdus în inima subiectului. În alte variante de executare, compușii pot fi administrați direct în SNC, de exemplu prin injectarea intralombară sau infuzia intrevenriculară a compușilor direct în lichidul cerebrospinal (LCS), sau prin administrare intraveniculară, intratecală sau interstițială. Administrarea orală este preferată în prezent.

Compozițiile farmaceutice conform invenției pentru administrare orală solidă includ în special comprimate sau drajeuri, comprimate sublinguale, pliculețe, capsule inclusiv capsule gelatinoase, pulberi, și granule, și cele pentru administrarea orală lichidă, nazală, bucală sau oculară includ în special emulsii, soluții, suspensii, picături, siropuri și aerosoli. Compușii pot fi administrați, de asemenea, sub formă de suspensie sau soluție prin apa de băut sau cu hrană. Exemple de purtători farmaceutici acceptabili includ, dar nu se limitează la, derivați ai celulozei inclusiv carboximetilceluloză, metilceluloză, hidroxipropilceluloză, hidroxipropilmetilceluloză, etilceluloză și celuloză microcristalină; zaharuri cum ar fi manitol, zaharoză, sau lactoză; glicerină, gumă arabică, stearat de magneziu, stearil fumarat de sodiu, soluție salină, alginat de sodiu, amidon, talc și apă, printre altele.

Compozițiile farmaceutice conform invenției pentru injecții parenterale includ în special soluții sterile, care pot fi apoase sau neapoase, dispersii, suspensii sau emulsii și, de asemenea, pulberi sterili pentru reconstituirea soluțiilor sau dispersiilor injectabile. Compușii invenției pot fi combinați cu o soluție apoasă sterilă, care este izotonică cu sângele subiectului. Un astfel de preparat se prepară prin dizolvarea unui ingredient activ solid în apă care conține substanțe fiziologic compatibile, cum ar fi clorura de sodiu, glicina și altele, și având un pH tamponat compatibil cu condițiile fiziologice, astfel încât să producă o soluție apoasă, apoi să facă sterilă soluția respectivă. Preparatul este prezentat în recipiente unitare sau cu doze multiple, cum ar fi fiole sau flacoane sigilate. Preparatul este livrat prin orice mod de injectare, inclusiv, fără limitare, epifascial, intracapsular, intracranian, intracutanat, intratecal, intramuscular, intraorbital, intraperitoneal, intraspinal, intrasternal, intravascular, intravenos, parenchimos, subcutanat, sau sublingual sau prin intermediul cateterului în inima subiectului.

Compozițiile farmaceutice pentru administrare rectală sau vaginală sunt, de preferință, supozitoare, și cele pentru administrarea per- sau transcutanată includ, în special, pulberi, aerosoli, creme, unguente, geluri și plasturi.

Pentru administrarea transdermică, compușii invenției sunt combinați cu potențiatori de penetrare a pielii, cum ar fi propilenglicol, polietilenglicol, izopropanol, etanol, acid oleic, N-metilpirolidonă și altele, care sporesc permeabilitatea pielii pentru compușii invenției și permit compușilor să penetreze prin piele și în fluxul sanguin. Compozițiile din

compus/potențiator pot fi, de asemenea, combinate cu o substanță polimerică, cum ar fi etilceluloza, hidroxipropilceluloza, etilenă/vinilacetat, polivinilpirolidonă, și alte substanțe similare, pentru a furniza compoziția sub formă de gel, care este dizolvat într-un solvent, evaporat până la vâscozitatea dorită și apoi aplicat pe un material suport pentru a furniza un

5

plasture.  
Preparatele farmaceutice ale prezentei invenții sunt preparate prin metode bine cunoscute în domeniul farmaceutic, inclusiv, dar fără a se limita la metode de granulare umedă și uscată, sau prin comprimare directă. Selectarea vehiculului se determină prin solubilitatea și natura chimică a compușilor, calea de administrare selectată și practica farmaceutică

10

standard.  
Compozițiile farmaceutice sus-menționate ilustrează invenția, dar nu o limitează în nici un fel.

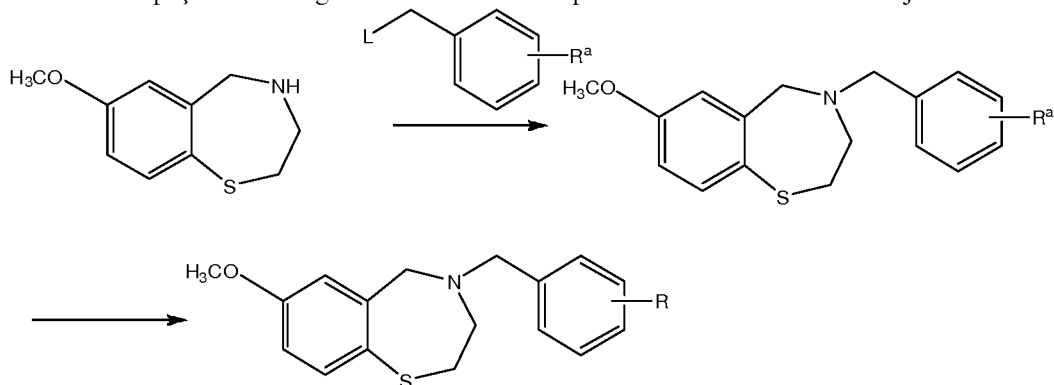
În conformitate cu procedeele prezentei invenții, oricare dintre acești compuși pot fi administrați subiectului (sau sunt puși în contact cu celulele subiectului) într-o cantitate eficientă pentru a limita sau preveni o scădere a nivelului de calstabin RyR-legat în subiect, în special în celulele subiectului. Această cantitate este determinată cu ușurință de un specialist în domeniu, pe baza procedurilor cunoscute, inclusiv analiza curbelor de titrare stabilite *in vivo* și procedeele și testele descrise în prezenta. O cantitate adecvată de compuși ai invenției eficientă pentru a limita sau preveni o scădere a nivelului de calstabin RyR-legată în subiect variază de la circa 0,01 mg/kg/zi până la circa 100 mg/kg/zi (de ex., 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 sau 100 mg/kg/zi), și/sau este o cantitate suficientă pentru a atinge concentrațiile plasmatiche variind de la circa 300 ng/ml până la circa 5000 ng/ml. Alternativ, cantitatea de compuși din invenție variază de la circa 1 mg/kg/zi până la circa 50 mg/kg/zi. Alternativ, cantitatea de compuși din invenție variază de la circa 10 mg/kg/zi până la circa 20 mg/kg/zi. De asemenea, sunt incluse cantități de la circa 0,01 mg/kg/zi sau 0,05 mg/kg/zi până la circa 5 mg/kg/zi sau circa 10 mg/kg/zi care pot fi administrate.

25

#### Procedee de sinteză

Prezenta invenție propune, într-un alt aspect, procedee pentru prepararea unui compus al invenției, și a sărurilor acestuia. Mai concret, prezenta invenție propune procedee de preparare a compușilor cu Formula (I) sau (IA), de ex. compusul 1, compusul 2, compusul 3, compusul 4, compusul 5, compusul 6, compusul 7, compusul 8, compusul 9, compusul 10, compusul 11, și compusul 12, sau sărurilor acestora. În exemple se descriu diverse căi de sinteză a compușilor. Calea generală de sinteză este prezentată în Schema 1 de mai jos:

30



35

#### Schema 1

În Schema 1,  $R^a$  este  $COOR^1$  sau  $CN$ ;  $R^1$  este un alchil  $C_1-C_4$ , și  $L$  este o grupare înlocuibilă, care este, cu titlu de exemplificare, un halogen, un sulfonat ( $OSO_2R'$  unde  $R'$  este alchil sau aril, de ex.,  $OMs$  (mesilat),  $OTs$  (tosilat)), și altele. Materialul inițial de amină se supune reacției cu agentul de alchilare (derivatul de benzil prezentat anterior), de preferință, în prezența unei baze, pentru a se obține produsul dorit sau un precursor al acestuia ( $R=R^a$ ). Dacă se dorește, un astfel de precursor poate fi supus ulterior reacției pentru a transforma gruparea  $R^a$  în gruparea  $R$  așa cum este exemplificat în secțiunea experimentală de mai jos, sau prin orice altă metodă cunoscută de către un specialist în domeniu. De exemplu, un precursor al esterului ( $R^a = COOR^1$  unde  $R^1$  este un alchil  $C_1-C_4$ ), poate fi transformat în acidul carboxilic corespunzător ( $R = COOH$ ) prin hidroliză în condiții acide sau bazice, în conformitate cu metodele cunoscute. Alternativ, un precursor al nitrilului ( $R^a = CN$ ) poate fi

40

45

transformat într-un tetrazol (un izoster al acidului carboxilic) prin reacția cu azidă de sodiu în condiții adecvate, sau într-un acid carboxilic ( $R = \text{COOH}$ ) prin hidroliză.

Materialul inițial de amină poate fi preparat în conformitate cu metodele descrise în WO 2009/111463 [10] sau WO 2007/024717, sau prin orice altă metodă cunoscută unui specialist în domeniu. Conținutul tuturor referințelor sus-menționate sunt incluse prin referință în prezenta. Natura bazei nu este extrem de limitativă. Baze preferate includ, dar nu se limitează la hidruri (de ex., hidrură de sodiu sau de potasiu) și N,N-diizopropiletilamină. Alte baze adecvate includ, dar nu se limitează la o bază organică cum ar fi o amină terțiară, selectată din grupul ce constă din amine aciclice (de ex., trimetilamină, trietilamină, dimetilfenilamină diizopropiletilamină și tributilamină), amine ciclice (de ex., N-metilmorfolină) și amine aromatice (dimetilanilină, dimetilaminopiridină și piridină).

Reacția poate fi condusă în prezența sau absența unui solvent. Natura solventului, atunci când este folosit, nu este extrem de limitativă, cu exemple ce includ solvenți cum ar fi un ester (de ex., acetat de etil), un eter (de ex., THF), un solvent clorurat (de ex., diclorometan sau cloroform), dimetilformamidă (DMF), și alți solvenți, cum ar fi acetonitril sau toluen sau amestecuri ale acestor solvenți unul cu altul sau cu apă.

Sărurile compușilor cu formula (I) în care  $R = \text{COOH}$  pot fi preparate prin reacția moleculei inițiale cu o bază adecvată, de ex., NaOH sau KOH pentru a se obține sărurile de metale alcaline corespunzătoare, de ex., sărurile de sodiu sau de potasiu. Alternativ, esterii ( $R = \text{COOR}^1$ ) pot fi transformați direct în săruri prin reacții cu baze adecvate.

Sărurile compușilor cu formula (I) pot fi, de asemenea, preparate prin punerea în reacție a moleculei inițiale cu un acid adecvat, de ex., HCl, acid fumaric, sau acid para-toluensulfonic pentru a se obține sărurile corespunzătoare, de ex., hidroclorură, tosilat sau semi-fumarat.

#### 25 EXEMPLE

Următoarele exemple sunt prezentate în calitate de ilustrare a unor variante de executare preferențiale conform invenției.

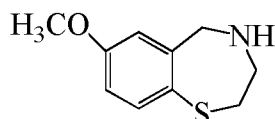
#### 30 **EXEMPLUL 1: Sinteză**

##### **Instrumente:**

RMN: Bruker AVANCE III 400 sau Varian Mercury 300

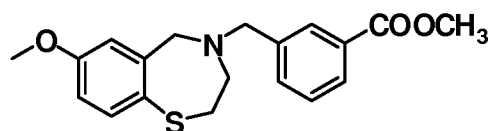
LC/MS: Waters Delta 600 dotat cu Dispozitiv de prelevare automată a probelor 717Plus, Detector cu sistem de fotodiode 2996, și Detector de masă 3100, sau Shimadzu 210

#### 35 **Procedura generală pentru alchilarea 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]tiazepină ("Amină").**



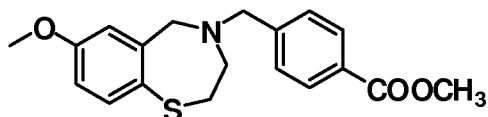
##### **Amină**

40 Amina (structura prezentată mai sus) (1 mmol) a fost dizolvată în 3 ml de diclorometan. La soluție s-a adăugat reactivul de alchilare (1 mmol), urmat de N,N-diizopropiletilamină (0,34 ml, 2 mmol). Amestecul a fost agitat la temperatura camerei timp de o noapte. Soluția a fost încărcată pe coloană direct și eluată cu hexan/EtOAc (2:1, v/v).

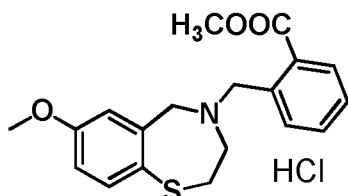


#### 45 **Compusul 2**

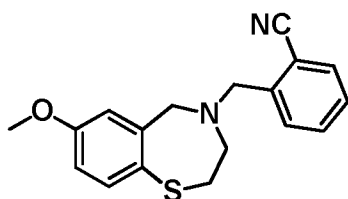
Metil 3-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoat: RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,96 (m, 2H), 7,46 (m, 3H), 6,70 (dd,  $J = 8,4$  Hz, 3,0 Hz, 1H), 6,50 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H), 4,09 (s, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,57 (s, 2H), 3,35 (m, 2H), 2,72 (m, 2H). MS: 344(M+1)

**Compusul 3**

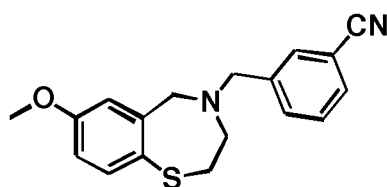
Metil 4-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoat: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,99 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 7,46 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,37 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 6,70 (dd, J=8,4 Hz, 3,0 Hz, 1H), 6,50 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 4,09 (s, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,57 (s, 2H), 3,35 (m, 2H), 2,72 (m, 2H). MS: 344(M+1)

**Compusul 5**

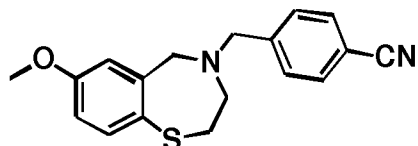
Metil 2-((7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzoat: Compusul a fost transformat în sare de hidrociorură cu HCl 2M în eter. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10,33(br, 1H), 8,08 (d, J= 7,5Hz, 1H), 7,80-7,65 (m, 3H), 7,51 (d, J=8,1Hz, 1H), 7,14 (s, 1H), 6,99 (dd, J= 8,4, 2,1Hz, 1H), 4,90-4,40 (m, br, 4H), 3,88 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,40 (m, 2H), 3,26 (m, 1H), 3,11 (m, 1H). MS: 344 (M+1)

**Compusul 7**

2-((7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzonitril: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,67-7,26 (m, 5H), 6,73 (d, J= 2,7 Hz, 1H), 6,74 (dd, J= 2,7,8,4 Hz, 1H), 4,14 (s, 2H), 3,78(s, 3H), 3,70 (s, 2H), 3,36 (m, 2H), 2,76 (m, 2H). MS : 311 (M+1)

**Compusul 8**

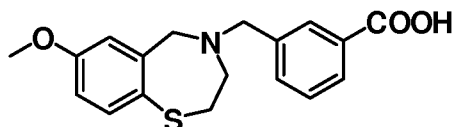
3-((7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzonitril: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,64-7,42 (m, 5H), 6,74 (dd, J= 2,7,8,4 Hz, 1H), 6,48 (d, J= 2,7 Hz, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,75(s, 3H), 3,57 (s, 2H), 3,36 (m, 2H), 2,76 (m, 2H). MS : 311 (M+1)

**Compusul 9**

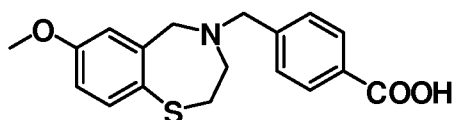
4-((7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)benzonitril: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,64 (d, J= 7,2Hz, 2H), 7,42 (m, 3H), 6,74 (dd, J= 2,7,8,4 Hz, 1H), 6,48 (d, J= 2,7 Hz, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,75(s, 3H), 3,58 (s, 2H), 3,36 (m, 2H), 2,76 (m, 2H). MS: 311 (M+1)

**Hidroliza esterului (procedură generală)**

S-a dizolvat ester metilic (3 mmol) în 30 ml de THF/metanol/NaOH 1 M (1:1:1, v/v). Amestecul a fost agitat timp de 8 ore și TLC (cromatografia în strat subțire) a arătat dispariția completă a esterului. S-a adăugat 1 ml HCl conc. pentru a ajusta până la pH acid. Solventul organic a fost înlăturat și solidul format a fost colectat prin filtrare. Solidul a fost uscat cu aer.

**Compusul 4**

3-((7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)acid benzoic: Acesta s-a obținut prin extragerea cu EtOAc în calitate de solvent. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,10 (s, 1H), 8,04 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,80 (br, 1H), 7,46 (m, 2H), 6,80 (m, 2H), 4,40 (s, 2H), 3,90 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,42 (s, 2H), 2,86 (s, 2H). MS: 330 (M+1), 328 (M-1).

**Compusul 1**

4-((7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)acid benzoic: Acesta s-a obținut prin extragerea cu EtOAc în calitate de solvent. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,02 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 7,46 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,42 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 6,70 (dd, J=8,4 Hz, 3,0 Hz, 1H), 6,50 (d, J= 3,0 Hz, 1H), 4,11 (s, 2H), 3,72 (s, 3H), 3,62 (s, 2H), 3,35 (m, 2H), 2,76 (m, 2H). MS: 330 (M+1), 328 (M-1).

**Compusul 1, sare de sodiu:**

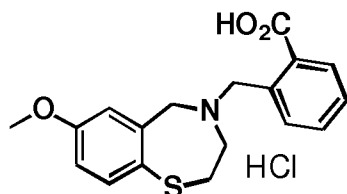
Sarea de sodiu a compusului 1 a fost preparată din molecula inițială utilizând 1 echivalent de NaOH în EtOH (p.t. a sării: > 290°C).

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>, 600MHz), δ (ppm): 7,77 (2H, m), 7,41 (1H, d), 7,13 (2H, m), 6,75 (1H, dd), 6,63 (1H, d), 4,00 (2H, s), 3,70 (3H, s), 3,49 (2H, s), 3,18 (2H, m), 2,70 (2H, m).

**Compusul 1, sarea de hemifumarat:**

S-au introdus 1,6 g de compus 1 (formă neutră) și 265 mg de acid fumaric într-un balon cu fund rotund. După adăugarea a 18 ml de acetonă și 2 ml de apă, amestecul de reacție a fost încălzit la reflux. S-a observat o solubilizare parțială (dar nu o limpezire completă) urmată de precipitare. Amestecul de reacție a fost apoi încălzit la reflux timp de noapte. După răcire, solidul rezidual a fost izolat prin filtrare, spălat cu 3 ml de acetonă și uscat sub vid (40°C / 10 mbari) timp de 4 ore.

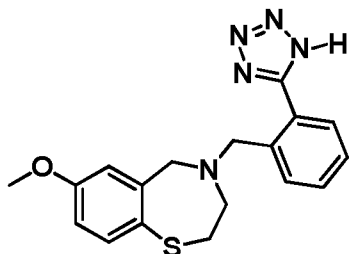
RMN<sup>1</sup>H (DMSO-D<sub>6</sub>, 600MHz), δ (ppm): 12,97 (2H, bs), 7,90 (2H, m), 7,43 (1H, d), 7,40 (2H, m), 6,77 (1H, dd), 6,64 (1H, d), 6,62 (1H, s), 4,03 (2H, s), 3,70(3H, s), 3,58 (2H, s), 3,20 (2H, m), 2,72 (2H, m).

**Compusul 6**

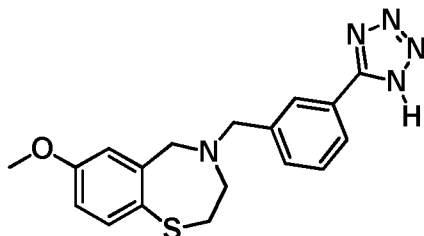
2-((7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[f][1,4]tiazepin-4(5H)-il)metil)acid benzoic: Compusul a fost transformat în sare de hidrociorură cu HCl 2M în eter. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10,10(br, 1H), 8,08 (d, J= 7,5Hz, 1H), 7,66-7,51 (m, 4H), 7,17 (d, J= 2,1Hz, 1H), 6,99 (dd, J= 8,4, 2,1Hz, 1H), 4,80-4,40 (m, br, 4H), 3,78 (s, 3H), 3,46 (m, 2H), 3,13 (m, 2H). MS: 330(M+1), 328 (M-1).

**Sinteza tetrazolului (procedură generală)**

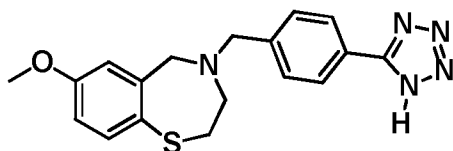
S-a agitat precursorul nitrilului (3,22 mmol), azida de sodiu (830 mg, 12,9 mmol) și hidroclorura de trietilamină (1,72 g, 12,9 mmol) în 40 ml DMF anhidru la 100°C timp de 5 zile. DMF a fost înlăturat sub vid înalt și reziduul a fost amestecat cu apă. Soluția apoasă a fost extrasă cu diclormetan (3 x 100 ml). Compusul pur a fost purificat prin cromatografie pe coloană (EtOAc/metanol).

**Compusul 10**

4-(2-(1H-Tetrazol-5-yl)benzil)-7-metoksi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]tiazepină: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> și o picătură de CD<sub>3</sub>OD): 8,30 (d, J= 8,7Hz, 1H), 7,53 (m, 2H), 7,14 (t, J= 7,8Hz, 1H), 7,20 (d, J= 7,5Hz, 1H), 6,84 (dd, J= 2,7,8,4 Hz, 1H), 6,69 (d, J= 2,7 Hz, 1H), 4,46 (s, 2H), 3,80(s, 2H), 3,75 (s, 2H), 3,43 (m, 2H), 2,96 (m, 2H). MS: 354(M+1), 352(M-1)

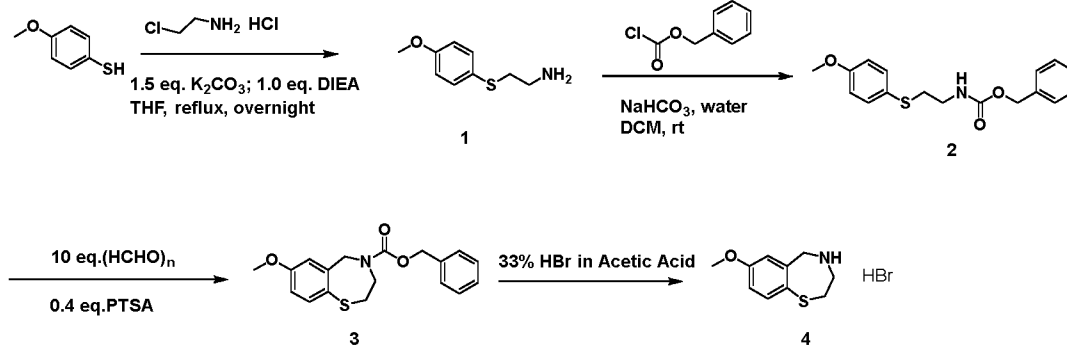
**Compusul 11**

4-(3-(1H-Tetrazol-5-yl)benzil)-7-metoksi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]tiazepină: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,16 (s, 1H), 7,90 (d, J=7,5Hz, 1H), 7,40 (d, J= 8,4Hz, 1H), 7,20 (m, 2H), 6,74 (dd, J= 2,7,8,4 Hz, 1H), 6,58 (d, J= 2,7 Hz, 1H), 4,18 (s, 2H), 3,75(s, 5H), 3,36 (m, 2H), 2,76 (m, 2H). ). MS: 354(M+1), 352(M-1)

**Compusul 12**

4-(4-(1H-Tetrazol-5-yl)benzil)-7-metoksi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]tiazepină: RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> și o picătură de CD<sub>3</sub>OD): 7,99 (d, J= 7,2Hz, 2H), 7,42 (m, 3H), 6,74 (dd, J= 2,7,8,4 Hz, 1H), 6,53 (d, J= 2,7 Hz, 1H), 4,10 (s, 2H), 3,71(s, 3H), 3,58 (s, 2H), 3,36 (m, 2H), 2,76 (m, 2H). ). MS: 354(M+1), 352(M-1)

## Sinteza 7-metoksi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]tiazepină ("Amină").

5 **2-(4-Metoxifeniltio)etanamină (1)**

S-au amestecat 4-metoxitiofenol (50 g, 0,357 mol), monoclorhidrat de 2-cloroetilamină (39,8 g, 0,343 mol.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (78,8 g, 0,57 mol) și diizopropiletilamină (32 ml, 0,178 mol) în 200 ml de THF. Amestecul a fost degazat timp de 5 min. sub presiune redusă și încălzit la reflux sub argon timp de o noapte. Solventul a fost înlăturat și s-a adăugat apă (300 ml) în balon. Amestecul a fost extras cu diclormetan (3 x 200 ml). Substanțele organice au fost colectate, diclormetanul a fost înlăturat și s-a adăugat 50 ml de HCl conc., urmat de 200 ml de apă. Soluția a fost extrasă cu 1: 1 EtOAc/hexan (3 x 200 ml). Stratul apos a fost ajustat până la pH 10 cu NaOH 2 M și a fost extras cu diclormetan (3 x 200 ml). Soluția organică combinată a fost uscată pe sulfat de sodiu anhidru. În urma înlăturării solventului s-au obținut 61 g de compus țintă sub formă de lichid incolor, cu un randament de 97%.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,35(d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,81 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,88-2,80 (m, 4H), 1,44 (s, 2H).

20 **2-(4-metoxifeniltio)etilcarbamate de benzil (2)****Procedeu intai**

Intr-un balon care conține compusul **1** (8,0 g, 43,7 mmol), bicarbonat de sodiu (12,1 g, 144 mmol), apă (100 ml) și diclormetan (200 ml) s-a adăugat cloroformiat de benzil (8,2 g, 48,1 mmol, diluat în 100 ml de diclormetan) prin picurare la 0°C. După adăugare, amestecul a fost agitat la t.c. timp de 5 ore. Stratul organic a fost colectat și soluția apoasă a fost extrasă cu 100 ml de diclormetan. Soluția organică combinată a fost uscată pe sulfat de sodiu. Solventul a fost înlăturat și solidul rezultat a fost triturat cu 200 ml de THF/hexan (1:10). Solidul a fost colectat și uscat lăsând produsul țintă (12,9 g) cu un randament de 93%.

30 **Procedeu alternativ**

La soluția de compus **1** (10 g, 54,6 mmol) și trietilamină (15 ml, 106 mmol) în 200 ml de diclormetan s-a adăugat cloroformiat de benzil (7,24 mL, 51,5 mmol, diluat în 100 ml de diclormetan) prin picurare la 0°C. După adăugare, soluția a fost agitat la t.c. timp de o oră. Solidul a fost înlăturat prin filtrare. Soluția a fost extrasă cu 100 ml de HCl 0,1 M și 100 ml de carbonat de sodiu sat., și s-a uscat pe sulfat de sodiu anhidru. După înlăturarea solventului s-a obținut un solid de culoare albă, care a fost agitat în 200 ml de THF/hexan (1:20) timp de trei ore. Solidul a fost colectat prin filtrare pentru a oferi 14,2 g de compus-țintă cu un randament de 87%.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,35(m, 7H), 6,83 (d, J= 8,7 Hz, 2H), 5,07 (m, 3H), 3,77 (s, 3H), 3,10 (q, J = 6,3 Hz, 2H), 2,92 (t, J= 6.3 Hz, 2H).

40 **7-Metoksi-2,3-dihidrobazo[f][1,4]tiazepină-4(5H)-carboxilat de benzil (3)**

Un amestec de compus **2** (7,3 g, 23 mmol), paraformaldehidă (6,9 g 0,23 mol) și acid *p*-toluensulfonic (1,45 g, 7,6 mmol) în 250 ml de toluen a fost agitat la 70°C timp de o noapte. După răcire la t.c., solidul a fost filtrat. Soluția a fost extrasă cu carbonat de sodiu sat. (100 ml), iar stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu anhidru. Produsul țintă (7,4 g) a fost obținut sub formă de lichid după înlăturarea solventului cu un randament de 97%.

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

5 **7-Metoxi-2,3,4,5-tetrahidrobenzo[f][1,4]tiazepină hidrobromură (Amină) (4 sare de HBr)**

**Procedeeul intai**

10 S-a adăugat o soluție de HBr (33% în acid acetic, 10 ml) la compusul **3** (4,2 g, 12,8 mmol). După adăugare, dioxidul de carbon a început să se dezvolte și s-a format un solid de culoare albă. Amestecul s-a lăsat să stea la t.c. timp de încă 2 ore. S-a adăugat eter dietilic (150 ml) la amestec, și s-a agitat timp de 30 min. Solidul a fost colectat prin filtrare și spălat cu eter dietilic. Solidul a fost uscat sub vid pentru a oferi 3,40 g de compus țintă cu randament de 91,8%.

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

**Metoda alternativă (bază liberă 4a)**

20 Compusul **3** (10 g, 30 mmol) a fost amestecat cu 50 ml de HCl conc., 50 ml de apă și 30 ml de dioxan. Amestecul a fost agitat la 100°C timp de o noapte. După răcire până la temperatura camerei, majoritatea solventului și HCl a fost eliminat sub presiune redusă. S-a adăugat apă (100 ml) la soluție și solidul a fost filtrat. Soluția apoasă a fost extrasă cu EtOAc/hexan (1:1, 3 x100 ml) și a fost bazificată prin adăugarea a 15 g de NaOH. Amestecul a fost extras cu diclormetan (3 x 150 ml). Soluția combinată a fost uscată pe sulfat de sodiu anhidru. În urma înlăturării solventului s-a obținut un lichid care s-a solidificat după ce s-a aflat la t.c. oferind 6,2 g de compus țintă.

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

**EXEMPLUL 2: Legarea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA**

30 Membranele RS cardiace au fost preparate așa cum s-a descris anterior (Marx et al., 2000; Kaftan et al., *Circ. Res.*, 1996, 78:990-97). Immunoblotting-ul microzomilor (50 μg) a fost realizat așa cum s-a descris, cu anticorp anti-calstabin (1:1000) (Jayaraman et al., *J. Biol. Chem.*, 1992, 267:9474-77) timp de o oră la temperatura camerei (Reiken et al., *Circulation*, 107:2459-66, 2003). După incubare cu IgG anti-iepure HRP-marcată (diluție 1:5000; 35 Transduction Laboratories, Lexington, KY.), analizele blot au fost elaborate cu ajutorul ECL (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ.) și detectate pe peliculă de raze X, sau expuse anticorpilor secundari marcați cu colorant infraroșu și vizualizate pe echipamente de la Li-Cor Biosciences (modelul Odyssey). Dacă nu se specifică altfel, compușii au fost testați la o concentrație de 100 nM. Mai jos este prezentat un test de legare a unei proteine calstabin2 40 reprezentative.

**A. Fosforilarea PKA a reticulului sarcoplasmic cardiac (RSC)**

45 Amestecul de reacție a fost creat într-un microtub de 1,5 ml. 200μg de RS cardiac au fost adăugate la un amestec de reacție de soluție tampon de kinază, PKA și ATP până la un volum final de 100 μl (Amestecul de reacție de mai jos). S-a adăugat ATP la sfârșit pentru a iniția reacția.

Amestecul de reacție:

20μl = Probă (RS cardiac, 2 sau 10 μg/μl)  
 10μl = 10x soluție tampon de kinază (80 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM EGTA, 500 mM  
 50 Tris/PIPES), pH=7,0  
 20μl = PKA (2unități/ul) (Sigma # P2645)  
 10μl = 10x ATP (1.0 mM) (Sigma A 9187)  
 40μl = H<sub>2</sub>O distilat

1. Tuburile au fost incubate la 30°C timp de 30 de minute.
- 55 2. Amestecul de reacție a fost apoi transferat în tuburi din sticlă cu pereții groși de 0,5 ml.
3. Tuburile din sticlă cu amestecul de reacție au fost centrifugate timp de 10 minute la 50,000xg în Centrifugă Sorvall RCM120EX utilizând rotor S120AT3. Centrifugarea la 50,000 x g timp de 10 min este suficientă pentru izolarea microzomilor.

4. Peletul rezultat a fost spălat de 4 ori cu soluție tampon de legare (10mM Imidazol 300mM zaharoză, pH =7.4). De fiecare dată s-a adăugat 100μl de 1x soluție tampon de legare în tub pentru a spăla peletul. Peletul a fost resuspendat prin spălare în sus și în jos utilizând vârful pipetei. După ultima rotire 50μl de soluție tampon de legare s-au adăugat și peleții din toate tuburile au fost uniți. Reacția a fost menținută la -20°C.

5. Fosforilarea a fost confirmată prin separarea a circa 10 μg de RSC prin electroforeză în gel de poliacrilamid (PAGE) de 6% și analiza imunoblotelor atât pentru RyR total (5029 Ab, diluție 1:3000 sau Monoclonal Ab de la Affinity Bioreagents, Cat # MA3-916, diluție 1:2000) și RyR2 fosforilat de PKA (P2809 Ab, diluție 1:10000).

6. Părțile alicote pot fi păstrate la -80°C.

#### B. Test de relegare a proteinei calstabin

1. RSC fosforilat de PKA (circa 20μg) a fost incubat cu 250nM Calstabin 2 in 100μl de soluție tampon de legare (așa cum s-a descris mai sus) cu sau fără compuși.

2. Reacția a fost inițiată într-un tub din sticlă cu pereții gros (Hitachi Centrifuge ware, Catalog # B4105).

3. S-a adăugat Calstabin2 ca ultim reactiv în amestecul de reacție. Reacția a fost realizată la temperatura camerei timp de 30 minute.

4. După reacție, tuburile au fost centrifugate timp de 10 min la 100.000 g. (Sorvall RCM120EX centrifuge with S120AT3 rotor).

5. Peletul rezultat a fost spălat de 4 ori în 1x soluție tampon de legare la 4 °C. După fiecare spălare tuburile au fost centrifugate la 50.000 g timp de 10 minute la 4 °C.

6. După spălarea finală, supernatantul a fost înlăturat.

7. S-a adăugat 20μl de soluție tampon de probă (2x) [6x soluție tampon de probă descrisă mai jos] și peletul a fost resuspendat cu vârful și/sau printr-o agitare scurtă. Suspensia a fost transferată într-o eprubetă de 1,5 ml pentru microcentrifugă.

8. Eprubetele au fost încălzite la 90°C timp de 4min.

9. Proteinele au fost separate cu ajutorul SDS/PAGE 15%.

10. Legarea calstabin2 a fost detectată cu anticorp primar și anticorp secundar corespunzător anti-FKBP (Jayaraman et al., J. Biol. Chem. 1992;267:9474-77, 1:2000).

#### 6x Soluție tampon de probă

7,0 ml 4x Tris-HCl/SDS, pH6.8

3,0 ml glicerol (concentrația finală 30%)

1,0 g SDS (concentrația finală 10%)

0,93 g DTT (0,6 M final)

1mg bromofenol albastru (concentrația finală 0,001%)

Apă distilată până la volum final de 10 ml.

Se păstrează în părți alicote de 1 ml la -70°C.

#### Rezultatele:

Figura 1A ilustrează un imunoblot cu anticorp calstabin2 ce arată legarea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA în absența (-) sau prezența a 100 nM de compus 1. (+): calstabin ce se leagă de RyR2 nefosforilat de PKA. S36, o benzotiazepină descrisă în US 7,544,678, este utilizată în calitate de martor. După cum s-a arătat, compusul 1, într-o concentrație de 100 nM, a împiedicat disocierea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA și/sau a îmbunătățit (re)legarea calstabin2 de RyR fosforilat de PKA.

Așa cum se arată în Figura 1B, s-a constatat că următorii compuși reprezentativi, de asemenea, împiedică disocierea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA, și/sau îmbunătățesc (re)legarea calstabin2 de RyR2 fosforilat de PKA cand au fost testați în testul sus-menționat de relegare a calstabin2 la 100 nM: compusul 2, compusul 3 și compusul 4.

#### **EXEMPLUL 3: Legarea calstabin1 de RyR1 fosforilat de PKA**

Membranele RS din mușchii scheletici au fost preparate într-un mod similar celui din Exemplul 2, și așa cum se descrie în continuare în publicarea cererii de brevet USA nr. 2004/0224368 [11], conținutul căreia este inclus prin referință aici. Immunoblotting-ul microzomilor (50 μg) a fost realizat așa cum s-a descris, cu anticorpul anti-calstabin1 (Zymed) (1: 1,000). Analizele blot au fost elaborate și cuantificate așa cum este descris în Exemplul 2.

Figura 1C ilustrează un imunoblot cu anticorp calstabin1 ce arată legarea calstabin1 de RyR1 fosforilat de PKA în absența (Neg) sau prezența concentrațiilor indicate de compus 1 sau compus 4. (Pos): legarea calstabin de RyR1 nefosforilat de PKA. S36 este utilizat în calitate de martor. Așa cum s-a demonstrat, compusul 1 și compusul 4 a împiedicat disocierea calstabin1 de RyR1 fosforilat de PKA și/sau a îmbunătățit (re)legarea calstabin1 de RyR1 fosforilat de PKA într-un mod dependent de doză, cu un CE50 estimat de circa 100nM și, respectiv, 150 nM.

#### EXEMPLUL 4: Relegarea calstabin1 de RyR1 în șoarecii tratați cu izoproterenol

Izoproterenolul, un agonist al receptorului beta-adrenergic, induce insuficiență cardiacă în șoareci prin hiperstimularea receptorului beta-adrenergic. Simultan cu aceasta este activarea PKA, fosforilarea RyR2 pe RS, și interacțiunea redusă a calstabin2 (FKBP12.6) cu RyR2. O cascadă similară de evenimente are loc în mușchii scheletici, unde RyR1 este fosforilat, ceea ce duce la scăderea legării calstabin1 (FKBP12) de RyR1.

Așa cum s-a descris în detaliu în publicația internațională nr. WO2008/064264, conținutul căreia este inclus aici prin referință, tratamentul cronic cu izoproterenol la un șoarece de tip sălbatic oferă o metodă rapidă și sigură pentru inducerea modificărilor în biochimia RyR, care ar putea fi ușor cuantificată. Aceste modificări includ creșterea fosforilării RyR și scăderea concomitentă a legării calstabin.

#### Animale și reactivi

Șoarecii C57B1/6 au fost menținuți și examinați conform protocoalelor aprobate. Agonistul sintetic beta-adrenergic, izoproterenolul (ISO) a fost obținut de la Sigma (I65627) și preparat sub formă de amestec de 100 mg/ml în apă. Soluția tampon Lysis a fost preparată prin adăugarea zaharozei (1 mM), ditiotreititolului (320 mM), și 1 tabletă inhibitoră de protează (10X) la o soluție inițială de 10 ml (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 20 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>).

#### Prepararea pompei osmotice și implantarea chirurgicală

Șoarecilor li s-a injectat continuu timp de cinci zile 10 mg/ml de izoproterenol (1 μl/oră) printr-o pompă osmotică de perfuzie implantată subcutanat (Alzet MiniOsmotic pump, Model 2001, Durect Corporation, Cupertino, CA).

Pentru încărcarea medicamentului, pompa osmotică a fost ținută vertical și în pompă s-au injectat 200 μl de soluție de medicament printr-o seringă de 1 ml (atașat la o canulă) care conținea un exces de soluție de medicament (~ 250-300 μl). Soluția de medicament a fost injectată lent în jos, în timp ce seringă a fost ridicată lent, până când pompa a fost supraîncărcată. Revărsarea lichidului substituit peste învelișul pompei a confirmat că pompa a fost umplută corect.

Pompele osmotice încărcate au fost implantate subcutanat prin următorii pași. Șoarecele a fost anesteziat cu 1,5-2% izofluran în O<sub>2</sub> administrat la 0,6 l/min, iar greutatea sa a fost apoi măsurată și înregistrată. Șoarecele a fost apoi plasat cu pieptul în jos pe polistiren, fața sa în conul frontal. Blana a fost prinsă la ceafă, fiind întinsă după urechi spre partea de sus a capului. Zona a fost ștearsă ușor cu alcool de 70% , și s-a făcut o mică incizie la linia mediană pe ceafa capului/gâtului. Un suport de sutură a fost impregnat cu alcool, introdus în tăietură, și deschis pentru a elibera pielea de țesutul de dedesubt. Pentru a aranja pompa, acest orificiu a fost extins spre picioarele din spate. Pompa încărcată a fost introdusă în orificiu, cu partea de evacuare poziționată departe de incizie, și a fost lăsată să intre sub piele cu tensiune minimă. Incizia a fost închisă cu sutură de nailon 5.0, fiind necesare aproximativ 5-6 suturi, iar zona a fost ștearsă ușor cu alcool de 70%. După operația chirurgicală, șoarecii au fost plasați în cuști individuale, pentru a minimiza leziunea și posibila activare a sistemului nervos simpatic.

#### Izolarea mușchilor scheletici

Țesutul muscular scheletic al șoarecelui a fost izolat după cum urmează. Mușchii picioarelor au fost expuși prin tăierea pielii la gleznă și tragerea în sus. Țesutul a fost menținut umed cu soluție tampon Tyrode (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 0,42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 11,9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM glucoză, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, preparată prin adăugarea a 20 mg de CaCl<sub>2</sub> până la 100 ml 1X soluție tampon preparată dintr-o soluție 10X fără CaCl<sub>2</sub>). Următorii mușchii au fost izolați și congelați în azot lichid.

Mușchiul extensor lung al degetelor (EDL) a fost izolat prin inserarea foarfecelor între tendonul lateral și X format de tendoanele EDL și Tibial, tăind în sus spre genunchi; prin tăierea mușchiului fibularis pentru a expune tendonul în formă de evantai al mușchiului gastrocnemian; prin introducerea pensetei sub X și sub mușchi pentru a slăbi tendonul EDL; prin tăierea tendonului EDL și tragerea în sus a mușchiului; și în cele din urmă prin eliberarea EDL. Mușchiul solear a fost izolat prin îndepărtarea mușchiului fibularis din partea superioară a mușchiului gastrocnemian; expunerea mușchiului solear pe partea inferioară a mușchiului gastrocnemian prin tăierea și ridicarea tendonului lui Achile; tăierea mușchiului solear în partea superioară a mușchiului după genunchi; și în cele din urmă tragerea mușchiului solear și tăierea lui din mușchiul gastrocnemian. Mușchiul tibial a fost izolat prin tăierea tendonului tibial de pe partea frontală a gleznei, trăgând tendonul în sus, și tăindu-l de pe tibie. Mușchiul vast (mușchiul coapsei) a fost izolat de pe ambele picioare, prin tăierea mușchiului chiar deasupra genunchiului și îndepărtarea fasciculului muscular. Probele au fost congelate în azot lichid.

#### **Imunoprecipitarea RyR1 din lizatele tisulare**

RyR1 fost imunoprecipitat din probe prin incubarea a 200-500 μg de omogenat cu 2 μl anticorp anti-RyR1 (Zymed) în 0,5 ml de soluție tampon RIPA modificată (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,9% NaCl, 5,0 mM NaF, 1,0 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Triton-X100 0,5%, și inhibitori de protează), la 4°C timp de 1,5 ore. Probele au fost apoi incubate cu mărgelile de sefaroză Proteina A (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) la 4°C timp de 1 oră, după care mărgelile au fost spălate de trei ori cu RIPA rece ca gheața. Probele au fost încălzite până la 95°C și fracționate după mărime prin SDS-PAGE (SDS-PAGE de 15% pentru calstabin). Imunoblotele au fost elaborate folosind un anticorp anti-FKBP (FKBP12/12.6, Jayaraman et al., J. Biol. Chem. 1992;267:9474-77) la o diluție de 1:2,000. Anticorpul a fost diluat în lapte de 5% sau TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, Tween® 20 0,05%, Triton X-100 0,5%).

#### **Rezultatele**

Pompele osmotice ce conțin izoproterenol cu sau fără compusul de testat au fost implantate în șoareci așa cum este descris mai sus. Șoarecii au fost perfuzați osmotice timp de cinci zile fie doar cu vehiculul (DMSO/PEG), doar izoproterenolul (ISO) (0,5 mg/kg/hr), sau o combinație de izoproterenol (0,5 mg/kg/oră) și compusul 1 în concentrațiile indicate. În ziua a 6-a, fiecare șoarece a fost sacrificat, și țesutul muscular scheletic a fost izolat și folosit pentru a analiza legarea calstabin1 în imunoprecipitatele RyR1.

Efectul compusului 1 asupra îmbunătățirii legării calstabin1 de RyR1 în mușchii scheletici izolați din șoarecii tratați cu izoproterenol este descris în Figurile 2A (imunoblot) și 2B (cuantificarea grafică). După cum s-a demonstrat, compusul 1 a sporit nivelurile de calstabin1 legat de RyR1 în membranele musculare scheletice până la un nivel similar celui observat prin administrarea a 3,6 mM S36, un alt derivat al benzotiazepinei utilizat ca martor pozitiv (WO2008/064264 [12]). Rezultate similare au fost obținute pentru compusul 4 (datele nu sunt prezentate).

#### **EXEMPLUL 5: Efectul Compusului 1 într-un model de insuficiență cardiacă post-ischemică cronică la șobolani**

##### **Obiectivul**

Obiectivul acestui studiu a fost de a testa capacitatea compusului 1 de a reduce disfuncția cardiacă și atenua remodelarea ventriculară într-un model de insuficiență cardiacă indusă de ischemie-reperfuzie.

##### **Metodologia**

Insuficiența cardiacă cronică a fost indusă la șobolanii masculi de rasă wistar (224-240 g, vârsta de 10-11 săptămâni) prin leziunea ischemie-reperfuzie (IR). Pentru protocolul I/R, artera coronară descendentă anterioară stângă (DAS) a fost astupată timp de 1 oră. Tratamentul medicamentos (5 mg/kg/zi sau 10 mg/kg/zi în apa de băut) a fost inițiat peste o săptămână după reperfuzie și a fost continuat pentru o perioadă de studiu de 3 luni. Eficacitatea compusului 1 a fost evaluată prin ecocardiografie peste o lună, două și trei luni după începerea tratamentului, și prin hemodinamică invazivă peste 3 luni în comparație cu

animalele tratate cu vehicul și fals operate. Specimene cardiace au fost, de asemenea, analizate pentru evaluarea hipertrofiei și conținutului de colagen. S-a colectat sange de la fiecare șobolan în ziua finală a studiului pentru evaluarea concentrațiilor plasmatice ale medicamentelor așa cum este arătat în Figura 3. Schema studiului este ilustrată în Figura 3.

5

### Metode statistice

Pe parametrii măsurați în timp, compararea animalelor operate fals față de cele tratate cu vehicul și compararea tratamentelor medicamentoase sunt analizate prin 2 căi ANOVA cu măsurări repetate. Pe parametrii măsurați la sacrificare și morfometrie, comparațiile animalelor operate fals față de cele tratate cu vehicul sunt analizate prin testul t și comparațiile tratamentelor medicamentoase prin ANOVA pe o singură cale urmată de testul Dunnett.

10

### Rezultatele

Animalele I/R tratate cu vehicul, comparativ cu animalele operate fals, au demonstrat volume sistolice finale (VSF VS) și volume diastolice finale (VDF VS) crescute ale ventriculului stâng (VS) (Figurile 4 A și B), funcție cardiacă micșorată măsurată prin reducerea Frațiunii de Ejecție (FE) (Figura 4C) și creșterea conținutului de colagen interstițial (Figura 5D). Compusul 1, administrat în doză de 5 și 10 mg/kg/zi a sporit semnificativ FE, precum și a redus atât VSF VS și VDF VS comparativ cu vehiculul, de la una până la trei luni (Figurile 4A-C), precum și a redus conținutul de colagen interstițial (Figura 5D).

20

Studiul hemodinamic invaziv (după 3 luni) a arătat o conservare a  $dp/dt$  max VS și  $dp/dt$  min VS la animalele tratate cu compusul 1 în doză de 5 și 10 mg/kg/zi comparativ cu vehiculul (Figurile 6B și C), fără nicio modificare statistică semnificativă a tensiunii arteriale sistolice VS asupra tratamentului (Figura 6A).

25

Nu au fost observate efecte asupra greutății corporale (GC), mărimii infarctului sau hipertrofiei (greutatea VS) după tratament (Figurile 5A-C). Concentrațiile plasmatice ale medicamentelor sunt prezentate în Figura 7.

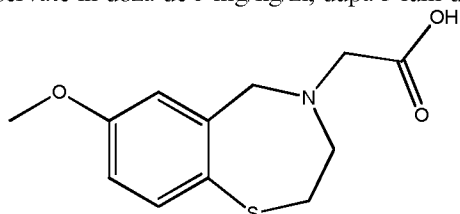
30

Rezultatele arată că compusul 1, în concentrații de 5 mg/kg/zi, exercită un efect benefic asupra funcției cardiace sistolice și diastolice într-un model de insuficiență cardiacă postischemică cronică la șobolani.

Compusul 1 a fost semnificativ și surprinzător mai activ în comparație cu compusul A, un derivat al benzotiazepinei cu o structură înrudită descris în WO 2007/024717. Așa cum se arată în Figura 8, compusul A, administrat într-o concentrație de 5 mg/kg/zi timp de 3 luni, nu a reușit să îmbunătățească funcția cardiacă sistolică și diastolică în comparație cu compusul 1 în modelul de șobolani cu insuficiență cardiacă post-ischemică cronică la sfârșitul studiului. Astfel, efectele benefice ale compusului 1, dar nu a compusului A, au fost observate în doză de 5 mg/kg/zi, după 3 luni de tratament în modelul de șobolani CHF.

35

40



Compusul A

### **EXEMPLUL 6: Efectul Compusului 1 asupra funcției musculare într-un model de distrofie musculară la șoarece (*mdx*)**

45

#### Obiectivul

Obiectivul acestui studiu a fost de a testa dacă tratamentul cu compusul 1 îmbunătățește funcția musculară într-un model de șoareci cu deficit de distrofină (*mdx*).

50

#### Metodologia

Șoarecii C57BL/10ScSn-DMD<sup>mdx</sup>/J (abreviat *mdx*, n=5 per grup), 6 săptămâni și circa 20 de grame în momentul inițierii studiului, au fost aclimatizați la cuștile pe roți timp de șase zile, înainte de selectarea aleatorie în grupuri care primesc tratament fie cu vehicul (H<sub>2</sub>O) sau

doze țintă de 5 mg/kg/zi, 10 mg/kg/zi, sau 50 mg/kg/zi (doze efective: 7,9 mg/kg/zi; 12,8 mg/kg/zi; și, respectiv, 61,5 mg/kg/zi, determinate de consumul de soluție medicamentoasă măsurată săptămânal împărțită la greutatea corporală) de sare de sodiu a compusului 1 (raportat la greutatea medicamentului de bază; sarea de sodiu este denumită, în continuare, în acest Exemplu ca "compusul 1") administrată în apa de băut la discreție timp de 4 săptămâni. Șoarecii C57BL/6 de aceeași vârstă (abreviat ca WT, n=4 per grup), au fost selectați aleator în grupuri care primesc tratament cu vehicul (H<sub>2</sub>O) sau o doză țintă de 50 mg/kg/zi (doză efectivă: 67,7 mg/kg/zi) de sare de sodiu a compusului 1.

Activitatea voluntară pe roată, greutatea corporală și consumul mediu de apă au fost măsurate în primele 3 săptămâni. Forța musculară specifică a fost măsurată după 4 săptămâni de tratament, la sfârșitul studiului.

Distanța parcursă (km/zi) pe o perioadă de 24 de ore a fost analizată ca un indice al activității funcționale îmbunătățite (a se vedea DMD\_M.2.1.002 SOP la <http://www.treat-nmd.eu/>). La sfârșitul studiului, mușchiul extensor lung al degetelor (EDL) a fost izolat pentru analiza forței musculare conform descrierii de mai jos. Sângele a fost colectat de la fiecare șoarece prin sângerări retro-orbitale la sfârșitul studiului (după terminarea ciclului de întineric - aproximativ ora 7) pentru evaluarea concentrațiilor plasmatice ale medicamentelor. Experimentele au fost "oarbe".

### Măsurările forței

La sfârșitul studiului, mușchiul EDL a fost disecat de la membrele posterioare pentru analiza forței izometrice utilizând Sistemul de testare musculară 407A de la Aurora Scientific (Aurora, Ontario, Canada). O sutură 6-0 a fost legată de fiecare tendon și întregul mușchi EDL, tendon la tendon, a fost transferat într-o baie Ragnoti de soluție barbotată Tyrode O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) (în mM: NaCl 121, KCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub> 24, și glucoză 5.5). Cu ajutorul suturilor, un tendon a fost legat vertical de un cârlig din oțel inoxidabil conectat la un traductor de forță. Celălalt tendon suturat a fost prins într-un braț mobil pe sistemul Aurora. Mușchiul EDL a fost stimulat să se contracteze cu ajutorul unui camp electric între doi electrozi de platină. La începutul fiecărui experiment, lungimea mușchiului a fost ajustată pentru a se obține forța maximă. Raporturile forță-frecvență au fost determinate prin contracția de declanșare utilizând frecvențe de stimulare treptate (5-250 Hz pentru 200 ms la tensiunea supra-prag). Între stimulări mușchiul a fost lăsat să se relaxeze ~ 3 min. La sfârșitul măsurării forței, lungimea (L<sub>0</sub>) mușchiului EDL, în timp ce era suturat în sistemul Aurora, a fost măsurată cu excepția tendoanelor. Mușchiul EDL a fost apoi îndepărtat din sistem și cântărit după tăierea tendoanelor finale și suturilor. Mușchiul EDL a fost apoi congelat în azot lichid. Secțiunea transversală (mm<sup>2</sup>) a mușchiului EDL a fost calculată prin împărțirea greutății mușchiului EDL la lungimea mușchiului EDL și constanta densității musculare a mamiferelor de 1,056 mg/m<sup>3</sup> (Yamada, T., et al. Arthritis and rheumatism 60:3280-3289). Pentru a determina forța specifică EDL (kN/m<sup>2</sup>), forța tetanică absolută a fost împărțită la secțiunea transversală a mușchiului EDL.

### Metode statistice

Pentru a determina semnificația statistică, s-a utilizat testul-t Student pentru compararea a doua grupe. Toate datele acumulate au fost exprimate ca medie +/- ESM (eroarea standard a mediei).

### Rezultatele

S-a testat capacitatea compusului 1 de a îmbunătăți efortul fizic voluntar la șoarecii mdx. După aclimatizarea șoarecilor la cușca pe roți voluntară, activitatea șoarecilor pe roțile voluntare a fost monitorizată de un computer 24/7. Datele colectate au fost transcrise la distanța parcursă pe zi timp de 3 săptămâni. Șoarecii mdx tratați cu 10 și 50 mg/kg/zi (doza țintă) de compus 1 au parcurs distanțe semnificativ mai lungi pe roată comparativ cu șoarecii mdx tratați doar cu vehicul (H<sub>2</sub>O) (P < 0,001 din ziua 1 până în ziua 19). Efectul tratamentului s-a observat încă din primele 2-3 zile de la inițierea tratamentului, și a continuat de-a lungul perioadei de monitorizare a activității. Nu s-a observat nici un efect al compusului 1 pe distanța de parcurs la șoarecii WT tratați cu 50 mg/kg/zi de compus 1 (Figura 9). În plus, așa cum s-a determinat prin măsurările de forță *in vitro* în mușchiul EDL (Figura 10), tratamentul cu compusul 1 a sporit forța specifică în mușchiul mdx în funcție de doză. La frecvențe de stimulare de 150 Hz și mai mult șoarecii mdx tratați cu 50 mg/kg/zi au demonstrat o sporire

semnificativă statistic a forței musculare specifice ( $P < 0,05$ ). Nu s-a observat nici un efect al tratamentului cu compusul 1 asupra forței musculare specifice la șoarecii WT.

După cum se prezintă în Figura 11, tratamentul cu compusul 1 nu a afectat greutatea corporală. Nu au fost observate efecte dependente de doză asupra consumului de apă. Expunerea sangvină dimineața a compusului 1 a fost de ( $\pm$  ESM medie)  $3,3 \pm 0,4 \mu\mu$  pentru șoarecii mdx cărora li s-a administrat o doză de  $5 \text{ mg/kg/zi}$ ,  $10,7 \pm 0,9 \mu\mu$  pentru șoarecii mdx cărora li s-a administrat o doză de  $10 \text{ mg/kg/zi}$ ,  $52,8 \pm 1,7 \mu\mu$  pentru șoarecii mdx cărora li s-a administrat o doză de  $50 \text{ mg/kg/zi}$ , și  $72,8 \pm 7,0 \mu\mu$  pentru șoarecii WT cărora li s-a administrat o doză de  $50 \text{ mg/kg/zi}$ . Luată împreună, rezultatele arată că, în comparație cu martorii tratați cu vehicul, tratamentul cu compusul 1 în doză de  $10 \text{ mg/kg/zi}$  și  $50 \text{ mg/kg/zi}$  (doza țintă) a îmbunătățit efortul fizic voluntar pe roată după 3 săptămâni și forța musculară specifică după 4 săptămâni la șoarecii mdx, un model murin de distrofie musculară Duchenne (DMD), demonstrând astfel utilitatea compusului 1 și analogilor acestuia precum s-a revendicat în prezenta, în tratamentul distrofiei musculare.

#### 15 **EXEMPLUL 7: Stabilitatea metabolică**

Stabilitatea metabolică a compusului 1, un Rycal™ reprezentativ conform prezentei invenții, a fost comparată cu cea a compusului B și compusului C, un derivat cu o structură înrudită a benzotiazepinei descris în WO 2007/024717.

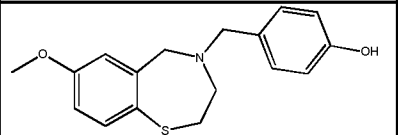
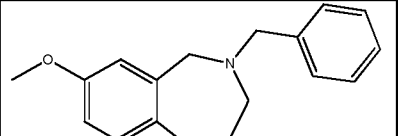
#### 20 **A. Stabilitatea metabolică în microzomi hepatici umani**

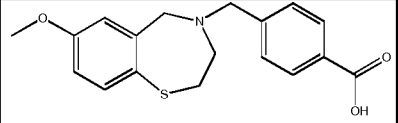
##### Metode:

Solubilizarea compușilor: Soluțiile inițiale (stoc) au fost preparate în DMSO, și soluțiile de lucru în apă conținând  $1 \text{ mg/ml}$  BSA.

Prezicerea biodisponibilității metabolice: Prezicerile biodisponibilității metabolice (MF%) au fost bazate pe măsurările stabilității metabolice in vitro cu microzomi hepatici, presupunând absorbția totală. Pe scurt, medicamente nemodificate au fost cuantificate prin LC-MS-MS după incubarea ( $10^{-7} \text{ M}$ ) cu microzomi de șobolani și umani hepatici ( $0,33 \text{ mg}$  proteină/ml) după 0, 5, 15, 30 și 60 de minute de incubare în prezența a NADPH ( $1 \text{ mM}$ ). Reacția enzimatică a fost oprită cu metanol (v/v) și proteinele au fost precipitate prin centrifugare. Clearance-urile intrinseci in vitro (Clint<sub>mic</sub>) exprimate ca ml/min/g proteină au fost panta (după liniarizarea LN) concentrației rămase a medicamentului nemodificat față de timpul de incubare. Clint in vitro au fost apoi extinse până la întregul corp in vivo (vivoClint) utilizând  $0,045 \text{ mg prot/kg}$  de ficat și greutatea ficatului de  $11 \text{ g}$  pentru șobolan și  $1,2 \text{ kg}$  pentru om. Clint in vivo au fost apoi transformate în clearance-uri hepatice (HepCl), utilizând modelul bine agitat ( $\text{HepCl} = \text{vivoClint} \cdot \text{FSH} / (\text{vivoClint} + \text{FSH})$ ) în care FSH (fluxul sanguin hepatic) au fost preluate ca  $22 \text{ ml/min}$  pentru șobolan și  $1500 \text{ ml/min}$  pentru om. MF% au fost apoi deduse din raportul de extracție cu următoarea ecuație ( $\text{MF}\% = 1 - \text{HepCl}/\text{FSH}$ ). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1:

**Tabelul 1: Stabilitatea în microzomii umani**

Compusul	Structura	Microzomi de șobolani			Microzomi umani		
		Clint <sub>mic</sub> rat ml/min/gprot	MF mic %	Clasa	Clint <sub>mic</sub> man ml/min/gprot	MF mic %	Clasa
B		823	5	foarte scăzută	285	6	foarte scăzută
C		1926	2	foarte scăzută	1326	2	foarte scăzută

1		101	30	Intermediară	9,1	75	înaltă
---	---	-----	----	--------------	-----	----	--------

- a. Clint<sub>mic</sub>: clearance intrinsec in vitro în ml/min/gproteină  
b. MF%: biodisponibilitatea metabolică în %

5 **B. Stabilitatea metabolică în hepatocite de șobolan și hepatice umane**

Solubilizarea compușilor: Soluțiile inițiale au fost preparate în DMSO, și soluțiile de lucru în mediul William conținând 1/10 plasmă de șobolani sau 1/4 plasmă umană.

- 10 Determinarea stabilității metabolice: Compușii au fost incubăți la 10<sup>-7</sup> M cu hepatocitele izolate (6E+5 celule/ml pentru hepatocite de șobolan și 4E+5 celule/ml pentru hepatocite umane) la 37°C în plasmă de la aceleași specii diluate în mediul Williams (1/10 diluție pentru șobolani și 1/4 diluție pentru oameni). Probele au fost prelevate la 0, 10, 20, 30, 60 și 120 de minute și reacția enzimatică s-a oprit cu metanol (v/v). Proteinele au fost precipitate prin centrifugare și supernatantul a fost analizat prin LC/MS/MS. Clint exprimat ca ml/min/g proteină au fost calculate ca pentru microzomi hepatici folosind un raport de 0,134 mg proteină/ml pentru 4E+5 celule/ml pentru oameni și 0,201 mg proteină/ml pentru 6E+5 celule/ml pentru șobolani. Prezența medicamentului de referință și metabolitului potențial a fost verificată prin LC/MS/MS în timpul testului în fiecare probă. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2:

**Tabelul 2:** Stabilitatea în hepatocite umane și de șobolan

Compusul	Hepatocite de șobolan			Hepatocite umane		
	Clint (ml/min/gprot)	MF șobolan %	Celule Q/ml	Clint (ml/min/gprot)	MF uman %	Celule Q/ml
<b>B</b>	1334	3	6.00E+05	693	3	4.00E+05
<b>1</b>	5	90	6.00E+05	0	100	4.00E+05
<b>C</b>	2610	2	6.00E+05	100	16	4.00E+05

- 25 a. Clint<sub>mic</sub>: clearance intrinsec in vitro în ml/min/gproteină  
b. MF%: biodisponibilitatea metabolică în %  
c. Q: cantitatea celulelor per ml

**C. Stabilitatea metabolică în microzomi de șoarece și de șobolan**

30 **Materiale și procedee**

**Soluție tampon de diluare:** 0,1M soluție tampon Tris HCl la pH 7.4 conținând 5 mM EDTA.

- 35 **Soluție cofactor NADPH:** Intr-o eprubetă falcon de 50 ml care conține 2,79 ml soluție tampon de diluare s-au adăugat 0,429 ml de sol. de regenerare NADPH A și 0,079 ml de sol. de regenerare NADPH B

- 40 **Prepararea microzomilor:** (soluție 1,5 mg/ml) O eprubetă falcon de 50 ml conținând 3,32 ml de soluție tampon de diluare a fost preîncălzită la 37 °C timp de 15 min. (cel puțin 10 min.) 0,178 ml de microzomi (24,6 mg/ml) s-a adăugat la soluția tampon de diluare preîncălzită. Concentrația proteică a acestui preparat de microzomi a fost de 1,25 mg/ml.

**Probă (Compusul de testare) - Soluții de bază inițiale și intermediare:** S-a preparat o soluție de 1 mg/ml (0,5 mg/ml s-a utilizat pentru compusul 1) de compusul de testare în metanol. S-a preparat 100 μl de soluție intermediară de compus de testare din soluția de

bază inițială utilizând soluția tampon de diluare. O soluție de 5  $\mu\text{m}$  a fost preparată prin diluarea a 100  $\mu\text{m}$  de soluție intermediară utilizând soluția tampon de diluare.

**Experiment:**

(Experimentele au fost conduse în eprubete eppendorf pentru microcentrifugă de 1,5 ml).

5 0 minute incubare. Procedura:

- a. Se adaugă 100  $\mu\text{l}$  de microzomi preîncălziți
- b. Se adaugă 50  $\mu\text{l}$  de soluție 5  $\mu\text{m}$  de compus de testare.
- c. Se adaugă 500  $\mu\text{l}$  de soluție rece pentru stopare (metanol rece ca gheața)
- d. Se adaugă 100  $\mu\text{l}$  de soluție cofactor de NADPH în eprubetă eppendorf.

10 a. Se amestecă intensiv eprubeta eppendorf.

“t” minute incubare

- b. Se adaugă 100  $\mu\text{l}$  de soluție cofactor de NADPH în eprubeta eppendorf.
- c. Se adaugă 50  $\mu\text{l}$  de soluție 5  $\mu\text{m}$  de compus de testare.
- d. Se adaugă 100  $\mu\text{l}$  de microzomi preîncălziți

15 e. Se incubează eprubeta eppendorf la 37°C 300 rpm timp de ‘t’ min. pe un termomixer.

- f. Se înlătură eprubeta eppendorf din termomixer.
- g. Se adaugă 500  $\mu\text{l}$  de soluție rece pentru stopare (metanol rece ca gheața)
- h. Se amestecă intensiv eprubeta eppendorf.

20

Probele incubate la "0" și "t" minute au fost centrifugate la 15,000 rcf la 4°C timp de 15 min. 500  $\mu\text{l}$  de soluție de supernatant s-a înlăturat și supus analizei LC/MS (MIS - Monitorizarea Ionilor Selectați)

25 Rezultatele sunt exprimate ca % compusului de testare rezidual = (MS Zona de răspuns a probei ‘t’ min / MS Zona de răspuns a probei "0" min) \* 100. Zona MS utilizată este o medie de injecții în duplicat.

Intervalele de timp = 0, 15, 30 și 60 min. pentru fiecare compus de testare

**Martorul pozitiv:**

30 În calitate de martor pozitiv s-a utilizat incubarea a 2  $\mu\text{m}$  Imipramină - 5 min. și 2  $\mu\text{m}$  Imipramină - 15 min. pentru experimentele de stabilitate a microzomilor în ficatul de șobolan și de șoarece.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3:

35 **Tabelul 3:** Stabilitatea în microzomii de șoarece și șobolan

Stabilitatea metabolică in vitro	Compusul (I)	Compusul (B)	Compusul (C)
Microzomii de șobolan (% rezidual)			
15min	54%	1%	0%
30min	17%	0%	0%
1h	2%	0%	0%
Microzomii de șoarece (% rezidual)			
15min	99%	0%	0%
30min	98%	0%	0%
1h	82%	0%	0%

40 În mod surprinzător, după cum se vede în Tabelele 1-3, compusul 1 a fost semnificativ mai stabil în microzomii de șoarece, de șobolan și cei umani, precum și în hepatocitele de șobolan și cele umane, comparativ cu analogii structurali compușii B și C dezvăluiți în WO 2007/024717. S-a constatat că ambii compuși sus-menționați posedă o stabilitate metabolică in vitro slabă în sistemele testate, ceea ce face ca acești compuși să fie neadecvați pentru elaborarea lor în calitate de candidați de medicamente. În mod surprinzător și neașteptat, substituirea fragmentelor H sau OH în compușii din stadiul tehnicii cu un fragment COOH a dus la compusul 1, care a demonstrat o stabilitate metabolică înaltă în toate sistemele testate.

Stabilitatea metabolică înaltă a Compusului 1 comparativ cu analogii săi structurali a fost cu adevărat surprinzătoare și dovedește beneficiile neașteptate ale acestui compus față de compușii cunoscuți în domeniu.

5 Toate publicațiile, referințele, brevetele și cererile de brevet citate în prezenta sunt incluse prin referință în întregime, în aceeași măsură ca și cum fiecare cerere individuală, brevet sau cerere de brevet ar fi fost indicată în mod specific și individual pentru a fi inclusă prin referință în întregime.

10 Descrierea anterioară a variantelor de executare specifice va dezvălui atât de integral natura generală a invenției încât persoanele terțe pot, prin aplicarea cunoștințelor actuale, modifica și/sau adapta ușor pentru diverse utilizări astfel de variante de executare specifice, fără experimente necuvenite și fără a se îndepărta de la conceptul generic și, prin urmare, astfel de adaptări și modificări trebuie și sunt destinate de a fi înțelese în sensul și domeniul de echivalente ale variantelor de executare dezvăluite. Se va înțelege că frazeologia sau terminologia utilizată în prezenta este cu scopul de ilustrare și nu de limitare. Mijloacele, materialele și etapele pentru realizarea diverselor funcții dezvăluite pot lua o varietate de

15 forme alternative fără a se îndepărta de la invenție.

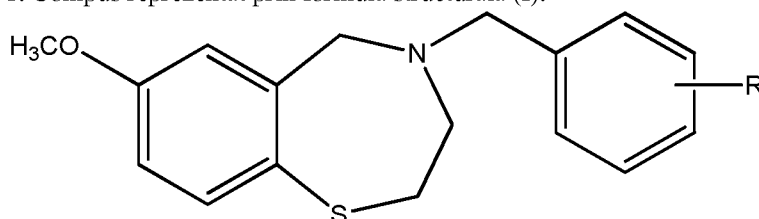
### Descrierea se publică în redacția solicitantului

#### (56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. WO2007024717 A2 2007.03.01
2. WO2005094457 A2 2005.10.13
3. WO2006101496 A1 2006.09.28
4. WO2008060332 A2 2008.05.22
5. WO2008021432 A2 2008.02.21
6. WO2012019076 A1 2012.02.09
7. WO2012019071 A1 2012.02.09
8. WO2012037105 A1 2012.03.22
9. US7544678 B2 2009.06.09
10. WO2009111463 A1 2009.09.11
11. US2004224368 A1 2004.11.11
12. WO2008064264 A2 2008.05.29

#### (57) Revendicări:

1. Compus reprezentat prin formula structurală (I):



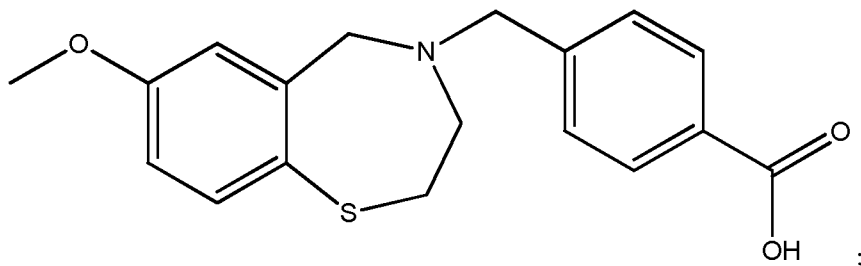
(I)

unde R este COOH;  
și sărurile sale acceptabile farmaceutic.

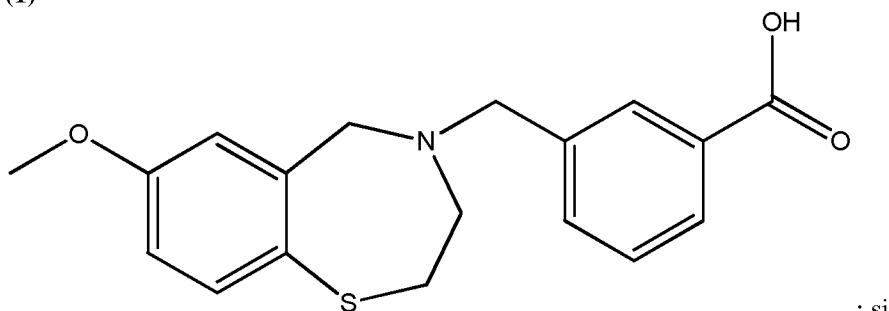
2. Compus, conform revendicării 1, sub formă de o sare cu un acid sau o bază acceptabilă farmaceutic.

3. Compus, conform revendicării 2, unde sarea este selectată din grupul ce constă din sodiu, potasiu, magneziu, hemifumarat, hidrociorură și hidrobromură, de preferință, unde sarea este de sodiu sau hemifumarat.

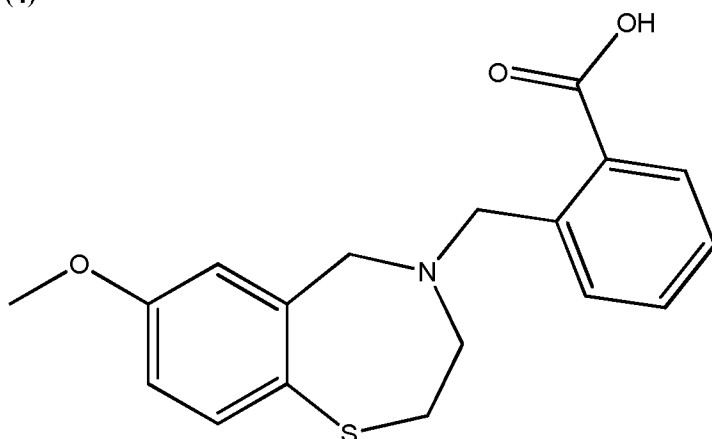
4. Compus, conform revendicării 1, care este selectat din grupul ce constă din:



(1)

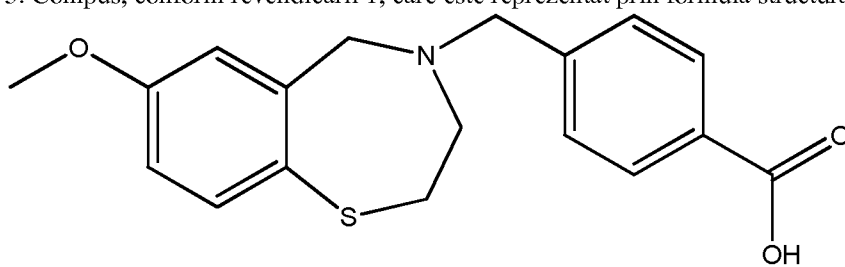


(4)



(6)

5. Compus, conform revendicării 1, care este reprezentat prin formula structurală (1):



(1)

sau sărurile sale acceptabile farmaceutic.

6. Compus, conform revendicării 5, sub formă de o sare cu un acid sau o bază acceptabilă farmaceutic.

7. Compus, conform revendicării 6, unde sarea este selectată din grupul ce constă din sodiu, potasiu, magneziu, hemifumarat, hidrociorură și hidrobromură.

8. Compus, conform revendicării 7, unde sarea este sare de sodiu.

9. Compus, conform revendicării 7, unde sarea este sare de hemifumarat.

10. Compoziție farmaceutică care cuprinde un compus, conform oricăreia dintre revendicările 1-9, în combinație cu unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic.

11. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10, pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea unei stări selectate din grupul ce cuprinde tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, disfuncții cognitive,

tulburări și boli neuromusculare, tulburări și boli osoase, cașexie legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită și sindromul morții subite a sugarului sau pentru îmbunătățirea funcției cognitive.

12. Metodă de tratare sau prevenire a unei stări selectate din grupul ce cuprinde tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, disfuncții cognitive, tulburări și boli neuromusculare, tulburări și boli osoase, cașexie legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită și sindromul morții subite a sugarului sau pentru îmbunătățirea funcției cognitive, metoda cuprinde etapa de administrare unui subiect, care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic de un compus conform oricăreia dintre revendicările 1-9 sau de o compoziție farmaceutică conform revendicării 10.

13. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea unei stări conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde starea este asociată cu o funcție anormală a receptorului rianodinei 1 (RyR1), a receptorului rianodinei de tip (RyR2), a receptorului rianodinei de tip 3 (RyR3) sau o combinație a acestora.

14. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea unei stări conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde tulburările și bolile cardiace sunt selectate din grupul ce cuprinde tulburări și boli ale băților neregulate ale inimii, cum sunt tulburări și boli ale băților neregulate selectate din grupul ce cuprinde aritmie atrială și ventriculară, fibrilație atrială și ventriculară, tahiaritmie atrială și ventriculară, tahicardie atrială și ventriculară, tahicardie ventriculară polimorfă catecolaminergică (TVPC) și variantele acestora induse prin efort fizic; tulburări și boli ale băților neregulate ale inimii induse prin efort fizic; insuficiență cardiacă; insuficiență cardiacă congestivă; insuficiență cardiacă cronică; insuficiență cardiacă acută; insuficiență cardiacă sistolică; insuficiență cardiacă diastolică; insuficiență cardiacă acută decompensată; leziune ischemică/de reperfuzie (I/R) cardiacă; boală pulmonară obstructivă cronică; leziune I/R ca urmare a angioplastiei coronariene sau ca urmare a trombolizei pentru tratamentul infarctului miocardic (IM) și hipertensiune arterială.

15. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizare în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde oboseala musculară este cauzată de o boală, tulburare sau stare a mușchilor scheletici.

16. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde boala, tulburarea sau starea musculoscheletică este selectată din grupul ce cuprinde oboseala musculară scheletică indusă de efort fizic; oboseala musculară indusă de efort fizic prelungit sau efort fizic de intensitate înaltă; miopatia congenitală; distrofia musculară, cum este distrofia musculară Duchenne (DMD), distrofia musculară Becker (DMB), distrofia musculară la nivelul membrelor-brau (DMMB), distrofia facio-scapulo-humerală, distrofia musculară miotonică, distrofia musculară congenitală (DMC), distrofia musculară distală, distrofia musculară Emery-Dreifuss și distrofia musculară oculo-faringiană; atrofia musculară spinală (AMS), atrofia musculară spinală și bulbară (AMSB), oboseala musculară legată de vârstă; sarcopenia, boala miezului central; cașexia legată de cancer; tulburările vezicii urinare și incontinența.

17. Compoziție farmaceutică conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde tulburările și bolile SNC sunt selectate din grupul ce cuprinde boala Alzheimer (BA), neuropatie, convulsii, boala Parkinson (BP) și boala Huntington (BH); iar tulburările și bolile neuromusculare sunt selectate din grupul ce cuprinde ataxia spinocerebelară (ASC) și scleroza laterală amiotrofică (SLA, boala Lou Gehrig).

18. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde disfuncția cognitivă este legată de stres sau de vârstă, sau unde funcția cognitivă ce trebuie îmbunătățită este memoria de scurtă durată, memoria de lungă durată, atenția sau învățarea, sau unde disfuncția cognitivă este asociată cu o boală sau tulburare selectată din grupul ce cuprinde boala Alzheimer (BA), tulburarea de hiperactivitate și deficit de atenție (THDA), tulburarea din spectrul autismului (TSA), tulburarea de anxietate generalizată (TAG), tulburarea obsesiv-compulsivă (TOC), boala Parkinson (BP), tulburarea de stres posttraumatic (TSPT), schizofrenia, tulburarea bipolară și depresia majoră.

19. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde starea este cașexia legată de cancer, preferabil cauzată de o formă de cancer cu metastaze osoase.

20. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde compusul este utilizat într-o doză suficientă pentru a restabili sau îmbunătăți legarea calstabin2 de RyR2.

21. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde compusul este utilizat într-o doză suficientă pentru a restabili sau îmbunătăți legarea calstabin1 de RyR1.

22. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, unde compusul este utilizat într-o doză suficientă pentru a micșora scurgerea  $\text{Ca}^{2+}$  printr-un canal RyR.

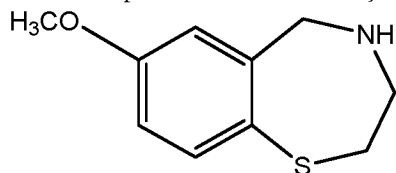
23. Compus, conform oricăreia dintre revendicările 1-9, sau o sare a acestuia, pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea unei stări selectate din grupul ce cuprinde tulburări și boli cardiace, oboseală musculară, tulburări și boli musculoscheletice, tulburări și boli ale SNC, disfuncții cognitive, tulburări și boli neuromusculare, tulburări și boli osoase, cașexie legată de cancer, hipertermie malignă, diabet, moarte cardiacă subită și sindromul morții subite a sugarului sau pentru îmbunătățirea funcției cognitive.

24. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 10 pentru utilizarea în tratamentul sau prevenirea conform revendicării 11, sau metodă conform revendicării 12, cuprinzând în plus utilizarea unei oligonucleotide antisens (OA), care este specifică pentru o secvență de matisare într-un ARNm de interes, pentru sporirea ignorării exonului în ARNm respectiv de interes.

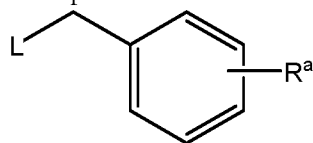
25. Compoziție farmaceutică, conform revendicării 24, pentru utilizarea în tratamentul distrofiei musculare Duchenne (DMD), unde oligonucleotida antisens (OA) este specifică pentru o secvență de matisare a, cel puțin, unui exon al genei DMD, de preferință o secvență de matisare a exonului 23, 45, 44, 50, 51, 52 și/sau 53 al genei DMD.

26. Metodă de tratare a unui subiect care suferă de distrofie musculară Duchenne (DMD), cuprinzând etapa de administrare subiectului respectiv a unui compus conform oricăreia dintre revendicările 1-9, sau o compoziție farmaceutică conform revendicării 10, în combinație cu o oligonucleotidă antisens (OA) care este specifică pentru o secvență de matisare a, cel puțin, unui exon al genei DMD, de preferință o secvență de matisare a exonului 23, 45, 44, 50, 51, 52 și/sau 53 al genei DMD.

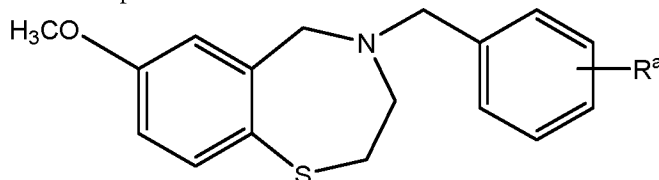
27. Procedeu de preparare a unui compus conform oricăreia dintre revendicările 1-9, cuprinzând etapa de conducere a reacției dintre compusul cu formula structurală:



și un compus cu formula structurală:



unde  $\text{R}^a$  este  $\text{COOR}^1$  sau  $\text{CN}$ ,  $\text{R}^1$  este un alchil  $\text{C}_1\text{-C}_4$  și L este o grupă înlocuibilă pentru a se obține un compus cu formula structurală:



și transformând gruparea  $\text{R}^a$  în gruparea R pentru a se obține un compus cu formula structurală (I).

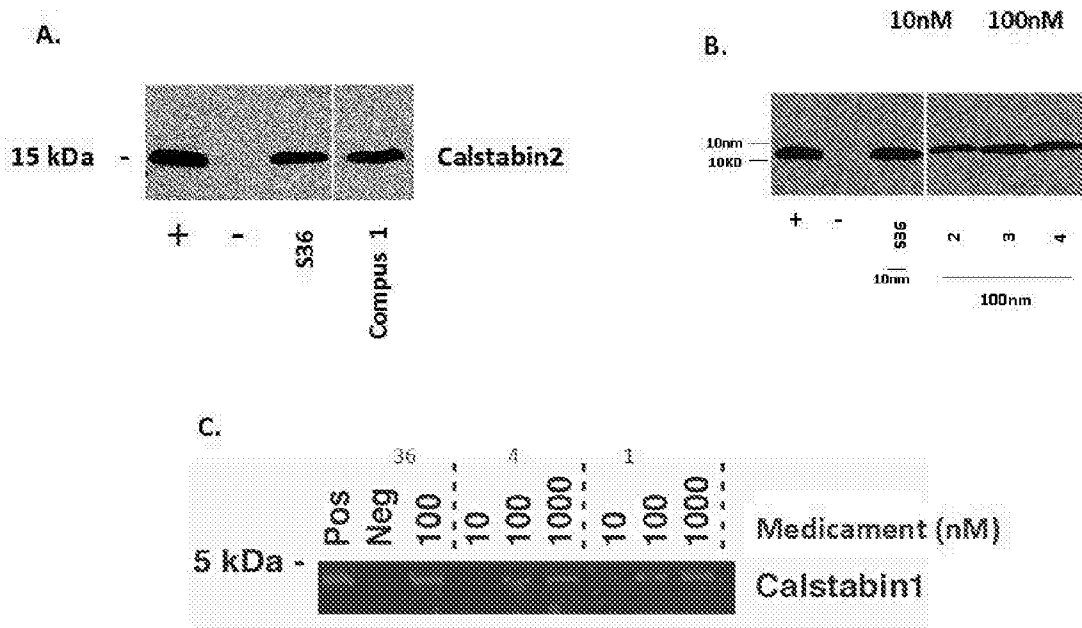


Fig. 1

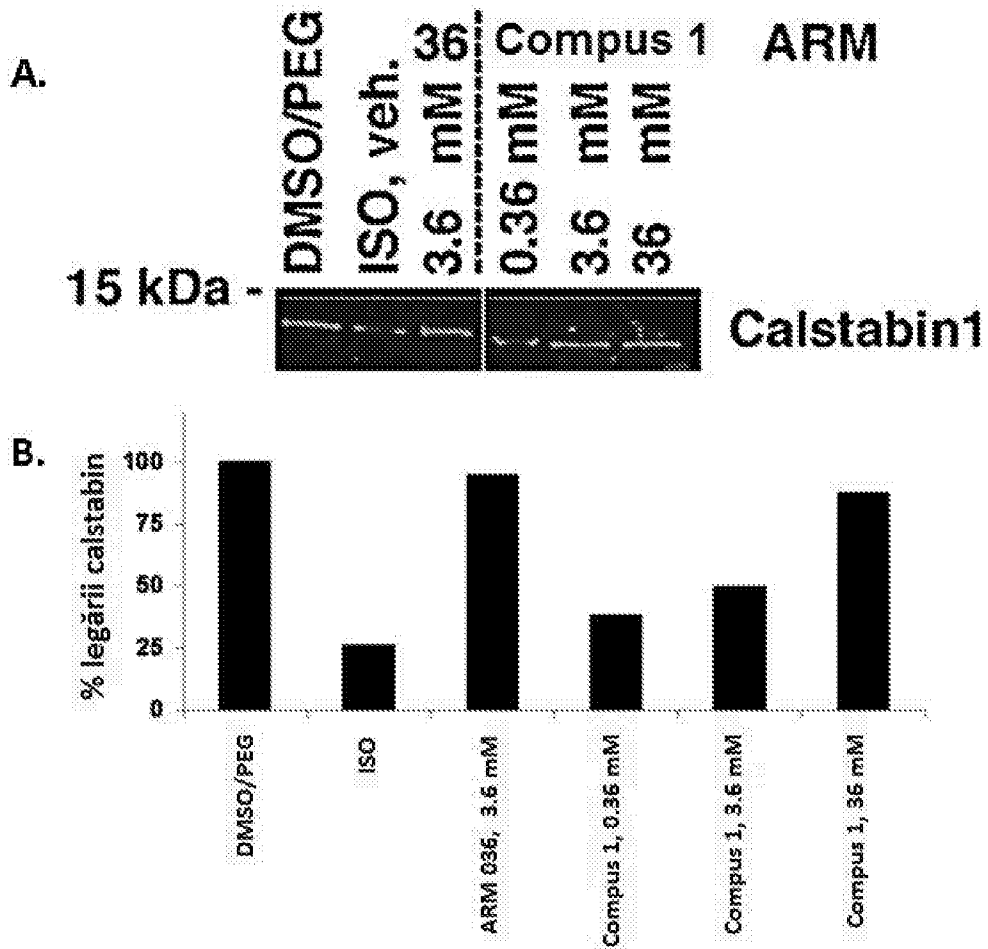


Fig. 2

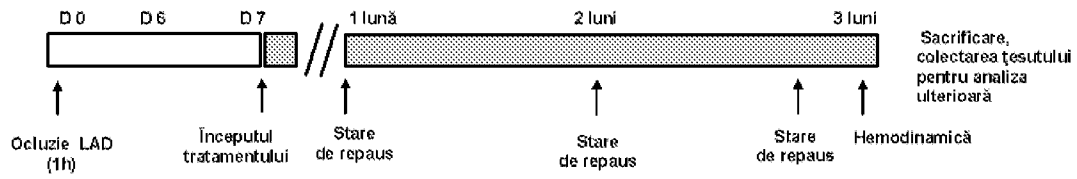


Fig. 3

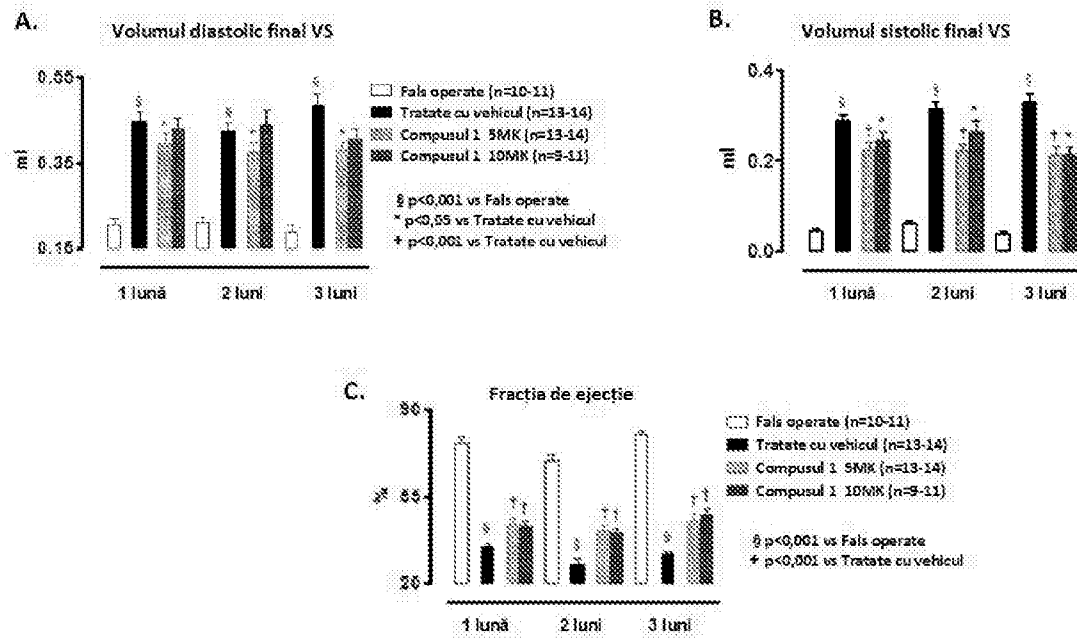


Fig. 4

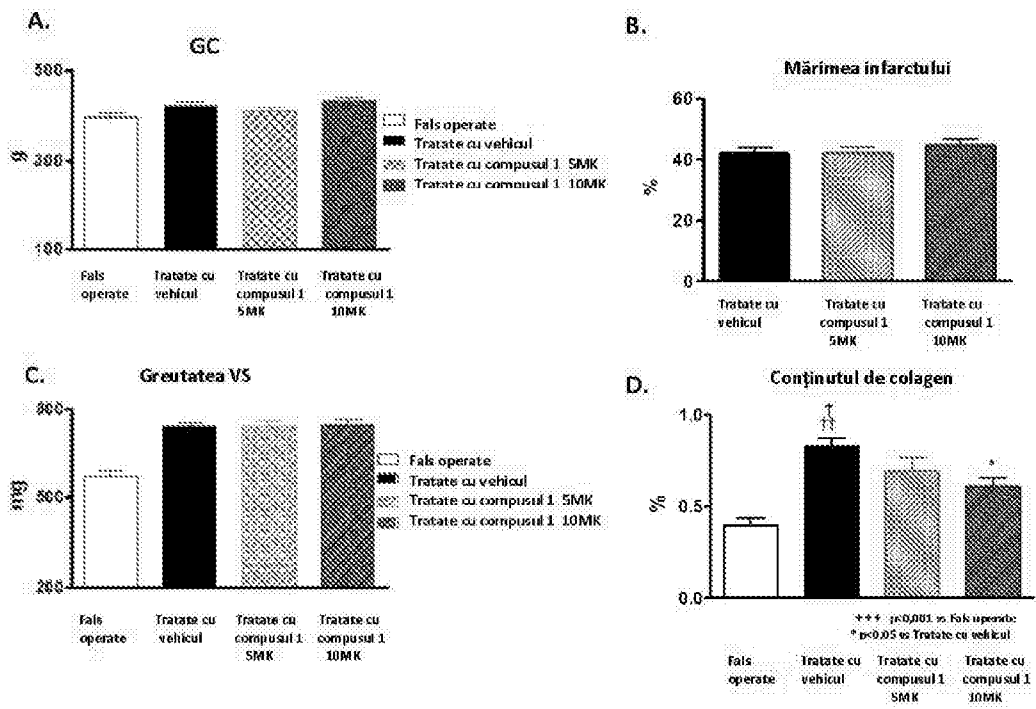


Fig. 5

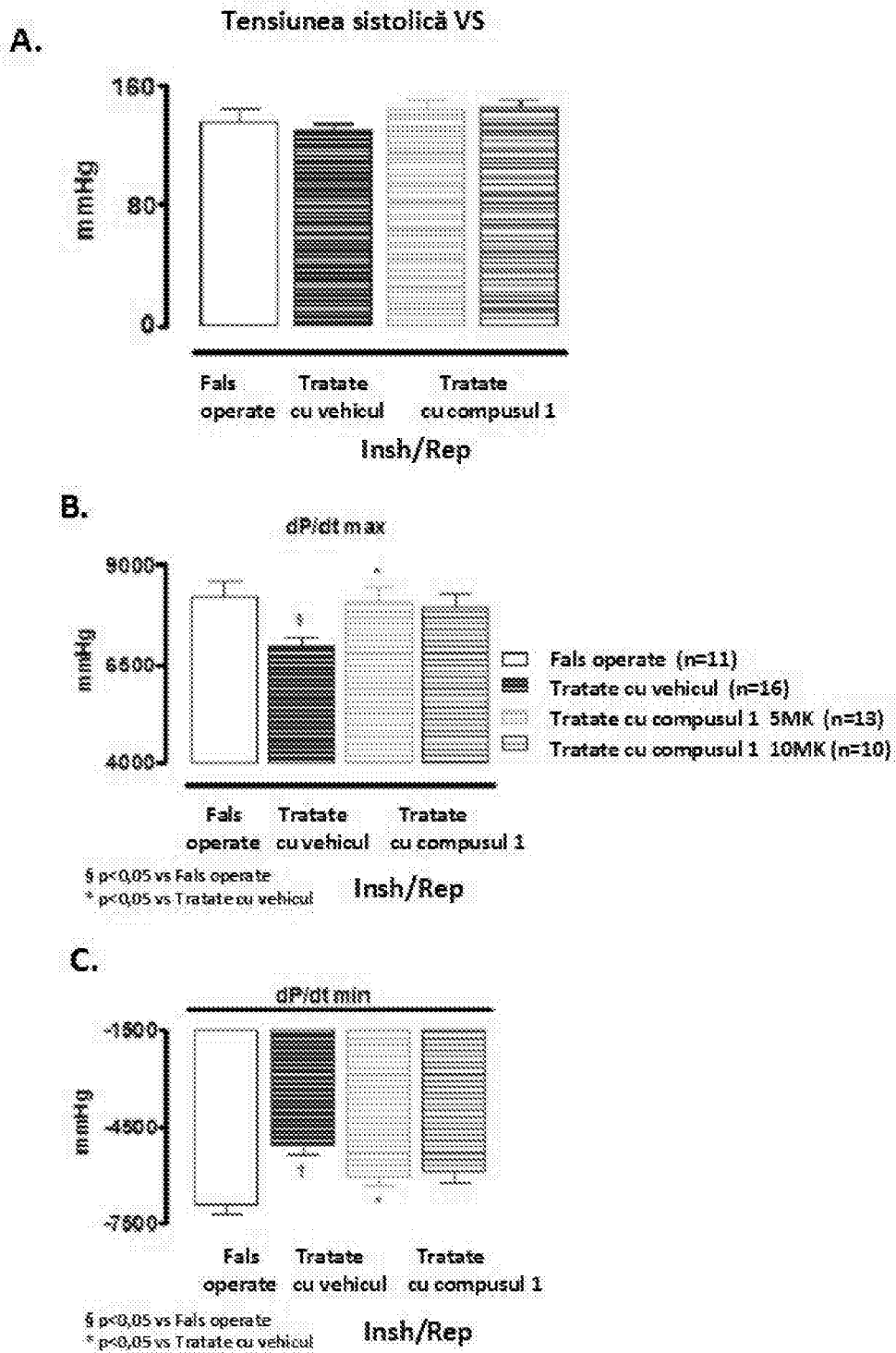


Fig. 6

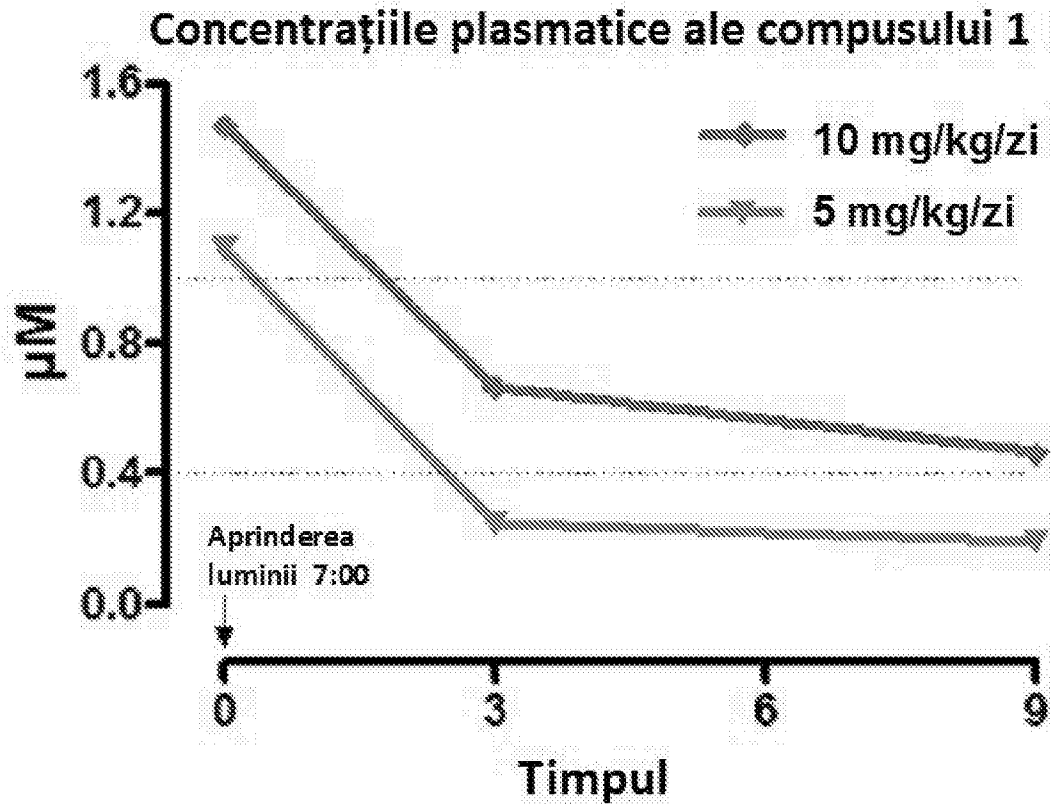


Fig. 7

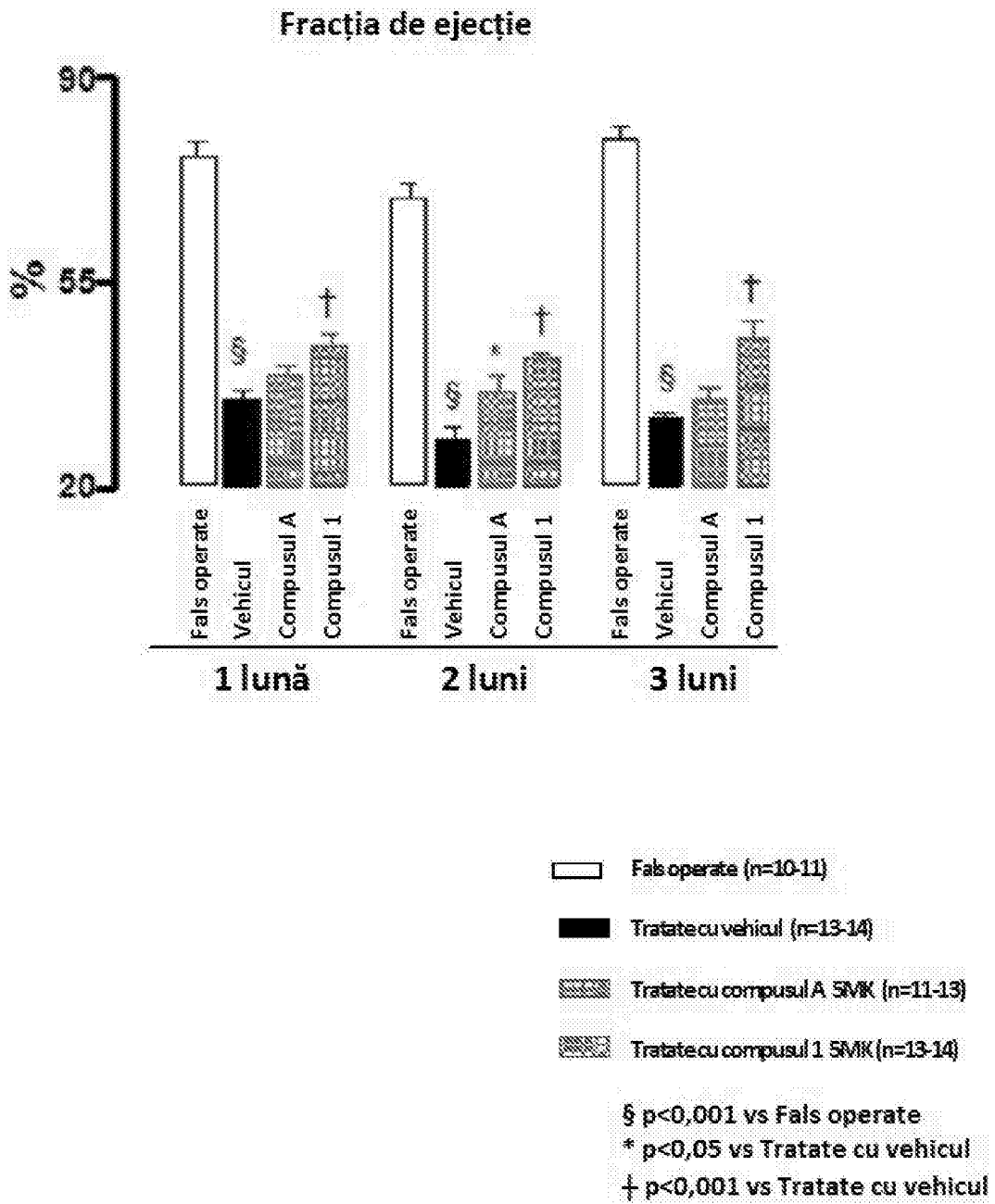


Fig. 8

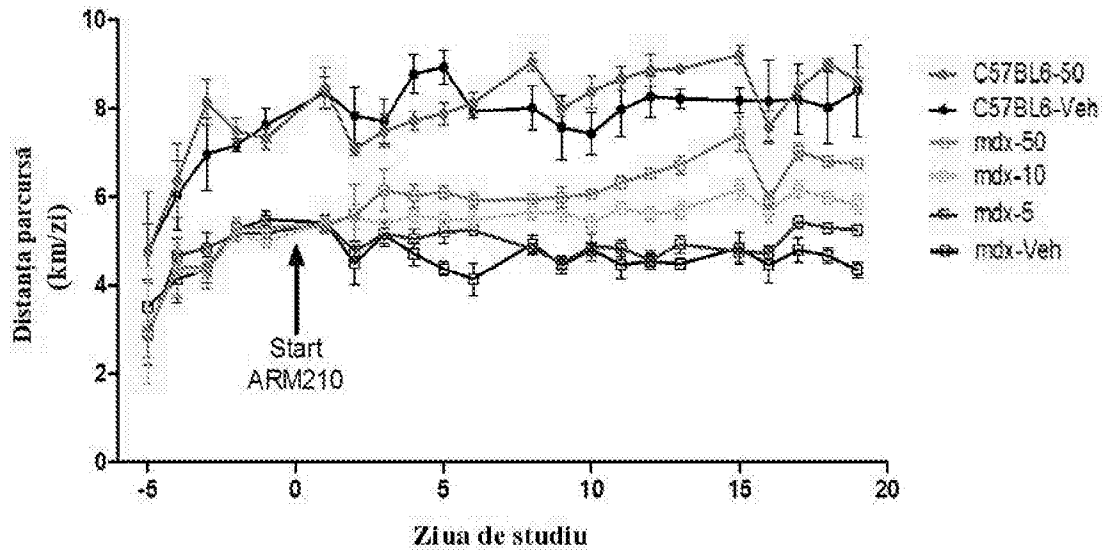


Fig. 9

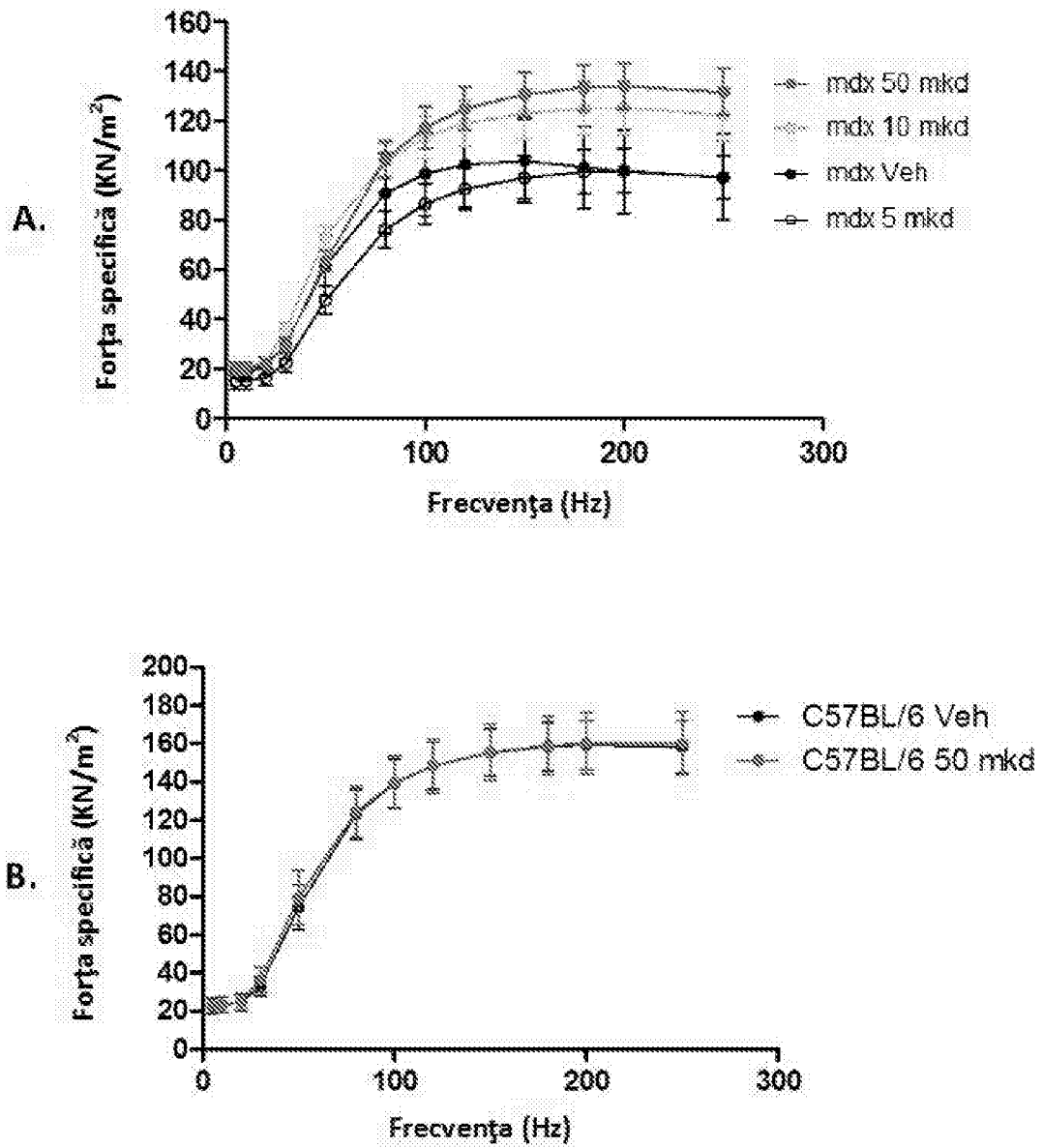


Fig. 10

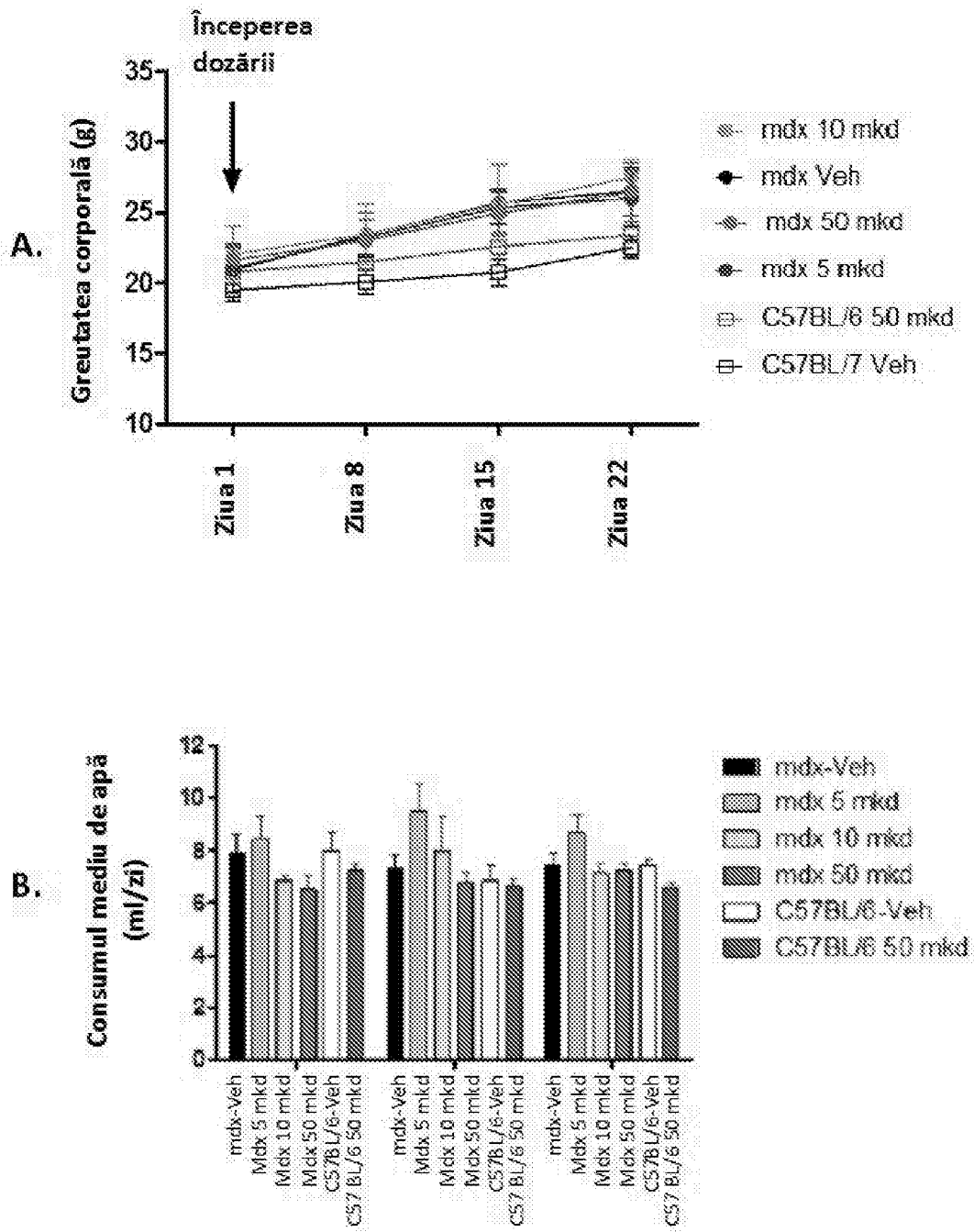


Fig. 11

**RAPORT DE DOCUMENTARE**

**I. Datele de identificare a cererii**

(21) Nr. depozit: a 2014 0119 (32) Data de prioritate recunoscută: 2012.04.18; 2012.05.11

(22) Data depozit: 2013.04.17 Raport de documentare internațională:  da

(71) Solicitant: **LES LABORATOIRES SERVIER, FR; ARMGO PHARMA INC, US**

(54) **Titlul: Derivați de 1,4-benzotiazepină, procedeu de sinteză a lor, compoziții farmaceutice care le conțin și utilizarea acestora pentru tratarea sau prevenirea afecțiunilor care implică modularea receptorilor de rianodină**

**II. Clasificarea obiectului invenției:**

(51) **Int.Cl:** *C07D 281/10* (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)  
*A61K 31/554* (2006.01) *A61P 19/08* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)

**III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)**

**MD - Intern « Documentare Invenții »** (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta):

- a) *C07D 281/10 A61K 31/554 A61P 9/00 A61P 19/08 A61P25/00*  
 b) Termeni caracteristici în limba română: 1,4-benzotiazepina, 2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina, 7-metoxi-2,3,4,5-tetrahidro-1,4-benzotiazepina, RyRs, receptorii rianodinei

**"Worldwide" (Espacenet):**

- a) *C07D 281/10 A61K 31/554 A61P 9/00 A61P 19/08 A61P25/00*  
 b) Termeni caracteristici în limba engleză: 1,4-benzothiazepine, 2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzothiazepine, 7-methoxy-2,3,4,5-tetrahydro-1,4-benzothiazepine, RyRs, ryanodine receptors

**EA, CIS (Eapatis), FIPS(RU), SU:**

- a) *C07D 281/10 A61K 31/554 A61P 9/00 A61P 19/08 A61P25/00*  
 b) Termeni caracteristici în limba rusă: 1,4-бензотиазепин, 2,3,4,5-тетрагидро-1,4-бензотиазепин, 7-метокси-2,3,4,5-тетрагидро-1,4-бензотиазепин, RyRs, рецепторы рианодина

**IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate**

<http://circ.ahajournals.org/content/circulationaha/early/2006/01/09/CIRCULATIONAHA.105.558213.full.pdf>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1896290/>

[https://books.google.md/books?id=t2pA0X8UC3gC&pg=PA279&lpg=PA279&dq=1,4-benzothiazepine+derivative+\(Yano+et+al.,+2003\)&source=bl&ots=N69Hzqv57T&sig=2GFzPcxa-xX71F2LYG3u8vFsvZU&hl=ro&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=1%2C4-benzothiazepine%20derivative%20\(Yano%20et%20al.%2C%202003\)&f=false](https://books.google.md/books?id=t2pA0X8UC3gC&pg=PA279&lpg=PA279&dq=1,4-benzothiazepine+derivative+(Yano+et+al.,+2003)&source=bl&ots=N69Hzqv57T&sig=2GFzPcxa-xX71F2LYG3u8vFsvZU&hl=ro&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=1%2C4-benzothiazepine%20derivative%20(Yano%20et%20al.%2C%202003)&f=false)

<https://www.jci.org/articles/view/34006>

[http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2009/4120/pdf/Tolaymat\\_Dissertation.pdf](http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2009/4120/pdf/Tolaymat_Dissertation.pdf)

[http://www.medicinalgenomics.com/wp-content/uploads/2013/01/Protection\\_RYR2\\_Marks\\_Science-2004-Wehrens-292-6.pdf](http://www.medicinalgenomics.com/wp-content/uploads/2013/01/Protection_RYR2_Marks_Science-2004-Wehrens-292-6.pdf)

**V. Documente considerate a fi relevante**

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	WO2007024717 A2 2007.03.01	1-11, 13-23, 27
A, D	WO2005094457 A2 2005.10.13	1-14, 20-27
A, D	WO2006101496 A1 2006.09.28	1-14, 20-27
A, D	WO2008060332 A2 2008.05.22	1-11, 13-23, 27
A, D	WO2008021432 A2 2008.02.21	1-11, 13-23, 27
A, D	WO2012019076 A1 2012.02.09	1-16, 23-26
A, D	WO2012019071 A1 2012.02.09	1-16, 23-26
A, D	WO2012037105 A1 2012.03.22	1-11, 13-23, 27
A, D	US7544678 B2 2009.06.09	1-16, 20-27
A, D	WO2009111463 A1 2009.09.11	1-9, 27
A, D	US2004224368 A1 2004.11.11	1-16, 20-27
A, D, C	WO2008064264 A2 2008.05.29	1-26
A	EP0368063 B1 1992.06.10	1-9, 27
A	WO9411360 A1 1994.05.26	1-10, 12, 17-18, 23-27
A	US5580866 A 1996.12.03	1-10, 12, 17-18, 23, 27
A	US2006194767 A1 2006.08.31	1-18, 20-27
A	EA200600740 A1 2006.10.27	1-14, 20-22, 27
A	US2009292119 A1 2009.11.26	1-9, 27
A	WO2008021439 A2 2008.02.21	1-11, 13-23, 27

**\* categoriile speciale ale documentelor citate:**

<b>A</b> – document care definește stadiul anterior general	<b>T</b> – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
<b>X</b> – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	<b>E</b> – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
<b>Y</b> – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	<b>D</b> – document menționat în descrierea cererii de brevet
<b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	<b>C</b> – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	<b>&amp;</b> – document, care face parte din aceeași familie de brevete
<b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	<b>L</b> – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării

2016.10.06

Examinator

STAFI Radu