

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 028 375**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4704 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2022 PCT/EP2022/063870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2022 WO22248394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2022 E 22728630 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2025 EP 4346821**

54 Título: **1,2-Dihidroquinolin-2-onas para su uso en el tratamiento de distrofia muscular de cinturas**

30 Prioridad:

24.05.2021 EP 21382471

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

19.06.2025

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (50.00%)**

C/ Serrano 117

28006 Madrid, ES y

ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA

COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI (50.00%)

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ GIL, ANA;

PALOMO RUIZ, VALLE;

SÁENZ PEÑA, MIREN AMETSA y

LÓPEZ DE MUNAIN ARREGI, ADOLFO JOSÉ

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 3 028 375 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

1,2-Dihidroquinolin-2-onas para su uso en el tratamiento de distrofia muscular de cinturas

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la química de medicamentos. En particular, la invención se refiere a un método para el tratamiento de un tipo particular de distrofia muscular, concretamente la distrofia muscular de cinturas (LGMD), incluyendo distrofia muscular de cinturas R1 relacionada con calpaína 3, también conocida como LGMDR1.

Antecedentes

10 La distrofia muscular (MD) se refiere a un grupo de enfermedades musculares caracterizadas por debilidad musculoesquelética progresiva, defectos en las proteínas musculares, y la muerte de tejidos y células musculares. Diferentes enfermedades, incluyendo de Duchenne, de Becker, de cinturas, congénita, facioescapulohumeral, miotónica, oculofaríngea, distal, y de Emery-Dreifuss, se clasifican siempre como MD, pero hay más de cien enfermedades en total con similitudes con la MD.

15 La mayoría de los tipos de MD son trastornos multisistémicos con manifestaciones en aparatos y sistemas incluyendo el corazón, los sistemas gastrointestinal y nervioso, las glándulas endocrinas, la piel, los ojos, e incluso el cerebro. La afección también puede conducir a cambios de humor y dificultades de aprendizaje. Los síntomas comienzan habitualmente durante las dos primeras décadas de vida y la enfermedad empeora gradualmente, dando lugar a menudo a la pérdida de la capacidad para caminar 10 ó 20 años después del inicio. Posteriormente, la degeneración muscular progresa convirtiéndose en una enfermedad altamente incapacitante que impide que los
20 pacientes realicen tareas diarias sencillas.

En Datta *et al.* (Current Neurology and Neuroscience Reports, 2020, 20:14) se describe una visión general de las distrofias musculares. Históricamente, estos trastornos se consideran difíciles de tratar. Sin embargo, en las últimas tres décadas, se han realizado muchos esfuerzos en el desarrollo de tratamientos y biomarcadores novedosos en el ámbito de distrofias musculares habitualmente encontradas en la población pediátrica.

25 Entre las enfermedades de distrofia muscular, Walton y Natrass propusieron por primera vez en 1954 la distrofia muscular de cinturas (LGMD) como parte de una clasificación de distrofias musculares. La LGMD se caracteriza por debilidad y atrofia simétrica progresiva de los músculos de las extremidades proximales y por creatina cinasa sérica elevada. Las biopsias musculares demuestran lesiones distróficas y los electromiogramas muestran características miopáticas.

30 Se han propuesto diferentes estrategias terapéuticas para LGMD (Current Neurology and Neuroscience Reports, 2020, 20:14), tales como el uso de corticosteroides (prednisona, deflazacort), antioxidantes (el flavonoide del cacao epicatequina y el poliofenol del té verde galato de epigallocatequina), agentes antifibróticos (CoQ10 y lisinopril), antimiotatina, terapias basadas en genes, y oligonucleótidos antisentido. Sin embargo, no hay terapia médica de referencia para las LGMD y no hay biomarcadores específicos para el diagnóstico distintos de las pruebas
35 genéticas.

Existen varios tipos de LGMD, incluyendo la distrofia muscular de cinturas R1 relacionada con calpaína 3, también conocida como LGMDR1, LGMD2A o calpainopatía. Este tipo es una distrofia muscular autosómica recesiva debida a mutaciones en el gen CAPN3 que provoca la degeneración progresiva de los músculos proximales de la cintura pélvica y escapular.

40 La homeostasis correcta entre la síntesis y la degradación de proteínas en la fibra muscular es clave para mantener el músculo y, por tanto, para evitar la debilidad y la atrofia musculares (Scicchitano *et al.*, 2018). Con este fin, existen determinadas rutas de señalización, tales como la ruta de Akt/mTOR, que estimula la síntesis de proteínas y el crecimiento de miofibras e inhibe la degradación de proteínas (Glass, 2005). La ruta de ERK1/2 MAPK, que controla el crecimiento y la diferenciación de células musculares, también está implicada en el mantenimiento de las
45 miofibras en adultos (Jones *et al.*, 2001; Roux *et al.*, 2004; Seaberg *et al.*, 2015). Finalmente, entre otras rutas, la señalización de Wnt participa en la diferenciación durante el desarrollo muscular y en la regeneración de la fibra muscular en adultos (von Maltzahn *et al.*, 2012).

Según Jaka *et al.* (Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19, 1-16), se usan dos métodos para activar la ruta de señalización de Wnt: el silenciamiento genético de FRZB y la administración de LiCl. Ambos enfoques han
50 producido un aumento de los niveles de integrina β 1D que están regulados por disminución en los miotubos de los pacientes.

La regulación de la expresión de FRZB se propone como posible diana terapéutica dado que estudios *in vitro* respaldan la idea de que puede ser posible llevar la expresión y la fosforilación de diversas proteínas de vuelta a niveles apropiados en pacientes con LGMDR1. Específicamente, el silenciamiento de este gen ha provocado que la
55 integrina β 1D vuelva a niveles normales en miotubos de pacientes con LGMD2A. Además, puesto que se sabía que

FRBZ regula la localización de β -catenina aguas abajo de la ruta de Wnt, se propone que FRBZ puede desempeñar un papel en la interferencia entre la integrina y la ruta de señalización de Wnt.

Por otro lado, el tratamiento con LiCl, aunque con algunas diferencias, produjo resultados similares a los obtenidos mediante siFRBZ, observando niveles de expresión más bajos del gen FRBZ, así como niveles más altos de la isoforma adulta β 1D de la integrina en miotubos primarios. Debido a su papel activador en la ruta de señalización de Wnt, determinados estudios mostraron resultados *in vitro* beneficiosos (Du *et al.* 2009, Yang *et al.* 2011, Abu-Baker *et al.* 2013, Jaka *et al.* 2017). Sin embargo, la participación del litio sólo se ha mostrado en la ruta de señalización de Wnt, pero no en otras rutas de señalización implicadas en el desarrollo de LGMDR1. Además, se menciona que el tratamiento con LiCl está asociado con un efecto inhibitorio sobre GSK3 β .

De hecho, cuando la ruta de señalización de Wnt está activa, los ligandos de Wnt inducen la inactivación de GSK3 β impidiendo la fosforilación de β -catenina, permitiendo su acumulación en el citoplasma y su translocación al núcleo donde actúa como factor de transcripción. Por el contrario, cuando la ruta de señalización de Wnt está inactiva, se activa GSK3 β . Fosforila la β -catenina de modo que se degrada posteriormente (MacDonald *et al.*, 2009).

Kurgan *et al.* (Cells, 2019, 8, 134) dan a conocer que una dosis terapéutica baja de litio (0,5 mM) ha mostrado que inhibe GSK3 y aumenta la fusión de mioblastos, lo que sugiere que la dosis no tóxica de litio podría ser una opción eficaz para fomentar el desarrollo muscular *in vivo*. Sin embargo, no se mencionan enfermedades particulares en este documento, sino algunas indicaciones con respecto al uso de litio para atenuar potencialmente parte de la atrofia muscular observada en diferentes afecciones.

Whitley *et al.* (Physiological Reports, 2020, 8(14): e14517) también notifican que la dosis baja del tratamiento con LiCl es eficaz en la inhibición de GSK3 β y potencia la resistencia a la fatiga en algunos músculos a través de la activación de NFAT.

Por otro lado, el compuesto conocido como VP0.7 es un modulador alostérico y altamente selectivo de GSK3 que inhibe de manera reversible esta cinasa (Luna-Medina *et al.*, Journal of Neuroscience, 2007, 27(21), 5766-5776; Palomo *et al.*, J. Medicinal Chemistry, 2011, 54(24), 8461-8470). Se ha mostrado que este compuesto y un derivado del mismo son activos en modelos preclínicos de síndrome del cromosoma X frágil (Franklin *et al.*, Biological Psychiatry, 2014, 75,198-206) y esclerosis múltiple (Beurel *et al.*, J. Immunology, 2013, 190:5000-11). VP0.7 también se ha usado, entre otros muchos inhibidores de GSK3, en formulaciones para facilitar o expandir la generación de células tisulares en una población de células madre (documento US2017/0252449, documento WO2018/191350 y documento WO2020/081838). Se ha notificado que un derivado de este compuesto corrige la miogénesis retardada en mioblastos de pacientes con distrofia miotónica congénita de tipo I (CDM1) (Palomo *et al.*, J. Medicinal Chemistry, 2017, 60(12), 4983-5001).

En vista de todo lo anterior, no existen terapias eficaces para el tratamiento de la distrofia muscular de cinturas, y más particularmente la distrofia muscular de cinturas R1 relacionada con calpaína 3 (LGMDR1). De hecho, el mecanismo fisiopatológico por el cual la ausencia de calpaína 3 provoca la atrofia en los músculos no está claro. Por tanto, existe una gran necesidad de conocer las alteraciones en las expresiones de proteínas implicadas en las rutas de señalización, tales como Wnt y mTOR, de los músculos de pacientes con LGMDR1, y buscar nuevos agentes terapéuticos para tratar esta enfermedad.

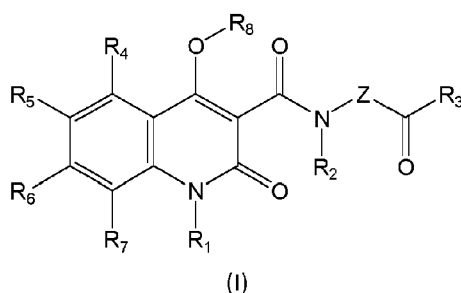
Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han hallado que algunas 1,2-dihidroquinolin-2-onas, tales como VP0.7, restablecen la expresión y la fosforilación de proteínas clave implicadas en rutas de señalización que regulan la homeostasis muscular, tanto la ruta de Wnt como la ruta de mTOR, y que se reducen significativamente en los músculos de pacientes con LGMDR1, abriendo así el uso potencial de dichos compuestos como opción terapéutica en el tratamiento de dicha enfermedad.

Concretamente, los resultados obtenidos por los inventores han permitido establecer que hay una reducción de la β -catenina activa en el músculo de dichos pacientes, lo que confirma que la ruta de Wnt está alterada. Además de eso, también se ha observado la alteración de la ruta de señalización de mTOR en el músculo de pacientes con LGMDR1 debido a la cantidad reducida de la proteína mTOR y su fosforilación.

Mediante la administración de los compuestos de la invención en miotubos de pacientes con LGMDR1, se ha observado una inhibición completa de GSK3 β que condujo a un aumento de la cantidad de β -catenina y a una activación de la ruta de mTOR. El restablecimiento de dichas rutas respalda el beneficio potencial de dichas 1,2-dihidroquinolin-2-onas para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de pacientes con LGMDR1. Además, algunos experimentos han señalado que el tratamiento con dichos compuestos no afecta a otros tejidos evitando efectos adversos no deseados.

Por tanto, el aspecto principal de la presente invención se refiere a compuestos de 1,2-dihidroquinolin-2-ona de fórmula (I):



en donde:

R₁ se selecciona de H, un grupo alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido y un grupo alquenilo C₂-C₅ opcionalmente sustituido;

5 R₂ es H o un grupo alquilo C₁-C₆;

R₃ es un grupo alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;

R₄-R₇ se seleccionan independientemente de H, halógeno, un grupo alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido y -OR₉, en donde R₉ es hidrógeno o un alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido;

R₈ se selecciona de H y un grupo alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido;

10 Z se selecciona de -NR₁₀- y un fenileno opcionalmente sustituido, en donde R₁₀ se selecciona de H y un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido;

o a una sal o a un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos,

para su uso en el tratamiento de distrofia muscular de cinturas.

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1. Cuantificación de proteínas de la ruta de Wnt y Akt/mTOR mediante inmunotransferencia de tipo Western en músculo de pacientes de control y con LGMDR1. A) Cuantificación de proteínas de la ruta de Wnt: β-catenina, β-catenina activa, GSK3β y P-GSK3β (Ser9). B) Cuantificación de proteínas de la ruta de Akt/mTOR: mTOR y P-mTOR (Ser2448). C) Detección de p70S6K, P-p70S6K (Thr421/Ser424), P-p70S6K (Thr389), P-RPS6 (Ser235/Ser236) y AMPK. Control de carga: GAPDH.

20 Figura 2. Activación de la ruta de Wnt en miotubos humanos el día 8 de diferenciación y después de 48 h de tratamiento con VP0.7 a una concentración de 1,2 μM en pacientes de control y con LGMDR1. A) Inmunotransferencia de tipo Western de GSK3β, P-GSK3β (Ser9) y β-catenina total. B) Inmunotransferencia de tipo Western de β-catenina activa. C) Inmunotransferencia de tipo Western de β-catenina activa después de la administración de LiCl. D) Expresión de los genes CAPN3, FOS, ANOS1 e ITGB1BP2 en miotubos de LGMDR1. E) Inmunotransferencia de tipo Western de las proteínas estructurales integrina β1D y melusina.

Figura 3. Activación de la ruta de Akt/mTOR en miotubos humanos el día 8 de diferenciación y después de 48 h de tratamiento con VP0.7 a una concentración de 1,2 μM en pacientes de control y con LGMDR1. A) Inmunotransferencia de tipo Western de mTOR y P-mTOR (Ser2448 y Ser2481). B) Inmunotransferencia de tipo Western de p70S6K, P-p70S6K (Thr421/Ser424), P-p70S6K (Thr389), P-RPS6 (Ser235/Ser236) y P-AMPK (Thr172).

Figura 4. Análisis de la ruta de Akt/mTOR en miotubos humanos después del tratamiento con LiCl a una concentración de 10 mM en pacientes de control y con LGMDR1. Resultados de densitometría de la inmunotransferencia de tipo Western de las formas fosforiladas de las proteínas p70S6K y RPS6. Blanco: muestras de control sin tratamiento. Gris: muestras de LGMDR1 sin tratamiento. Negro: tratamiento con LiCl.

35 Figura 5. Análisis del efecto sobre la expresión de proteínas en fibroblastos tras el tratamiento con VP0.7. A) Inmunotransferencia de tipo Western de β-catenina y su forma activada. B) Inmunotransferencia de tipo Western de p-GSK3β y P-RPS6.

Figura 6. Análisis del efecto sobre la expresión de proteínas en células CD56 tras el tratamiento con VP0.7. A) Inmunotransferencia de tipo Western de β-catenina y su forma activada. B) Inmunotransferencia de tipo Western de mTOR, p70S6K y P-RPS6.

40

Descripción detallada de la invención

En la definición anterior de los compuestos de fórmula (I), los siguientes términos tienen el significado indicado:

- 5 “Alquilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene ninguna insaturación, que tiene de uno a veinte átomos de carbono (C_1-C_{20}), o de uno a doce átomos de carbono (C_1-C_{12}), o de uno a seis átomos de carbono (C_1-C_6) o de uno a cuatro átomos de carbono (C_1-C_4), más preferiblemente de uno a tres átomos de carbono (alquilo C_1-C_3), incluso más preferiblemente de uno a dos átomos de carbono (alquilo C_1-C_2), y que está unido a la parte restante de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, cicloalquilo y arilo.
- 10 “Alquenilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno que tiene al menos un doble enlace, y desde 2 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente que tiene 2, 3 ó 4 átomos de carbono. En una realización preferida, se refieren a hidrocarburos lineales que tienen un único doble enlace, y desde 2 hasta 6 átomos de carbono, preferiblemente 2 ó 3 átomos de carbono. Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino y nitro.
- 15 “Arilo” se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 18 átomos de carbono, preferiblemente entre 6 y 12 átomos de carbono, más preferiblemente entre 6 y 10 e incluso más preferiblemente que tiene 6 átomos de carbono, que comprende 1, 2 ó 3 núcleos aromáticos, incluyendo, por ejemplo y en un sentido no limitativo, fenilo, bifenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo, antracilo o terfenilo. Preferiblemente, arilo se refiere a fenilo (Ph) o naftilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como hidroxilo, mercapto, halógeno, alquilo, fenilo, alcoxilo, haloalquilo, aralquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo y alcocarbonilo, tal como se define en el presente documento. El grupo arilo también puede estar condensado con otro anillo no aromático, tal como un cicloalquilo o un heterociclilo.
- 20 “Cicloalquilo” se refiere a un grupo alifático monocíclico o bicíclico saturado o parcialmente saturado que tiene entre 3 y 10, preferiblemente entre 3 y 6 átomos de carbono (“cicloalquilo C_3-C_6 ”), que está unido a la parte restante de la molécula por medio de un enlace sencillo, incluyendo, por ejemplo y en un sentido no limitativo, ciclopropilo, ciclohexilo o ciclopentilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, se pretende que el término “cicloalquilo” incluya radicales cicloalquilo que están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes tales como alquilo, halo, hidroxilo, amino, ciano, nitro, alcoxilo, carboxilo y alcocarbonilo.
- 25 “Halógeno” se refiere a bromo, cloro, yodo o fluro.
- 30 “Carboxilo” se refiere a un radical de fórmula $-C(O)OH$.
- “Alcoxilo” se refiere a un radical de fórmula $-OR_a$, en donde R_a es un radical alquilo tal como se definió anteriormente, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, etc.
- 35 “Alcocarbonilo” se refiere a un radical de fórmula $-C(O)OR_a$, en donde R_a es un radical alquilo tal como se definió anteriormente, por ejemplo, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, etc.
- “Amino” se refiere a un radical de fórmula $-NH_2$, $-NHR_a$ o $-NR_aR_b$, en donde R_a y R_b son radicales alquilo tal como se definieron anteriormente.
- 40 “Acilo” se refiere a un radical de fórmula $-C(O)-R_c$ y $-C(O)-R_d$, en donde R_c es un radical alquilo tal como se definió anteriormente y R_d es un radical arilo tal como se definió anteriormente, por ejemplo, acetilo, propionilo, benzoílo, y similares.
- “Fenileno” se refiere a un birradical $-(C_6H_4)-$ que puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como hidroxilo, mercapto, halógeno, alquilo, alcoxilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo y alcocarbonilo, tal como se define en el presente documento. El grupo fenileno también puede estar condensado con otro anillo aromático o no aromático, tal como un cicloalquilo o un heterociclilo.
- 45 El término “sales o solvatos farmacéuticamente aceptables” se refiere a cualquier sal o solvato farmacéuticamente aceptable que, tras la administración al receptor, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto tal como se describe en el presente documento. La preparación de sales y solvatos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.
- 50 Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos usados en la presente invención se sintetizan a partir del compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos.

Los compuestos usados en la presente invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como

solvatos (por ejemplo, hidratos). Los métodos de solvatación se conocen generalmente en la técnica. En una realización particular, el solvato es un hidrato.

5 Los compuestos de fórmula (I), o sus sales o solvatos, se usan preferiblemente en forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otras cosas, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y sin incluir ningún material considerado como tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo están preferiblemente por encima del 50 %, más preferiblemente por encima del 70 %, lo más preferiblemente por encima del 90 %. En una realización preferida, está por encima del 95 % del compuesto de fórmula (I), o de sus sales o solvatos.

10 Los compuestos usados en la presente invención representados por la fórmula (I) descrita anteriormente pueden incluir enantiómeros dependiendo de la presencia de centros quirales o isómeros dependiendo de la presencia de múltiples enlaces (por ejemplo, Z, E). En la presente invención pueden usarse isómeros, enantiómeros o diaestereoisómeros individuales, y mezclas de los mismos.

15 En una realización preferida, R₁ es H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado opcionalmente sustituido con un grupo arilo o cicloalquilo, o un grupo alqueno C₂-C₅ no sustituido. Más preferiblemente, R₁ es H, un alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado no sustituido, incluso más preferiblemente R₁ es un alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado no sustituido.

20 Sustituyentes representativos que pueden usarse como R₁ son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-hexilo, -CH₂-fenilo, -CH₂-ciclopropilo e isoprenilo. Más preferiblemente, R₁ es metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, -CH₂-fenilo, -CH₂-ciclopropilo o isoprenilo. Incluso más preferiblemente, R₁ es etilo.

En otra realización preferida, R₂ es H o un grupo alquilo C₁-C₃ no sustituido, más preferiblemente es H.

En otra realización preferida, R₃ es un grupo alquilo C₁-C₂₀ no sustituido, más preferiblemente un grupo alquilo C₄-C₁₅ no sustituido, incluso más preferiblemente un grupo alquilo C₄-C₁₂ no sustituido. Lo más preferiblemente, R₃ es un grupo alquilo C₁₁ no sustituido.

25 En otra realización preferida, R₄, R₅, R₆ y R₇ se seleccionan independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido y -OR₉, en donde R₉ se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.

Más preferiblemente, R₄, R₅, R₆, y R₇ se seleccionan independientemente de H, alquilo C₁-C₄ no sustituido, halógeno e hidroxilo. Incluso más preferiblemente, R₄, R₅, R₆, y R₇ se seleccionan independientemente de H y halógeno.

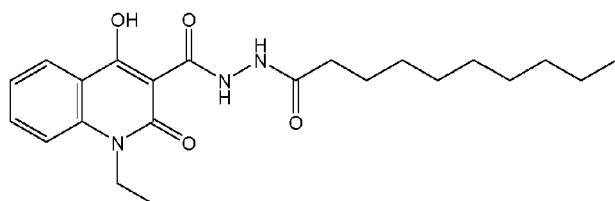
30 Los más preferidos son compuestos en donde R₄-R₇ son H.

En otra realización preferida, Z se selecciona de -NR₁₀- y un fenileno no sustituido, en donde R₁₀ es H o una cadena de alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituida con fenilo. Más preferiblemente, Z se selecciona de -NH- y un fenileno no sustituido, incluso más preferiblemente Z es -NH-.

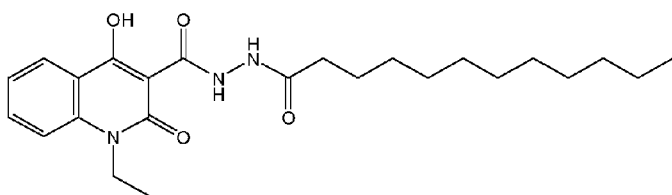
En otra realización preferida:

- 35 - R₁ es un grupo alquilo C₁-C₆ no sustituido;
 - R₂ es H;
 - R₃ es un grupo alquilo C₄-C₁₅ lineal no sustituido;
 - R₄-R₇ se seleccionan independientemente de H y halógeno;
 - Z se selecciona de -NH- y fenileno no sustituido.

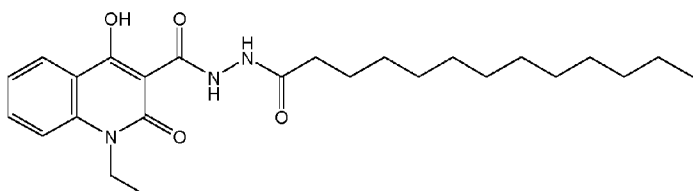
40 Compuestos de fórmula (I) representativos son los siguientes:



N'-decanoil-1-etil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida

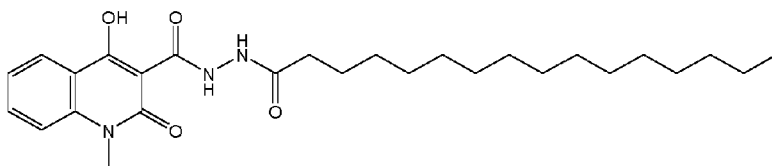


N'-dodecanoil-1-etil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida

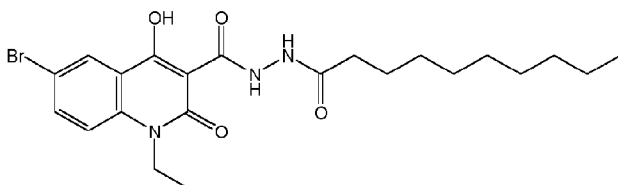


N'-tridecanoil-1-etil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida

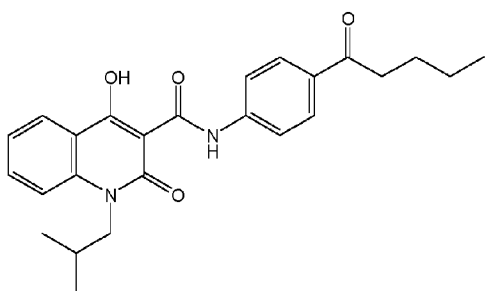
5



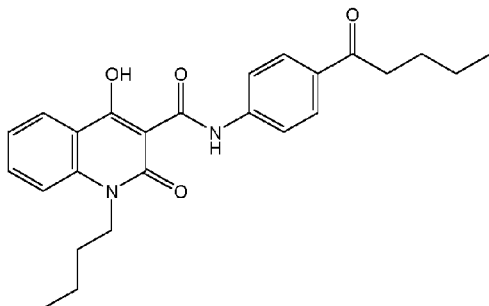
N'-hexadecanoil-1-metil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida



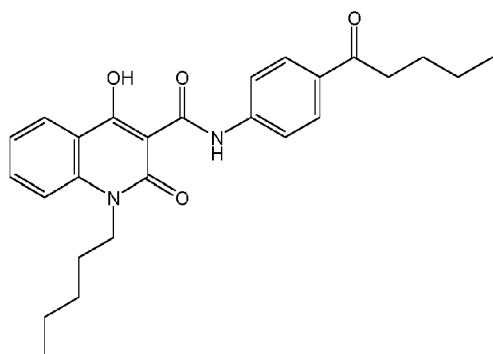
N'-decanoil-6-bromo-1-etil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidro-quinolin-3-carbohidrazida



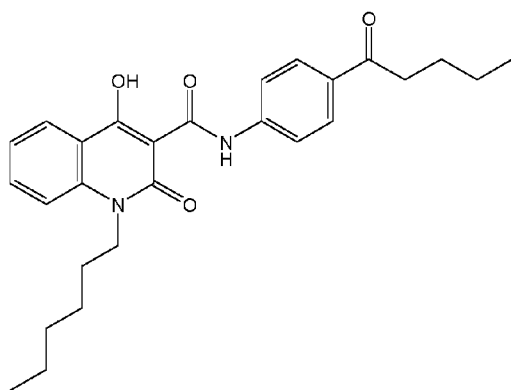
10 (4-pentanoil-fenil)-amida de ácido 4-hidroxi-1-isobutil-2-oxo-1,2-dihidro-quinolin-3-carboxílico



(4-pentanoil-fenil)-amida de ácido 1-butil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidro-quinolin-3-carboxílico

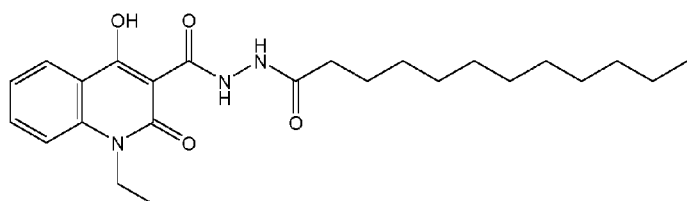


(4-pentanoil-fenil)-amida de ácido 4-hidroxi-2-oxo-1-pentil-1,2-dihidro-quinolin-3-carboxílico



(4-pentanoil-fenil)-amida de ácido 1-hexil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidro-quinolin-3-carboxílico

5 El compuesto de fórmula (I) más preferido es:



N'-dodecanoil-1-etil-4-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-carbohidrazida, también conocido como VP0.7.

10 Los compuestos de fórmula (I) definidos anteriormente y usados en la presente invención pueden obtenerse mediante procedimientos de síntesis disponibles. Algunos ejemplos de estos procedimientos se describen en el documento EP2769720.

La presente invención también se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) definidos anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de distrofia muscular de cinturas.

15 Adicionalmente, la invención también se refiere a un método para el tratamiento de distrofia muscular de cinturas que comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) tal como se definió anteriormente, o de una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, a un paciente que lo necesita.

En una realización particular, la distrofia muscular de cinturas incluye tanto distrofias musculares de cinturas recesivas (LGMD R) como distrofias musculares de cinturas dominantes (LGMD D).

20 Dentro de esta realización particular, las distrofias musculares de cinturas recesivas se seleccionan de LGMD R1 relacionada con calpaína 3 (LGMDR1 o calpainopatía), LGMD R2 relacionada con disferlina (LGMDR2), LGMD R3 relacionada con α -sarcoglicano (LGMDR3), LGMD R4 relacionada con β -sarcoglicano (LGMDR4), LGMD R5 relacionada con γ -sarcoglicano (LGMDR5), LGMD R6 relacionada con δ -sarcoglicano (LGMDR6), LGMD R7 relacionada con teletonina (LGMDR7), LGMD R8 relacionada con TRIM 32 (LGMDR8), LGMD R9 relacionada con FKRP (LGMDR9), LGMD R10 relacionada con titina (LGMDR10), LGMD R11 relacionada con POMT1 (LGMDR11), LGMD R12 relacionada con anoctamina 5 (LGMDR12), LGMD R13 relacionada con fukutina (LGMDR13), LGMD R14 relacionada con POMT2 (LGMDR14), LGMD R15 relacionada con POMGnT1 (LGMDR15), LGMD R16 relacionada con α -dystroglicano (LGMDR16), LGMD R17 relacionada con plectina (LGMDR17), LGMD R18

relacionada con TRAPPC11 (LGMDR18), LGMD R19 relacionada con GMPPB (LGMDR19), LGMD R20 relacionada con ISPD (LGMDR20), LGMD R21 relacionada con POGLUT1 (LGMDR21), LGMD R22 relacionada con colágeno 6 (LGMDR22), LGMD R23 relacionada con laminina α 2 (LGMDR23), y LGMD R24 relacionada con POMGNT2 (LGMDR24).

- 5 Dentro de dicha realización particular, las distrofias musculares de cinturas dominantes se seleccionan de LGMD D1 relacionada con DNAJB6 (LGMD D1), LGMD D2 relacionada con TNP03 (LGMD D2), LGMD D3 relacionada con HNRNPDL (LGMD D3), LGMD D4 relacionada con calpaína 3 (LGMD D4), y LGMD D5 relacionada con colágeno 6 (LGMD D5).

10 Los diferentes tipos de distrofias musculares de cinturas que se han citado son según la nueva nomenclatura acordada en la 229^o Seminario Internacional del ENMC (Neuromuscular Disorders, 2018, 28, 702-710). Esta clasificación sigue la fórmula: LGMD, herencia (R para recesiva y D para dominante), orden de descubrimiento (número) y proteína afectada. En una realización preferida, la distrofia muscular de cinturas es distrofia muscular de cinturas R1 relacionada con calpaína 3, también denominada LGMDR1 o calpainopatía.

15 Los términos “tratar” y “tratamiento”, tal como se usan en el presente documento, significan revertir, aliviar, inhibir el progreso de, la enfermedad o afección a la que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal enfermedad o afección, tal como reducir la carga viral en un paciente con respecto a niveles previos al tratamiento.

El término “sujeto” se refiere a un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

20 En particular, los compuestos para su uso según la invención se administran como composición farmacéutica, que comprende el compuesto de fórmula (I) activo correspondiente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 El término “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo, diluyente, o adyuvante que se administra con el principio activo. Tales excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal, o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. Como vehículos se usan preferiblemente agua o disoluciones acuosas salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables. El experto en la técnica conoce vehículos farmacéuticos adecuados. El excipiente farmacéuticamente aceptable necesario para fabricar la composición farmacéutica deseada de la invención dependerá, entre otros factores, de la vía de administración elegida. Dichas composiciones farmacéuticas pueden fabricarse según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica.

30 Los compuestos para su uso según la invención pueden administrarse en una “cantidad terapéuticamente eficaz”, es decir, una cantidad no tóxica, pero suficiente, del compuesto correspondiente para proporcionar el efecto deseado. La cantidad que es “eficaz” variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, del compuesto particular administrado, y similares. Sin embargo, una cantidad apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina.

35 Los compuestos para su uso según la invención pueden administrarse mediante cualquier vía (ruta) apropiada, tal como oral (por ejemplo, oral, sublingual, etc.) o parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intravenosa, etc.).

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral o parenteral.

40 En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas están en forma oral. Formas de dosis adecuadas para administración oral pueden ser comprimidos y cápsulas y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol, o glicina; lubricantes para compresión, por ejemplo, estearato de magnesio; disgregantes, por ejemplo, almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón, o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato de sodio.

45 Las composiciones orales sólidas pueden prepararse mediante métodos convencionales de mezclado, relleno o compresión. Pueden usarse operaciones de mezclado repetidas para distribuir el agente activo en todas esas composiciones empleando grandes cantidades de cargas. Tales operaciones son convencionales en la técnica. Por ejemplo, los comprimidos pueden prepararse mediante granulación en húmedo o en seco y opcionalmente recubrirse según métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal, en particular con un recubrimiento entérico.

50 Las composiciones farmacéuticas también pueden adaptarse para administración parenteral, tales como disoluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles en la forma de dosificación unitaria apropiada. Pueden usarse excipientes adecuados, tales como agentes de carga, agentes de tamponamiento, o tensioactivos.

Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos convencionales tales como aquellos que se describen o a los que se hace referencia en las Farmacopeas de Europa y de los EE. UU. y en textos de referencia similares.

5 Los compuestos para su uso según la invención se administrarán normalmente una vez o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, con dosis diarias totales típicas que dependen del compuesto particular y de la gravedad de la enfermedad, y pueden determinarse fácilmente por el médico experto.

A modo de ejemplo, las dosis diarias totales típicas de los compuestos de la invención están en el intervalo de desde 0,1 hasta 1000 mg/día, preferiblemente desde 1 hasta 600 mg/día, incluso más preferiblemente desde 1 hasta 100 mg/día.

10 Los compuestos y las composiciones para su uso según la invención pueden administrarse como único principio activo, o en combinación con otros principios activos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros principios activos pueden formar parte de la misma composición, o pueden proporcionarse como composición independiente para la administración en el mismo momento o en un momento diferente.

15 En una realización particular, los compuestos de la invención se usan en combinación con uno o más compuestos útiles en el tratamiento de distrofia muscular de cinturas, más preferiblemente calpainopatía o distrofia muscular de cinturas R1 relacionada con calpaína 3 (LGMDR1).

20 El término "combinación" se refiere a un producto que comprende uno o más de los compuestos definidos, o bien en una única composición o bien en varias composiciones (o unidades), en cuyo caso los compuestos correspondientes se distribuyen entre las varias composiciones. Preferiblemente, la combinación se refiere a varias composiciones, en particular comprendiendo una composición (o unidad) por compuesto (compuesto tal como se definió anteriormente) de la combinación. La expresión "uno o más" cuando se caracteriza la combinación se refiere a al menos uno, preferiblemente 1, 2, 3, 4 ó 5 compuestos, más preferiblemente 1, 2 ó 3 compuestos, incluso más preferiblemente 1 ó 2 compuestos.

25 Cuando la combinación está en forma de una única composición, los compuestos presentes en la combinación se administran siempre de manera simultánea.

Cuando la combinación está en forma de varias composiciones (o unidades), teniendo cada una de las mismas al menos uno de los compuestos de la combinación, las composiciones o (unidades) pueden administrarse de manera simultánea, secuencial o por separado.

30 Administración simultánea significa que los compuestos o las composiciones (o unidades) se administran en el mismo momento.

Administración secuencial significa que los compuestos o las composiciones (o unidades) se administran en puntos de tiempo diferentes de una manera cronológicamente escalonada.

Administración por separado significa que los compuestos o las composiciones (o unidades) se administran en puntos de tiempo diferentes independientemente entre sí.

35 En particular, las combinaciones para su uso según la invención se administran como composiciones farmacéuticas, que comprenden los compuestos (activos) correspondientes y un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se definió previamente.

40 Las combinaciones para su uso según la invención se administrarán normalmente una vez o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, con dosis diarias totales típicas que dependen del compuesto particular y de la gravedad de la enfermedad, y pueden determinarse fácilmente por el médico experto.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren adicionalmente la invención. No deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y métodos

45 *Muestras de biopsia muscular y cultivo celular primario*

Todos los participantes dieron su consentimiento informado para la recogida de muestras (tabla 1 a continuación). Se obtuvieron muestras de músculo proximal (cuádriceps, deltoides, bíceps y tríceps) de controles sanos y pacientes con LGMDR1, en los que el diagnóstico se confirmó genéticamente mediante la identificación de las dos mutaciones en el gen calpaína 3. Se usó una fracción de las biopsias para obtener proteína, y la otra para obtener mioblastos.

ES 3 028 375 T3

Número de biopsia	Estado	Sexo	Muestra (tejido)	Edad (años)	Estado funcional	Mutaciones en el gen CAPN3	
						Mutación n.º 1	Mutación n.º 2
Muestras de músculos							
27	Control	Masculino	Cuádriceps	50	-	-	-
31	Control	Masculino	Cuádriceps	46	-	-	-
33	Control	Masculino	Deltoides	51	-	-	-
38	Control	Masculino	Cuádriceps	31	-	-	-
39	Control	Masculino	Cuádriceps	41	-	-	-
42	Control	Femenino	Cuádriceps	42	-	-	-
05	LGMDR1	Masculino	Deltoides	13	Asintomático	p.(Arg788SerfsX14)	p.(Arg788SerfsX14)
09	LGMDR1	Femenino	Bíceps	14	Asintomático	p.(Arg490Trp)	p.(Gly691TrpfsX7)
07-109	LGMDR1	Masculino	*	*	Asintomático	p.(Arg696Gly)	p.(Arg748Glu)
36	LGMDR1	Masculino	Cuádriceps	26	Paciente ambulatorio	p.(Lys254Glu)	p.(Pro637HisfsX25)
B10-61	LGMDR1	Femenino	Cuádriceps	23	Paciente ambulatorio	p.(Pro22Glnfs*35)	p.(Lys211_Glu323del)
B09-26	LGMDR1	Femenino	Cuádriceps	48	Paciente no ambulatorio	p.(Arg489Tyr)	p.(Arg788Ser)
97-114	LGMDR1	Masculino	Deltoides	49	Paciente ambulatorio	p.(Pro637HisfsX25)	p.(Asp665LeufsX18)
97-168	LGMDR1	Masculino	*	*	Paciente ambulatorio	p.(Ser479Gly)	p.(Asp665LeufsX18)
97-169	LGMDR1	Masculino	Deltoides	51	Paciente ambulatorio	p.(Ser479Gly)	p.(Asp665LeufsX18)
Muestras de mioblastos							
09-23	Control	Masculino	Triceps	26	-	-	-
10-36	Control	Masculino	Bíceps	23	-	-	-
13-05	Control	Masculino	Cuádriceps	14	-	-	-
13-07	Control	Femenino	Bíceps	36	-	-	-
15-12	Control	Masculino	Deltoides	36	-	-	-
09-21	LGMDR1	Masculino	Bíceps	19	Paciente ambulatorio	p.(His690ArgfsX9)	p.(His690ArgfsX9)
09-24	LGMDR1	Femenino	Deltoides	47	Paciente no ambulatorio	p.(Arg788SerfsX14)	p.(Lys595ValfsX70)
09-25	LGMDR1	Masculino	Deltoides	28	Paciente ambulatorio	p.(Lys254Glu)	p.(Pro637HisfsX25)
10-39	LGMDR1	Masculino	Deltoides	29	Paciente no ambulatorio	p.(Lys254del)	p.(X622Leuext62X)
Muestras de fibroblastos cutáneos							
F-08-19	Control	Femenino	Piel	52	-	-	-
F-08-21	Control	Masculino	Piel	49	-	-	-
F-08-30	Control	Femenino	Piel	31	-	-	-
F-09-26	LGMDR1	Femenino	Piel	49	No ambulatorio	p.(Arg489Tyr)	p.(Arg788Ser)
F-09-50	LGMDR1	Femenino	Piel	57	No ambulatorio	p.(Arg788SerfsX14)	p.(Leu212_Val344delfs*)
F-17-28	LGMDR1	Masculino	Piel	29	Ambulatorio	p.(Lys254del)	p.(Arg490Trp)

Tabla I. Tabla S1. Información sobre las muestras de músculos y mioblastos de controles sanos y pacientes con LGMDR1. * = Información no disponible.

Para obtener mioblastos primarios, se procesaron biopsias musculares y se cultivaron en monocapa según el método descrito por Askanas (Neurology, 1975, 25, 58-67). Para aislar la población pura de mioblastos y células negativas para CD56 (CD56⁻), se usó el protocolo descrito previamente (Jaka *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19, e2), usando separación inmunomagnética basada en la presencia temprana del marcador de superficie CD56 (Miltenyi Biotec, 130-050-401).

Se cultivaron mioblastos en medio de proliferación (DMEM, M-199, insulina, glutamina y penicilina-estreptomicina) con FBS al 10 % y factores de crecimiento a 37 °C en una incubadora de aire con el 5 % de CO₂. Cuando los mioblastos alcanzaron la confluencia, se redujo la concentración de FBS al 2 % y se retiraron los factores de crecimiento del medio, fomentando la fusión y producción de miotubos.

10 *Biopsias cutáneas y cultivo de fibroblastos*

La Dra. Ana Aiausti (Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia, Plataforma de Cultivos Celulares e Histología) proporcionó fibroblastos cutáneos de controles sanos y de pacientes con LGMDR1. Se cultivaron las células en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, 41966-029) complementado con FBS al 10 % (Gibco, 10270-106) y penicilina-estreptomicina al 1 % (Gibco, 15140-122) a 37 °C en una incubadora de aire con el 5 % de CO₂. Se cultivaron fibroblastos humanos a una densidad de 4×10⁴ células/ml.

Silenciamiento del gen FRZB

El silenciamiento del gen FRZB en miotubos humanos primarios se ha realizado usando ARN de interferencia tal como se describió previamente (Jaka *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19, e2). El ARNip para el silenciamiento del gen FRZB (s5369) y el ARNip usado como control negativo (AM4611) se obtuvieron de Life Technologies. Se transfectaron células sembradas a 24.000 células/cm² con el ARNip a una concentración de 5 nM usando reactivo de transfección RiboCellin (Eurobio) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 8 días de diferenciación, se incubaron miotubos primarios humanos con el ARNip correspondiente y el agente de transfección. Finalmente, se analizó el ARN obtenido a partir de estos cultivos 48 h después de la transfección mediante PCR cuantitativa en tiempo real. De manera similar, se analizaron proteínas procedentes de estos cultivos 72 h después de la transfección.

Administración de compuestos

La Dra. Ana Martínez (Centro para Investigación Biológica, CSIC) proporcionó VP0.7. Se administró a 1,2 μM, mientras que se usó LiCl (Sigma-Aldrich, L7026) con fines comparativos a una concentración final de 10 mM. Se administraron VP0.7 y LiCl a las concentraciones anteriormente mencionadas a miotubos a los ocho días de diferenciación, y VP0.7 también a fibroblastos cutáneos y a células CD56⁻. Los controles negativos, en el caso del VP0.7, se realizaron con DMSO (Fisher Scientific, BP-231). A las 48 horas después de la administración del fármaco, se extrajeron el ARN y las proteínas.

Extracción de ARN a partir de mioblastos/miotubos y biopsias musculares

La extracción de ARN a partir de mioblastos/miotubos primarios se realizó con un minikit RNeasy (Qiagen). En el caso de las biopsias musculares, que se ultracongelaron y se almacenaron a -80 °C hasta su uso, se obtuvo el ARN total usando un kit RNA-Plus (QBiogene).

PCR cuantitativa en tiempo real

Se sometió a transcripción inversa el ARN aislado para dar ADN complementario (ADNc) de primera cadena en un volumen final de 50 μl usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. Se evaluaron los niveles de expresión de los genes CAPN3, FOS, ITGB1BP2, ANOS1 y GAPDH en las muestras mediante PCR cuantitativa en tiempo real con sondas TaqMan (tabla II a continuación) usando el "sistema de detección por PCR en tiempo real CFX384" (Bio-Rad).

Gen y exón a los que se une la sonda	Código de la sonda
CAPN3 Ex1-2	Hs00181057_m1
FOS Ex1-2	Hs99999140_m1
ITGB1BP2 Ex4-5	Hs00183746_m1
ANOS1 Ex2-3	Hs01085107_m1
GAPDH Ex2	Hs99999905_m1

Tabla II. Sondas TaqMan.

Extracción de proteínas y análisis por inmunotransferencia de tipo Western

5 La recogida de proteínas procedentes de muestras musculares y cultivos celulares, así como el procedimiento de inmunotransferencia de tipo Western, se realizaron tal como se describió previamente (Jaka *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19, e2). Los anticuerpos usados se enumeran en la tabla III a continuación.

Anticuerpo primario	Proveedor	Referencia
GAPDH	Cell Signaling Technology	#2118
β -catenina	Santa Cruz Biotechnology	SC-7963
GSK-3 β	Cell Signaling Technology	#9315
Fosfo-GSK-3 β (Ser9)	Cell Signaling Technology	#9323
β -catenina activa	Millipore	05-665
Akt	Cell Signaling Technology	#9272
Fosfo-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology	#4060
mTOR	Cell Signaling Technology	#2983
Fosfo-mTOR (Ser2448) [Células]	Cell Signaling Technology	#2971
Fosfo-mTOR (Ser2448) [Músculo]	Cell Signaling Technology	#5536
Fosfo-mTOR (Ser2481)	Cell Signaling Technology	#2974
p70 S6 cinasa	Cell Signaling Technology	#2708
Fosfo-p70 S6 cinasa (Thr421/Ser424)	Cell Signaling Technology	#9204
Fosfo-p70 S6 cinasa (Thr389) [Células]	Cell Signaling Technology	#9205
Fosfo-p70 S6 cinasa (Thr389) [Músculo]	Cell Signaling Technology	#9234
Fosfo-proteína ribosómica S6 (Ser235/236)	Cell Signaling Technology	#2211
AMPK α	Cell Signaling Technology	#2532
Integrina β 1D	Millipore	MAB1900
Melusina	Abcam	SC-133780
Fosfo-AMPK α (Thr172)	Cell Signaling Technology	#2531
Anticuerpo secundario	Proveedor	Referencia
Anticuerpo anti-IgG de conejo, unido a HRP	Cell Signaling Technology	#7074
Anticuerpo anti-IgG de ratón, unido a HRP	DAKO	P0260

Tabla III. Lista de anticuerpos usados.

Ejemplo 1. Alteraciones en las rutas de Wnt y mTOR implicadas en LGMDR1*1. Alteración de la ruta de Wnt/ β -catenina en el músculo de pacientes con LGMDR1*

10 Estudios previos han descrito la sobreexpresión de FRZB, un antagonista de Wnt1, 5a, 8 y 9a, en el músculo de pacientes con LGMDR1 (Jaka *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19, e2). Debido a la inhibición excesiva de esta ruta, se ha analizado la expresión de algunas proteínas que participan en la ruta de Wnt.

Concretamente, se sometieron a prueba los niveles de GSK3 β y β -catenina total, aunque no se observaron

diferencias significativas entre pacientes y controles. Sin embargo, la forma activa de la β -catenina, así como la forma de fosforilación de GSK3 β (Ser9), mostraron una disminución drástica de estas proteínas en pacientes (figura 1A). Estos resultados han permitido establecer que en el músculo de pacientes con LGMDR1 hay una reducción de β -catenina activa, lo que confirma que la ruta de Wnt está alterada.

5 *2. Reducción de la activación de la ruta de mTOR en el músculo de pacientes con LGMDR1*

La expresión de mTOR, así como de su forma fosforilada en Ser2448, se redujeron mucho en el músculo de pacientes con LGMDR1 ($p=0,00159$; $p=0,00159$, respectivamente). La disminución de ambas formas puede observarse en pacientes pseudoasintomáticos y sintomáticos (figura 1B).

10 Posteriormente, se analizó la expresión de cinasas aguas abajo de esta ruta. p70S6K es una cinasa que participa en la ruta de mTOR y que se activa por fosforilaciones secuenciales (Pullen *et al.*, FEBS Letters, 1997, 410(1), 78-82; Fenton *et al.*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2011, 43(1), 47-59). Los resultados de la presente invención muestran que los niveles de su forma de fosforilación en los residuos Thr421/Thr424 (figura 1C) mostraron una disminución considerable. Aguas abajo, la cinasa p70S6K cataliza la fosforilación de la proteína ribosómica S6 (RPS6), cuya fosforilación se correlaciona con altos niveles de traducción y síntesis de proteínas (Nielsen *et al.* The Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(20), 12316-12321; Fenton *et al.*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2011, 43(1), 47-59). Al analizar la fosforilación de RPS6 (Ser235/Ser236), se halló una disminución estadísticamente significativa en el músculo de pacientes con LGMDR1 cuando se analizaron conjuntamente ($p = 0,03$, datos no mostrados, y figura 1C).

20 Por otro lado, sabiendo que la AMPK cinasa es un inhibidor de la ruta de mTOR (Du *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 368(2), 402-407; Hwang *et al.*, British Journal of Pharmacology, 2013, 169(1), 69-81), se analizó en el músculo de pacientes y se observó un aumento de la cantidad de esta cinasa en el grupo de pacientes ($p = 0,038$) (figura 1C).

25 Estos resultados señalan que, en el músculo de pacientes con LGMDR1, también están presentes alteraciones en la ruta de señalización de mTOR, ya que se han observado una gran disminución de la expresión de mTOR, su fosforilación, así como una reducción de la activación de proteínas aguas abajo de la ruta, lo que conduce a la desregulación del crecimiento de fibra muscular.

Ejemplo 2. Tratamiento *in vitro* con VP0.7

Se administró VP0.7 según el procedimiento mencionado anteriormente en diferentes tipos de células: miotubos primarios, fibroblastos cutáneos y células CD56. También se ha usado Li con fines comparativos.

30 El efecto sobre la respuesta para los fármacos administrados fue diferente dependiendo del tipo de célula tal como se muestra a continuación.

2.1. Activación de la ruta de Wnt en miotubos humanos y recuperación de la expresión génica desregulada en pacientes con LGMDR1

35 Se procedió a analizar la expresión de la proteína GSK3 β , así como su efecto aguas abajo sobre la ruta de Wnt en miotubos de controles y pacientes después de la administración del fármaco. La activación de la ruta de Wnt se confirmó mediante la inhibición eficaz de la cinasa GSK3 β , ya que se observó un aumento de la expresión de β -catenina total (figura 2A), así como de β -catenina activa (figura 2B), con VP0.7. Como ensayo de control, se administró litio y se verificó un aumento de β -catenina activa (figura 2C).

40 músculos proximales de la cintura pélvica y escapular.ue, activando la ruta de Wnt mediante silenciamiento del gen FRZB o tratamiento con litio, se recuperaba la expresión de algunos genes alterados en el músculo de pacientes (Jaka *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2017, 19, e2; Casas-Fraile *et al.*, Orphanet Journal of Rare Diseases, 2020, 15(1), 119). Por tanto, se analizó su expresión después de administrar VP0.7. Los resultados mostraron una correlación con el efecto generado por el silenciamiento del gen FRZB, es decir, un aumento de la expresión de CAPN3, FOS y ANOS1, y también se observó un aumento de ITGB1BP2 (figura 2D).

45 Asimismo, se analizó la expresión de algunas de las proteínas estructurales que forman parte del costámero, cuya expresión está alterada en pacientes con LGMDR1. Después de la administración del fármaco, también se observó un aumento de integrina β 1D y melusina (figura 2E).

2.2. Activación de la ruta de Akt/mTOR en miotubos de pacientes con LGMDR1

50 Después de la administración de VP0.7 en los miotubos de pacientes, no se observaron cambios significativos en mTOR total, pero hubo un aumento significativo de la fosforilación de mTOR en dos de sus residuos (Ser2448 y Ser2481) (figura 3A).

Además, aguas abajo de la ruta de mTOR, se analizaron las proteínas p70S6K y RPS6. Después de la administración de VP0.7, la expresión de p70S6K total, su fosforilación (Thr421/Ser424 y Thr389), así como los

niveles de fosforilación de la proteína RPS6 (Ser235/Ser236), aumentaron en la muestra de pacientes. En el control, el efecto observado después de los tratamientos es muy ligero (figura 3B).

Estos resultados han mostrado que la administración de un compuesto de fórmula (I) como los descritos anteriormente, y particularmente VP0.7, en miotubos aumenta la cantidad de β -catenina que a su vez conduce a una activación de la ruta de Wnt, así como también activa la ruta de mTOR.

Con fines comparativos, también se administró LiCl en miotubos de controles y de pacientes y también se sometió a prueba la fosforilación de las proteínas p70S6K y RPS6. Los resultados se representan en la figura 4.

Puede observarse que la administración de litio no proporciona ningún aumento de las proteínas implicadas en la ruta de mTOR, ni en ninguna de sus formas de fosforilación, confirmando así que este compuesto no es eficaz para regular una de las rutas de señalización más importantes implicadas en LGMDR1 a pesar de haberse descrito su uso en el tratamiento de esta enfermedad en la técnica anterior.

Los resultados comparativos entre litio y VP0.7 también se expresan en las tablas IV y V, en donde se observan el aumento de la expresión de p70S6K, su fosforilación (Thr421/Ser424 y Thr389), y los niveles de fosforilación de la proteína RPS6 tras la administración de VP0.7 en la muestra de pacientes, en comparación con la administración de litio.

Tabla IV. Resultados después de la administración de LiCl.

Compuesto	Proteína sometida a prueba (residuo fosforilado)	Administración de fármaco	Controles		Pacientes		
			09-23	13-07	09-25	09-24	09-21
LiCl	P-p70S6K (T421-S424)	-	0,8	0,8	0,7	1,8	0,3
		+	0,78	0,7	0,65	1,4	0,5
	P-RPS6 (S235-S236)	-	3,0	3	2,8	3,5	1,5
		+	3,8	3	2,5	3	1,5

Tabla V. Resultados después de la administración de VP0.7.

Compuesto	Proteína sometida a prueba (residuo fosforilado)	Control 13-05	Paciente 09-25
VP0.7	P-p70S6K (T421-S424)	1	1,6
	P-p70S6K (T389)	0,94	1,6
	P-RPS6 (S235-S236)	1,1	2,8

Los valores mostrados en la tabla corresponden al valor de expresión de proteínas en relación al de la misma muestra sin tratamiento.

Por tanto, el hecho de que los compuestos de fórmula (I), tales como VP0.7, recuperen tanto la ruta de señalización de Wnt como la ruta de señalización de mTOR en pacientes con LGMDR1 es de gran importancia para el tratamiento de esta enfermedad ya que pueden ser más eficaces que otros compuestos conocidos para recuperar la homeostasis alterada de la fibra muscular.

2.3. Ausencia de activación de la ruta de Wnt en fibroblastos y células CD56⁻ después del tratamiento con VP0.7

Con el fin de establecer si los efectos observados previamente después de la administración del fármaco en células miogénicas (mioblastos diferenciados a miotubos) se producían de manera similar en otros tipos de células, se procedió al estudio de fibroblastos cutáneos y células CD56⁻ obtenidos del músculo de pacientes.

Fibroblastos

5 El tratamiento con VP0.7 en fibroblastos no mostró ningún aumento de la fosforilación de GSK3 β (Ser9) (figura 5A), ni en β -catenina o su forma activa, lo que indica que la ruta de Wnt no se activa en este tipo de célula por medio de VP0.7. Además, también se sometió a prueba el efecto que podría provocar la inhibición de GSK3 β en la ruta de mTOR, observando sólo un ligero aumento de la fosforilación de RPS6 (figura 5B).

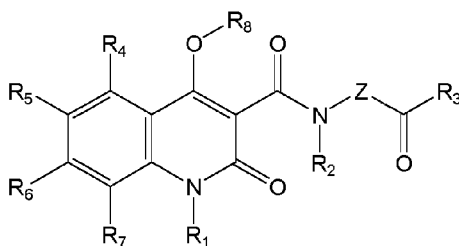
Células CD56⁻

10 Después del tratamiento con VP0.7 en células CD56⁻, no se observó ninguna alteración significativa de la cantidad de β -catenina total o su forma activa (figura 6A). Finalmente, también se sometió a prueba el efecto de esta inhibición sobre la regulación de la ruta de mTOR, pero no se observaron diferencias en mTOR ni en las fosforilaciones de p70S6K y RPS6 (figura 6B).

Por tanto, la administración de VP0.7 no activó la ruta de Wnt ni la ruta de mTOR en fibroblastos o células CD56⁻. La ausencia de efecto después del tratamiento con VP0.7 en diferentes tipos de células es de gran interés, ya que indica que el tratamiento no afecta a otros tejidos evitando efectos adversos no deseados.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):

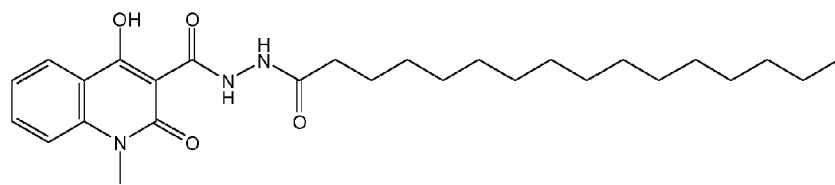
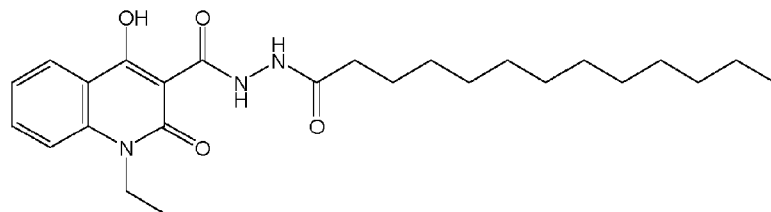
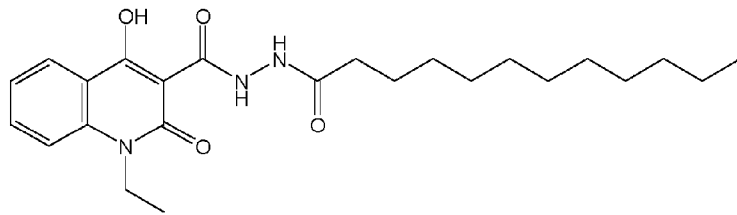
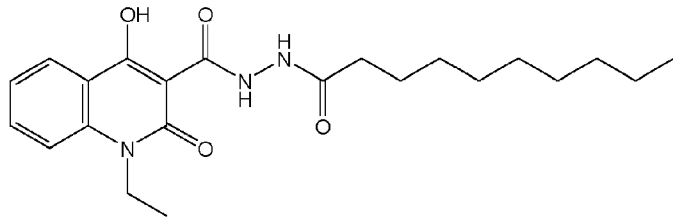


(I)

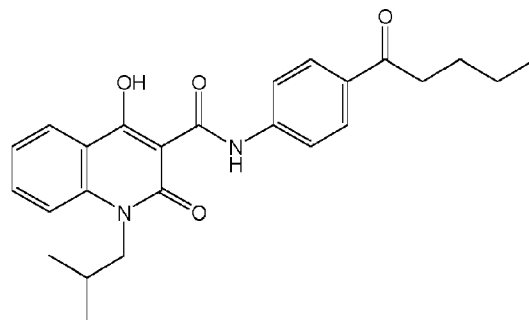
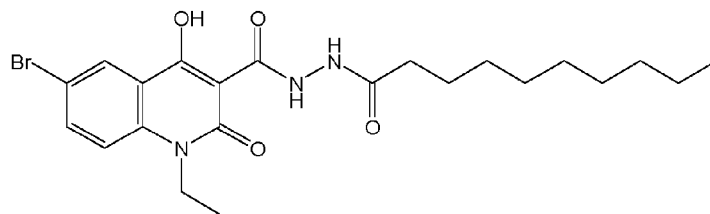
en donde:

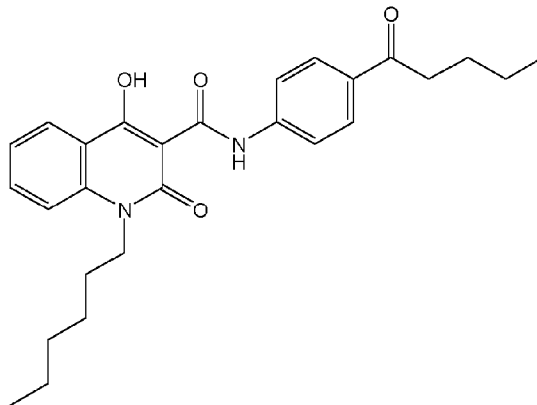
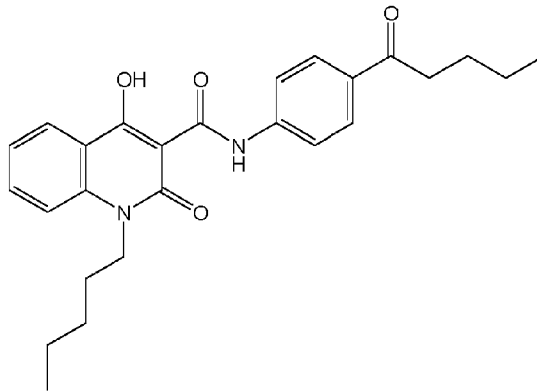
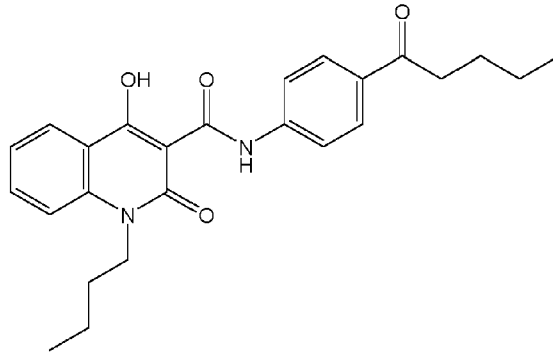
- 5 R₁ se selecciona de H, un grupo alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido y un grupo alquenilo C₂-C₅ opcionalmente sustituido;
- R₂ es H o un grupo alquilo C₁-C₆;
- R₃ es un grupo alquilo C₁-C₂₀ opcionalmente sustituido;
- 10 R₄-R₇ se seleccionan independientemente de H, halógeno, un grupo alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido y -OR₉, en donde R₉ es hidrógeno o un alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido;
- R₈ se selecciona de H y un grupo alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido;
- Z se selecciona de -NR₁₀- y un fenileno opcionalmente sustituido, en donde R₁₀ se selecciona de H y un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido;
- o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 15 para su uso en el tratamiento de distrofia muscular de cinturas.
2. Compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde R₁ es H, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado opcionalmente sustituido con un grupo arilo o cicloalquilo, o un grupo alquenilo C₂-C₅ no sustituido.
- 20 3. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, en donde R₁ es un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado no sustituido.
4. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R₂ es H o un grupo alquilo C₁-C₃ no sustituido.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 4, en donde R₂ es H.
- 25 6. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R₃ es un grupo alquilo C₄-C₁₅ lineal no sustituido.
7. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R₄-R₇ se seleccionan independientemente de H y halógeno.
8. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde Z se selecciona de -NH- y un fenileno no sustituido.
- 30 9. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- R₁ es un grupo alquilo C₁-C₆ no sustituido;
 - R₂ es H;
 - R₃ es un grupo alquilo C₄-C₁₅ lineal no sustituido;
 - R₄-R₇ se seleccionan independientemente de H y halógeno;
- 35 - Z se selecciona de -NH- y fenileno no sustituido.

10. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, seleccionado de:



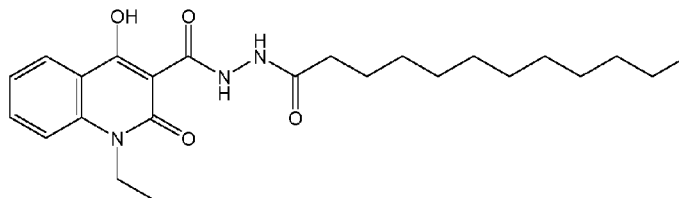
5





y sus sales o solvatos.

- 5 11. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es:



o una sal o un solvato del mismo.

- 10 12. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la distrofia muscular de cinturas es una distrofia muscular de cinturas recesiva seleccionada de LGMD R1 relacionada con calpaína 3 (LGMDR1 o calpainopatía), LGMD R2 relacionada con disferlina (LGMDR2), LGMD R3 relacionada con α -sarcoglicano (LGMDR3), LGMD R4 relacionada con β -sarcoglicano (LGMDR4), LGMD R5 relacionada con γ -sarcoglicano (LGMDR5), LGMD R6 relacionada con δ -sarcoglicano (LGMDR6), LGMD R7 relacionada con teletonina (LGMDR7), LGMD R8 relacionada con TRIM 32 (LGMDR8), LGMD R9 relacionada con FKRP (LGMDR9), LGMD R10 relacionada con titina (LGMDR10), LGMD R11 relacionada con POMT1 (LGMDR11), LGMD R12 relacionada con anoctamina 5 (LGMDR12), LGMD R13 relacionada

- 5 con fukutina (LGMDR13), LGMD R14 relacionada con POMT2 (LGMDR14), LGMD R15 relacionada con POMGnT1 (LGMDR15), LGMD R16 relacionada con α -dístroglicano (LGMDR16), LGMD R17 relacionada con plectina (LGMDR17), LGMD R18 relacionada con TRAPPC11 (LGMDR18), LGMD R19 relacionada con GMPPB (LGMDR19), LGMD R20 relacionada con ISPD (LGMDR20), LGMD R21 relacionada con POGLUT1 (LGMDR21), LGMD R22 relacionada con colágeno 6 (LGMDR22), LGMD R23 relacionada con laminina α 2 (LGMDR23), y LGMD R24 relacionada con POMGNT2 (LGMDR24); o una distrofia muscular de cinturas dominante seleccionada de LGMD D1 relacionada con DNAJB6 (LGMD D1), LGMD D2 relacionada con TNP03 (LGMD D2), LGMD D3 relacionada con HNRNPDL (LGMD D3), LGMD D4 relacionada con calpaína 3 (LGMD D4), y LGMD D5 relacionada con colágeno 6 (LGMD D5).
- 10 13. Compuesto para su uso según la reivindicación 13, en donde la distrofia muscular de cinturas es distrofia muscular de cinturas R1 relacionada con calpaína 3.
- 15 14. Compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se usa en combinación con uno o más principios activos para proporcionar una terapia de combinación, en donde los otros principios activos pueden formar parte de la misma composición, o proporcionarse como composición independiente para la administración en el mismo momento o en un momento diferente.

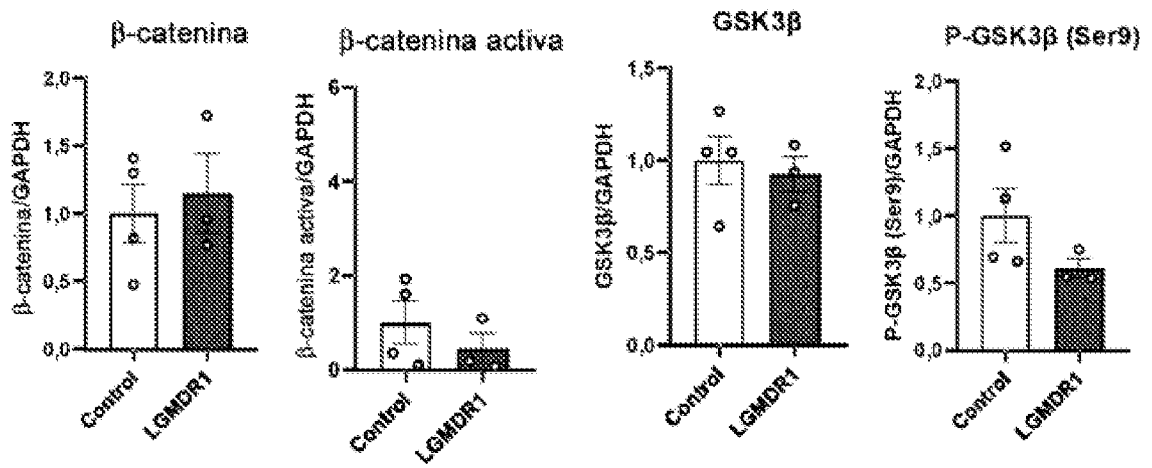


Figura 1A

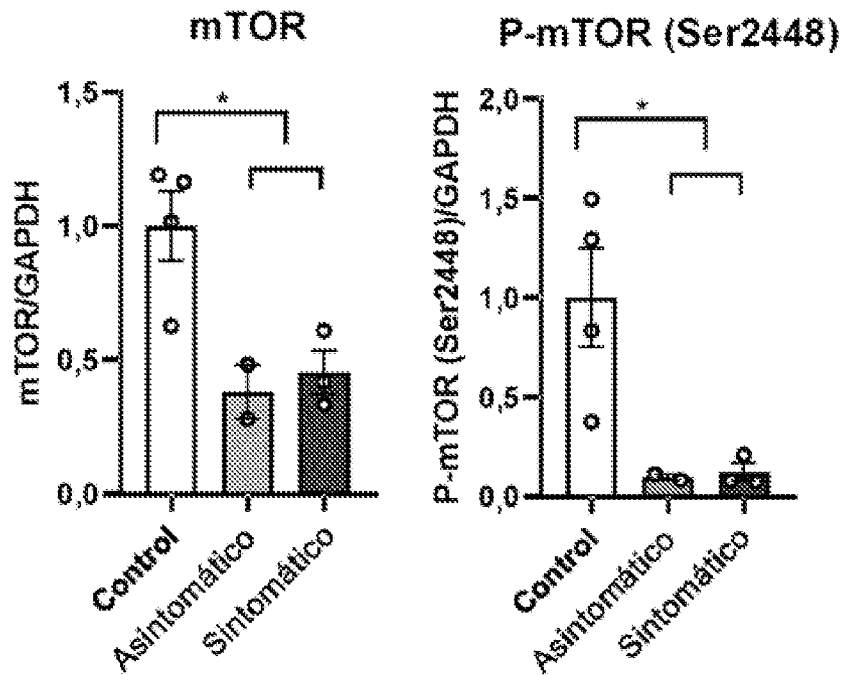


Figura 1B

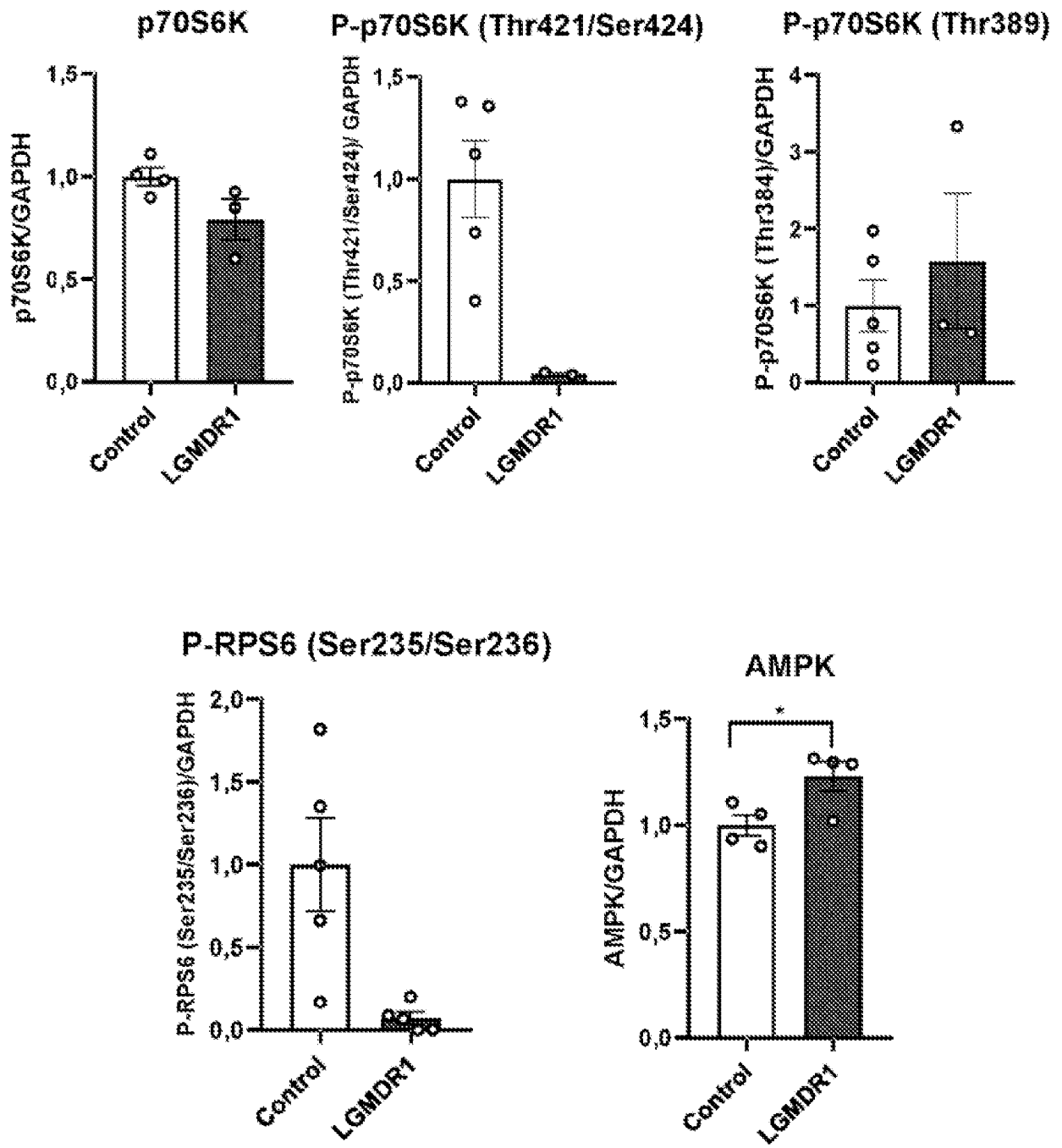


Figura 1C

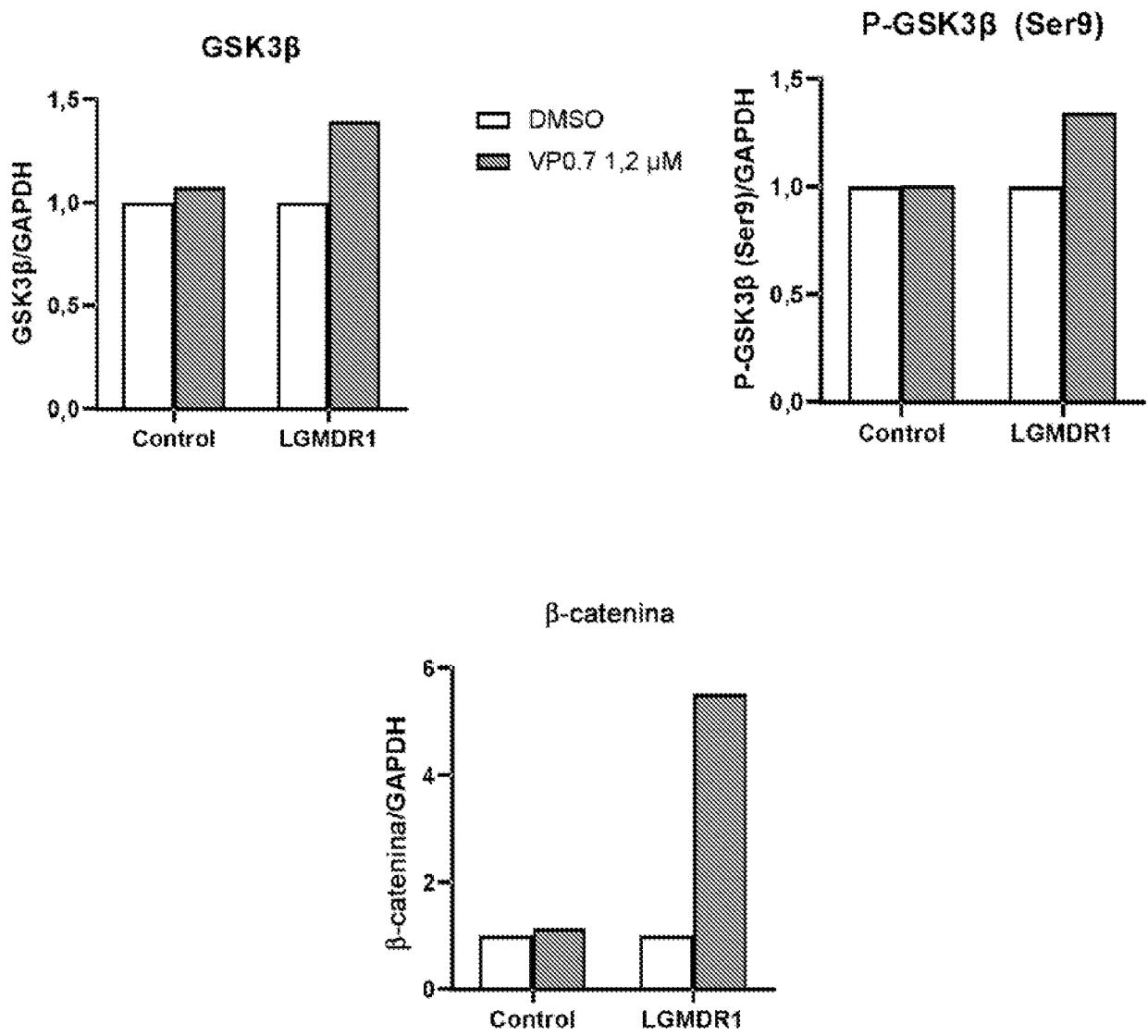


Figura 2A

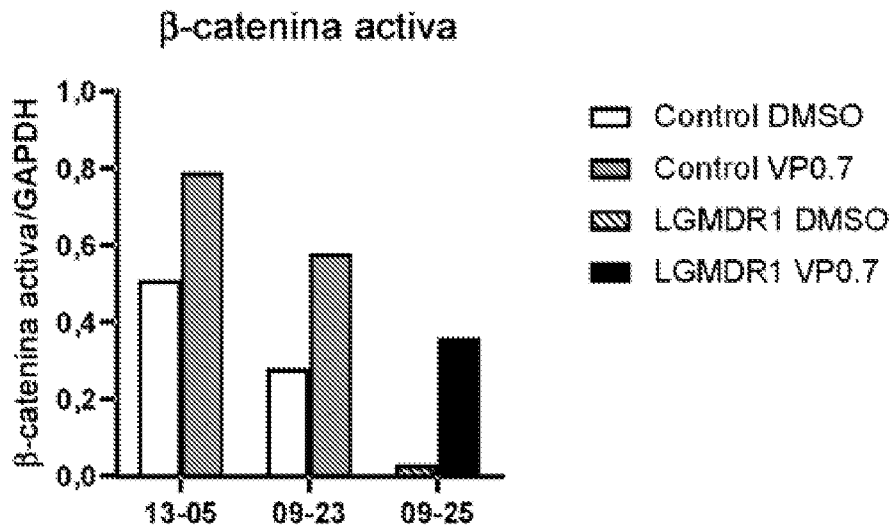


Figura 2B

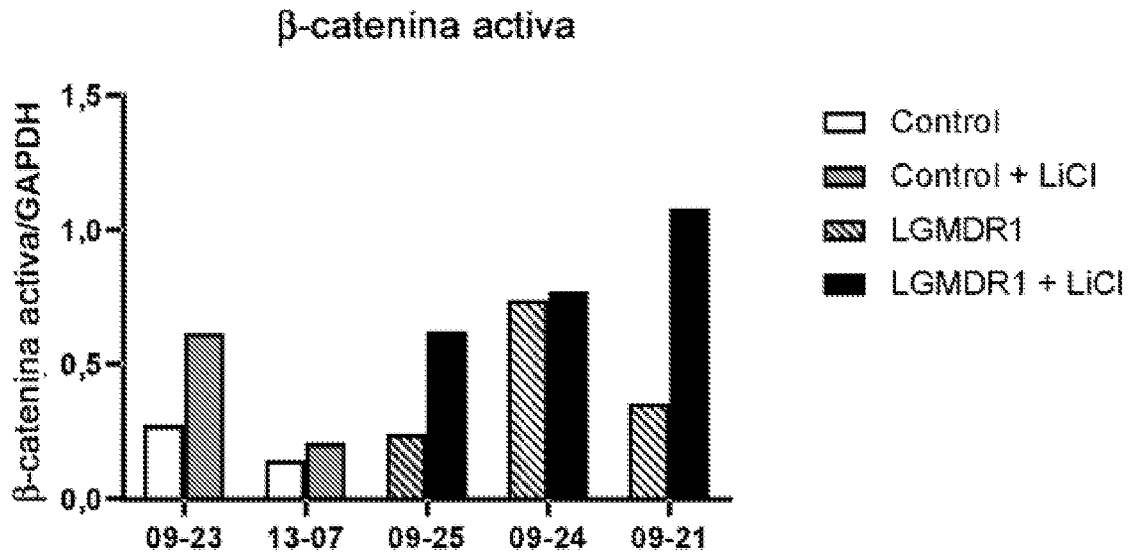


Figura 2C

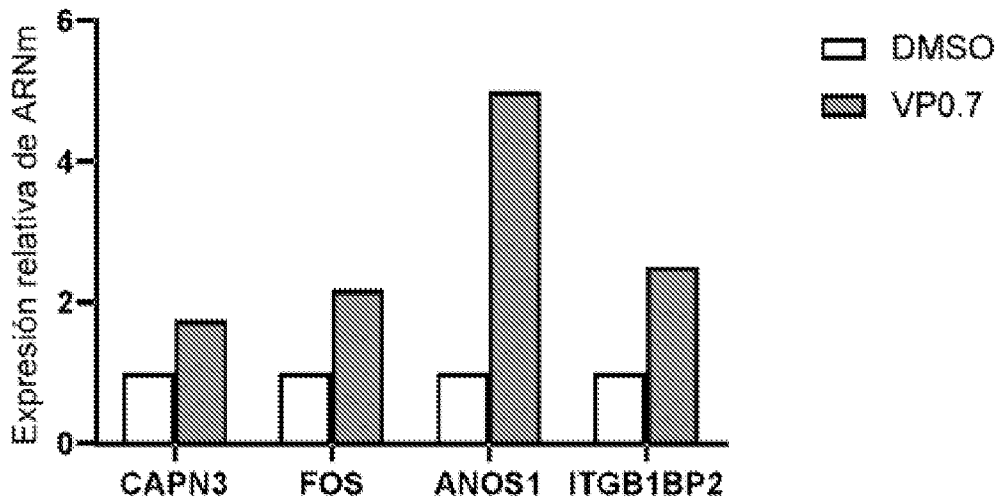


Figura 2D

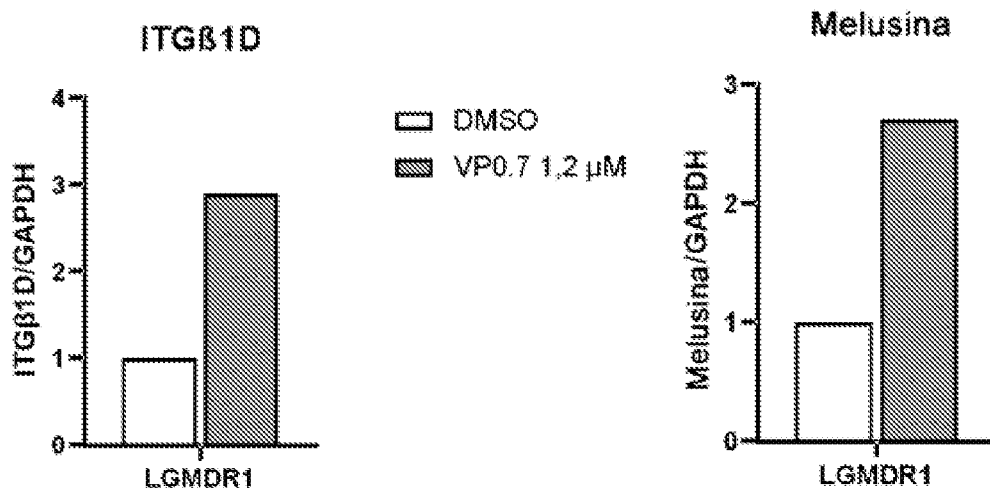


Figura 2E

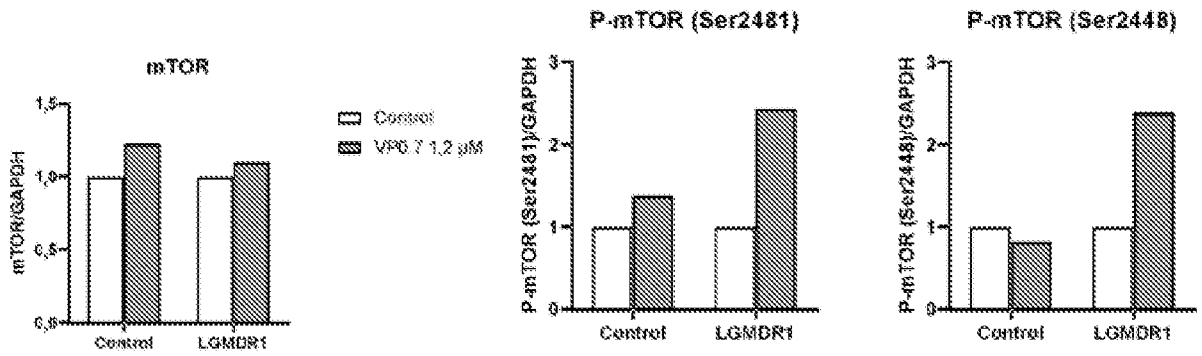
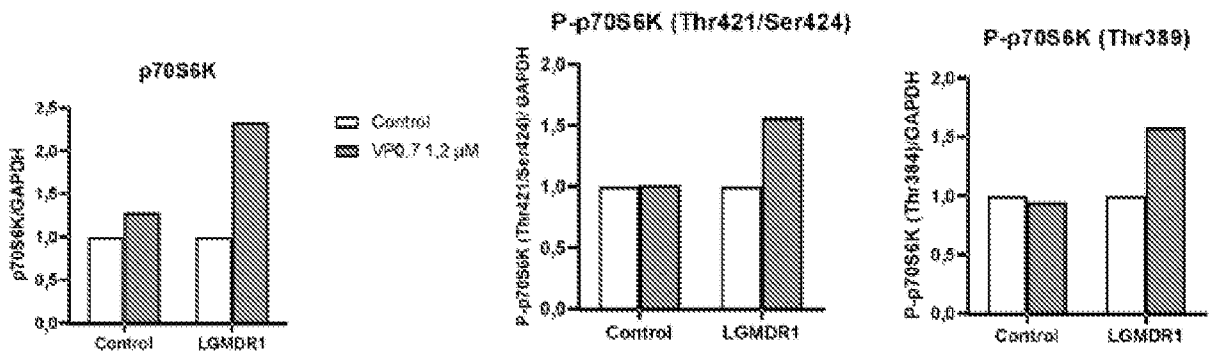
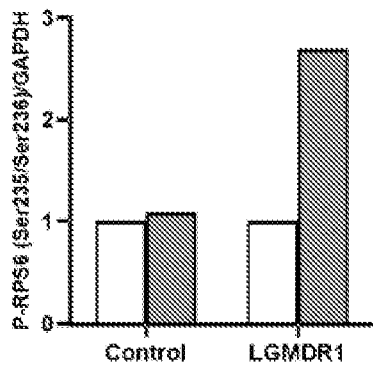


Figura 3A



P-RPS6 (Ser235/Ser236)



P-AMPK (Thr172)

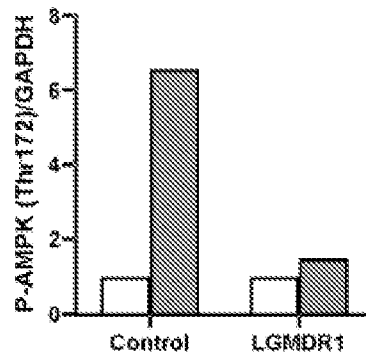


Figura 3B

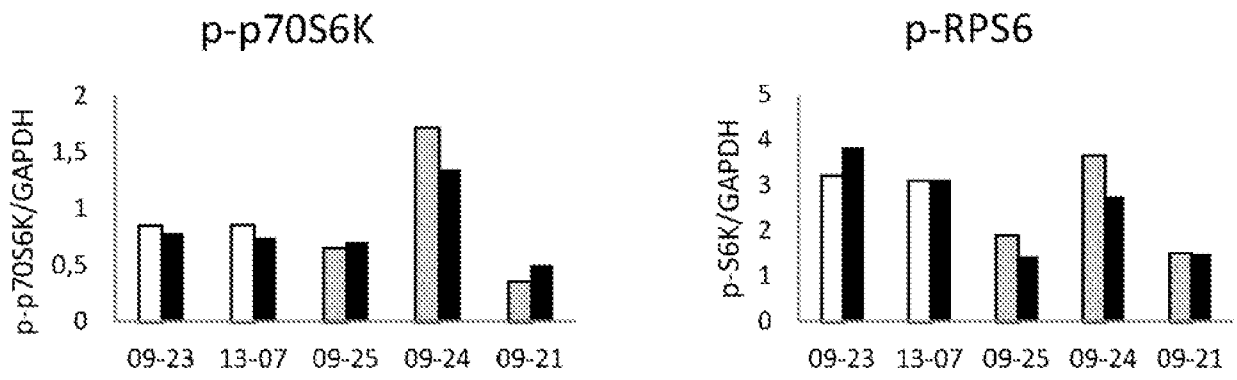


Figura 4

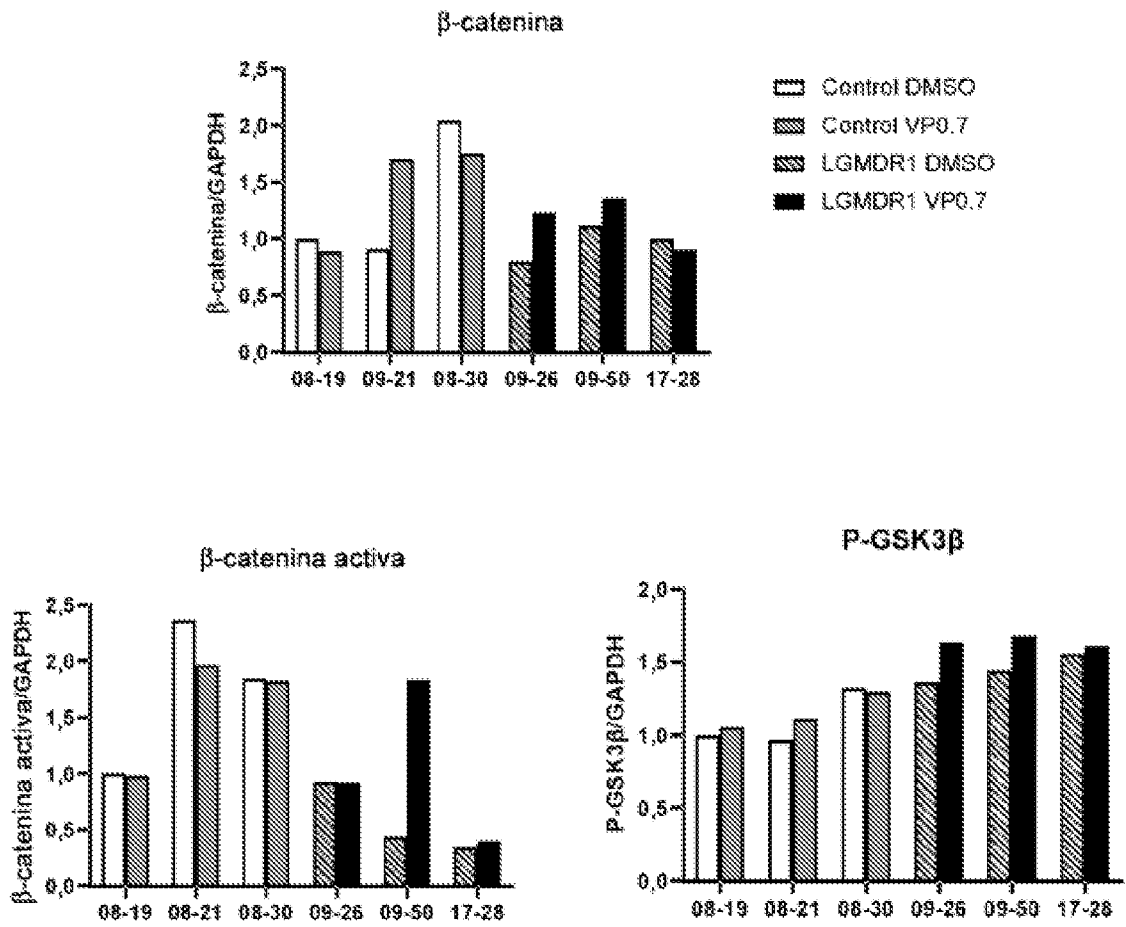


Figura 5A

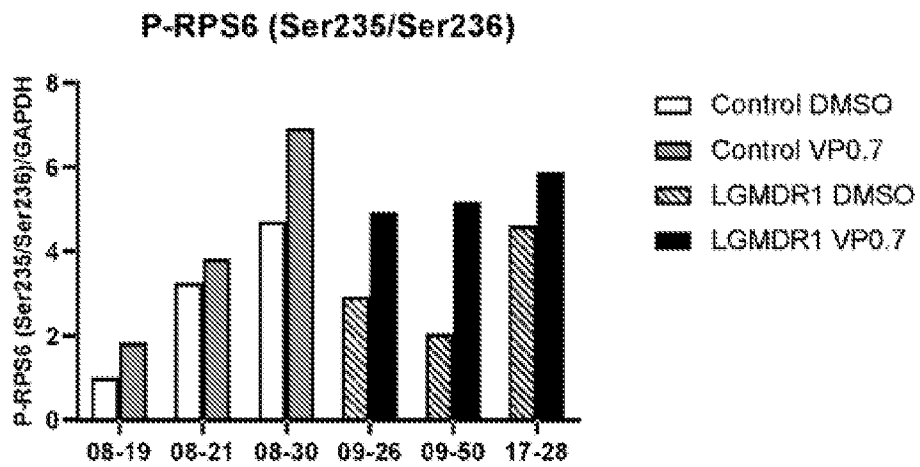


Figura 5B

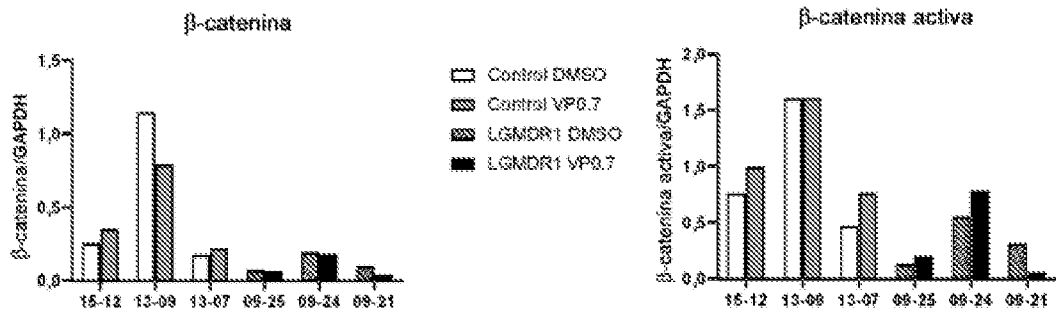


Figura 6A

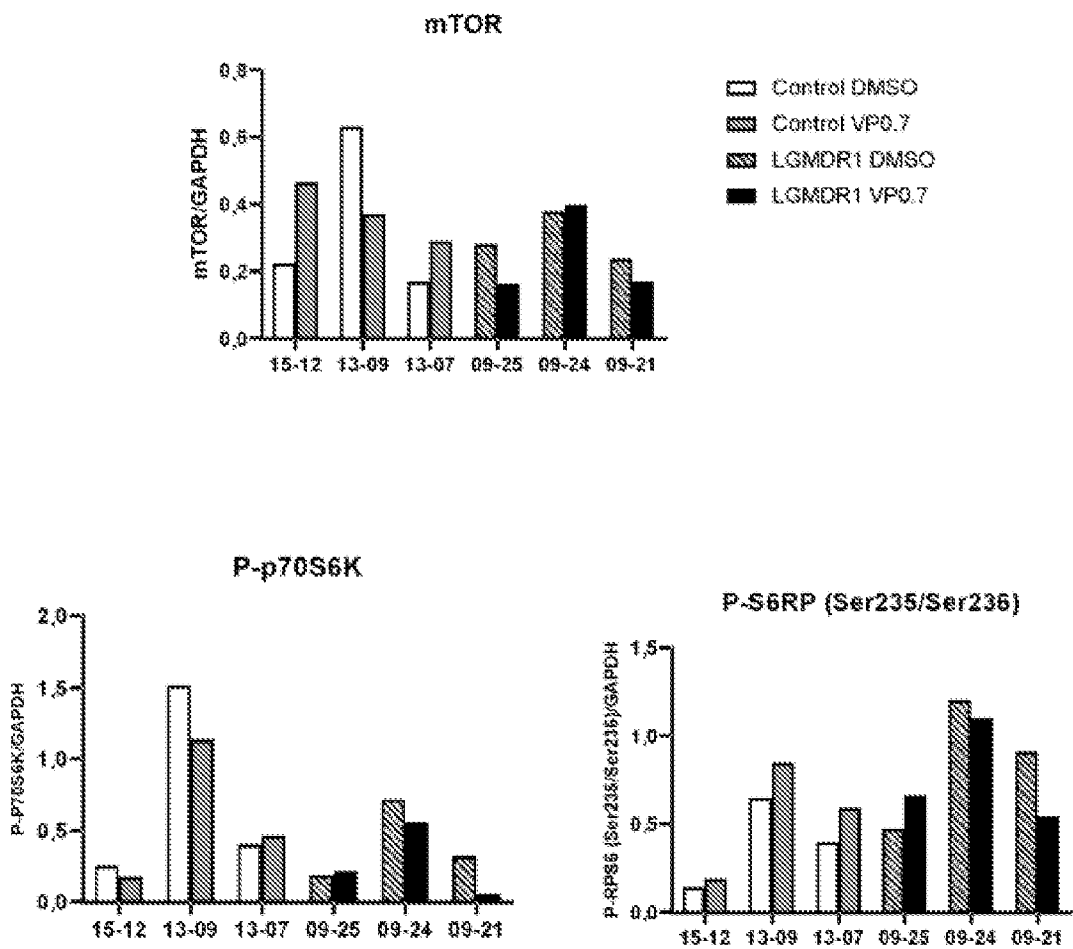


Figura 6B