



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113759** (13) **C2**

(51) МПК (2017.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61P 9/00

A61P 25/00

A61P 19/08 (2006.01)

C07D 281/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 12301	(72) Винахідник(и):	Янь Цзямін (US), Бельведер Сандро (US), Вебб Яєль (US), Бертран Марк (FR), Вільньов Ніколь (FR), Маркс Ендрю Р. (US), Пегльон Жан-Луї (FR)
(22) Дата подання заявки:	17.04.2013	(73) Власник(и):	ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЄ, 35, rue de Verdun, F-92284 Suresnes, France (FR), АРМГО ФАРМА ІНК, 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York, NY 10591, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.03.2017	(74) Представник:	Петошевіч Діна Анатоліївна, реєстр. №284
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/625,890, 12167732.2	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007/024717 A2, 01.03.2007 WO 2008/021432 A2, 21.02.2008 WO 2008/021439 A2, 21.02.2008 WO 2012/037105 A1, 22.03.2012 WO 2008/060332 A2, 22.05.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	18.04.2012, 11.05.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2014, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.03.2017, Бюл.№ 5		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2013/057958, 17.04.2013		

(54) ЗАСОБИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПОРУШЕНЬ ІЗ ЗАЛУЧЕННЯМ МОДУЛЯЦІЇ РЕЦЕПТОРІВ РІАНОДИНУ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується похідних 1,4-бензотіазепіну та їх застосування у лікуванні станів, порушень і захворювань, пов'язаних з рецепторами ріанодину (RyR), які регулюють функціонування кальцієвих каналів у клітинах. Винахід також описує фармацевтичні композиції, які містять такі сполуки, і їх застосування у лікуванні захворювань і станів, пов'язаних з RyR, зокрема порушень серцевої, скелетно-м'язової і центральної нервової системи (ЦНС).

UA 113759 C2

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід відноситься до похідних 1,4-бензотіазепіну та їх використання для лікування порушень і захворювань, пов'язаних з рецепторами ріанодину (RyR), які регулюють функціонування кальцієвих каналів у клітинах. Винахід також описує фармацевтичні композиції, які містять такі сполуки і їх використання для лікування захворювань і станів, пов'язаних з RyR, зокрема, порушень серцевої, скелетно-м'язової і центральної нервової системи (ЦНС).

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВІНАХОДУ

Саркоплазматичний ретикулум (CP) являє собою структуру в клітинах, яка функціонує, серед іншого, як спеціалізований внутрішньоклітинний кальцієвий (Ca^{2+}) пул. Рецептори ріанодину (RyR) являють собою канали у саркоплазматичному ретикулумі, які відкриваються і закриваються, щоб регулювати вивільнення Ca^{2+} з CP у внутрішньоклітинну цитоплазму клітини. Вивільнення Ca^{2+} у цитоплазму з CP підвищує цитоплазматичну концентрацію Ca^{2+} . Виявлена можливість RyR відноситься до ймовірності того, що RyR відкривається у будь-який певний момент, а, отже, є здатним вивільняти Ca^{2+} у цитоплазму з CP.

Існує три типи RyR, всі з яких є високо гомологічними: RyR1, RyR2 і RyR3. RyR1 знаходиться переважно у скелетних м'язах, а також інших тканинах, RyR2 знаходиться переважно у серці, а також інших тканинах, і RyR3 знаходиться у головному мозку, а також інших тканинах. RyR являє собою тетрамер. Частина комплексу RyR утворена чотирма поліпептидами RyR у поєднанні з чотирма FK506-зв'язуючими білками (FKBP) (калстабінами), зокрема FKBP12 (калстабін1) і FKBP12.6 (калстабін2). Калстабін1 зв'язується з RyR1 і RyR3, тоді як калстабін2 зв'язується з RyR2. Калстабіни зв'язуються з RyR (одна молекула на субодиночку RyR), стабілізують функцію RyR, сприяють сполученому гейтуванню між сусідніми RyR і запобігають аномальній активації (витоку Ca^{2+}) каналу шляхом стабілізації закритого стану каналу.

Рецептор ріанодину 2 і серцево-судинні захворювання

У серцевому поперечносмугастому м'язі, RyR2 є основним каналом вивільнення Ca^{2+} , необхідним для електромеханічного (ЕМ) сполучення і скорочення м'язів. В процесі ЕМ сполучення, деполяризація клітинної мембрани серцевого м'яза під час нульової фази потенціалу дії активує потенціалзалежні канали Ca^{2+} . Приплив Ca^{2+} через відкриті потенціалзалежні канали в свою чергу ініціює вивільнення Ca^{2+} з CP через RyR2. Цей процес є відомим як Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} . RyR2-опосередковане Ca^{2+} -індуковане вивільнення Ca^{2+} потім активує скорочувальні білки у серцевій клітині, що призводить до скорочення серцевого м'яза.

Фосфорилування RyR2 протеїнкіназою А (ПКА) є важливою частиною реакції "боротьби або втечі" (адаптаційної антистресової реакції), яка підвищує приріст серцевого ЕС сполучення шляхом збільшення кількості вивільненого Ca^{2+} для даного тригера. Цей сигнальний шлях забезпечує механізм, за допомогою якого активація симпатичної нервової системи (СНС), у відповідь на стрес, призводить до підвищення об'ємної швидкості кровотоку серця. Фосфорилування RyR2 протеїнкіназою А призводить до часткової дисоціації калстабіну2 з каналу, що, в свою чергу, призводить до підвищеної ймовірності відкриття, і підвищеного вивільнення Ca^{2+} з CP у внутрішньоклітинну цитоплазму.

Серцева недостатність (СН) характеризується стійким гіперадренергічним станом, при якому рівні катехоламінів у сироватці є хронічно підвищеними. Одним з наслідків такого хронічного гіперадренергічного стану є постійне ПКА-гіперфосфорилування RyR2, таким чином, що 3-4 з чотирьох Ser2808 у кожному гомотетрамерному каналі RyR2 є хронічно фосфорильованими (Marx SO, et al. Cell, 2000;101(4):365-376). Зокрема, хронічне ПКА-гіперфосфорилування RyR2 пов'язане з елімінацією субодиночки калстабіну2, що стабілізує канал, з макромолекулярного комплексу каналу RyR2. Елімінація калстабіну призводить до діастолічного "витоку" Ca^{2+} з CP через комплекс RyR, що сприяє порушенню скорочувальної здатності (Marx et al., 2000). Внаслідок активації внутрішніх деполяризуючих струмів, цей діастолічний "витік" Ca^{2+} з CP також пов'язаний зі смертельною серцевою аритмією (Lehnart et al, J Clin Invest. 2008;118(6):2230-2245). Дійсно, миші, створені методами генної інженерії, з RyR2, позбавленим сайту ПКА-фосфорилування, є захищеними від прогресування СН після інфаркту міокарда (IM) (Wehrens XH et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(3):511-518). Крім того, хронічне ПКА-гіперфосфорилування RyR2 при СН пов'язане з ремоделюванням макромолекулярного комплексу RyR2, який включає в себе елімінацію фосфатаз (Marx et al. 2000) PP1 і PP2A (послаблюючи дефосфорилування Ser2808) і цАМФ-специфічної фосфодіестерази типу 4 (PDE4D3) з комплексу RyR2. Елімінація PDE4D3 з комплексу RyR2 спричиняє стале підвищення місцевих рівнів цАМФ (Lehnart SE, et al., Cell 2005;123(1):25-35). Таким чином, діастолічний витік Ca^{2+} з CP сприяє прогресуванню СН і аритмії. Крім того, нещодавній звіт засвідчив, що активація RyR2-S2808D/+ (аспарагінова кислота, що замінює

серин 2808) у мишей, що імітує конститутивне PKA-гіперфосфорилування RyR2, демонструє елімінацію калстабіну2 і негерметичність (витік) каналу RyR2. У мишей RyR2-S2808D+/+ розвивається вікова кардіоміопатія, вони демонструють підвищене окиснення і нітрозилювання RyR2, зниження вмісту накопиченого Ca^{2+} в CP, та підвищення діастолічного витоку Ca^{2+} з CP. Після інфаркту міокарда, миші RyR2-S2808D+/+ мають підвищену смертність в порівнянні з

однопослідними тваринами дикого типу (WT). Введення S107, 1,4-бензотіазепіну, що стабілізує взаємодії RyR2-калстабіну2 (WO 2007/024717), інгібує RyR2-опосередкований діастолічний витік Ca^{2+} з CP і знижує прогресування СН як у мишей дикого типу, так і у мишей RyR2-S2808D+/+ (Shan et al., J Clin Invest. 2010 Dec 1;120(12):4375-87).

Крім того, RyR2 містить близько 33 вільних тіолових залишків, які роблять його дуже

чутливим до стану клітинного окиснення-відновлення. Окиснення цистеїну сприяє відкриттю

RyR і витоку Ca^{2+} з CP. Shan et al., 2010, продемонстрували, що окиснення і нітрозилювання

RyR2 та дисоціація стабілізуючої субодиниці калстабіну2 з RyR2 викликає витік Ca^{2+} з CP.

Катехоламінергічна поліморфна шлуночкова тахікардія (КПШТ) є спадковим порушенням у

осіб зі структурно нормальним серцем. Понад 50 різних мутацій RyR2 були пов'язані з КПШТ.

Пацієнти з КПШТ страждають від непритомності і раптової серцевої смерті (PCC) від малечого

до дорослого віку, і до 35 років смертність становить до 50 %. Пацієнти з КПШТ мають

шлуночкові аритмії у разі фізичного навантаження, але не зазнають аритмії у стані спокою.

Мутації RyR2, пов'язані з КПШТ, призводять до втрати "герметичності" каналів RyR2 внаслідок

зниження зв'язування субодиниці калстабіну2 (Lehnart et al., 2008). Миші, гетерозиготні по

мутації R2474S у RyR2 (миші RyR2-R2474S), демонстрували спонтанні генералізовані тоніко-

клонічні напади (які сталися за відсутності серцевої аритмії), шлуночкові аритмії, викликані

фізичним навантаженням, і PCC. Введення S107 підвищує зв'язування калстабіну2 з каналом

RyR2-R2474S мутанта, інгібує витік каналу, запобігає серцевим аритміям і підвищує судомний

поріг (Lehnart et al., 2008).

Рецептор ріанодину 1 і скелетно-м'язові захворювання

Скорочення скелетних м'язів активується шляхом вивільнення Ca^{2+} з CP через канал RyR1.

Деполаризація мембрани поперечної (Т)-трубочки міоциту активує датчик напруги

дигідропіридинового рецептора (Cav1.1), що в свою чергу активує канали RyR1 через пряму

білок-білкову взаємодію, викликаючи вивільнення запасів Ca^{2+} з CP. Ca^{2+} зв'язується з

тропоніном С, забезпечуючи виникнення актин-міозин поперечних зв'язків і скорочення

саркомеру.

В умовах тривалого м'язового стресу (наприклад, під час марафонського бігу) або при таких

хворобах, як серцева недостатність, обидва з яких характеризується хронічною активацією

симпатичної нервової системи (CHC), функція скелетних м'язів порушується, можливо

внаслідок зміненого електромеханічного (ЕМ) сполучення. Зокрема, кількість Ca^{2+} , вивільненого

з CP під час кожного скорочення м'язу, зменшується, можуть мати місце явища аберантного

вивільнення Ca^{2+} і зворотне захоплення Ca^{2+} сповільнюється (Reiken, S, et al. 2003. J. Cell Biol.

160:919-928). Ці спостереження наводять на думку про те, що шкідливі ефекти хронічної

активації симпатичної нервової системи у скелетних м'язах можуть бути викликані, принаймні

частково, дефектами у сигналізації Ca^{2+} .

Макромолекулярний комплекс RyR1 складається з тетрамеру субодиниці 560-кДа RyR1, що

утворює каркас для білків, які регулюють функцію каналу, включаючи PKA і фосфодіестеразу

4D3 (PDE4D3), протейнфосфатазу 1 (PP1) і калстабін1. А-кіназа якріний білок (mAKAP) націлює

PKA і PDE4D3 на RyR1, в той час як спінофілін націлює PP1 на канал (Marx et al. 2000; Brillantes

et al., Cell, 1994, 77, 513-523; Bellinger et al. J. Clin. Invest. 2008, 118, 445-53). Каталітичні і

регуляторні субодиниці PKA, PP1 і PDE4D3 регулюють PKA-опосередковане фосфорилування

RyR1 у Ser284 3 (Ser2844 у мишей). Було продемонстровано, що PKA-опосередковане

фосфорилування RyR1 у Ser2844 підвищує чутливість каналу до цитоплазматичного Ca^{2+} ,

знижує спорідненість (афінність) зв'язування калстабіну1 з RyR1, і дестабілізує закритий стан

каналу (Reiken et al., 2003; Marx, S.O. et al., Science, 1998, 281:818-821). Концентрації

калстабіну1 у скелетних м'язах, як повідомляється, становлять приблизно 200 нМ, і PKA-

фосфорилування RyR1 знижує спорідненість зв'язування калстабіну1 з RyR1 з приблизно 100-

200 нМ до понад 600 нМ. Таким чином, у фізіологічних умовах, зниження спорідненості

зв'язування калстабіну1 з RyR1, в результаті PKA-фосфорилування RyR1 у Ser2843, є

достатнім, щоб істотно зменшити кількість калстабіну1, присутнього у комплексі RyR1. Хронічне

PKA-гіперфосфорилування RyR1 у Ser2843 (визначається як PKA-фосфорилування 3 або 4 з 4

PKA Ser2843 сайтів, присутніх у кожному гомотетрамері RyR1) призводить до виникнення

"негерметичних" каналів (тобто, каналів, схильних до відкриття у стані спокою), які сприяють

дисфункції скелетних м'язів, пов'язаній з постійними гіперадренергічними станами, які

виникають у пацієнтів з серцевою недостатністю (Reiken et al., 2003).

Крім того, регулювання RyR1 шляхом посттрансляційних модифікацій, інших ніж фосфорилування, наприклад, шляхом нітрозилування вільних сульфгідрильних груп у цистеїнових залишках (S-нітрозилування), а також шляхом окислення каналу, як

повідомляється, підвищують активність каналу RyR1. S-нітрозилування і окислення RyR1, кожне з яких, як було продемонстровано, знижують зв'язування калстабіну1 з RyR1.

Як повідомлялося раніше у Bellinger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 2008, 105(6):2198-2002), під час екстремального фізичного навантаження у мишей і людей, RyR1 поступово ПКА-гіперфосфорилується, S-нітрозилується і зазнає елімінації PDE4D3 і калстабіну1, в результаті чого виникають "негерметичні" канали, які спричиняють зниження здатності до фізичного навантаження у мишей. Введення S107 запобігає елімінації калстабіну1 з комплексу RyR1, покращує формування сили і здатності до фізичного навантаження та знижує Ca^{2+} залежну активність нейтральної протеази - кальпаїну і рівні концентрації креатинін-кінази у плазмі крові.

М'язова дистрофія Дюшена (МДД) є одним з найпоширеніших смертельних генетичних захворювань дитячого віку. МДД є зчепленою з X-хромосомою і на неї страждає 1 з 3500 новонароджених хлопчиків, і зазвичай вона призводить до смерті у віці ~30 років від дихальної або серцевої недостатності. Мутації дистрофіну, пов'язані з МДД, призводять до повної втрати білка дистрофіну, тим самим порушуючи зв'язок між цитоскелетом субсарколеми і позаклітинним матриксом. Цей зв'язок має важливе значення для захисту і стабілізації м'язів проти травм, викликаних скороченням. У даний час МДД є невиліковною і більшість видів клінічної терапії є паліативними. Новими видами втручання у клінічних дослідженнях Фази I/II є пропуск екзонів, інгібування міостатину і підвищувальна регуляція атрофіну. Тим не менш, існують проблеми з системною доставкою, підтримкою пропуску екзонів і підвищувальною регуляцією атрофіну. Крім того, у клінічних дослідженнях Фази I/II інактивація міостатину для підвищення розміру м'язів не призвела до покращення міцності або функції м'язів. Сарколемна нестабільність внаслідок мутацій дистрофіну має каскадний ефект. Одним з основних ефектів є підвищена цитозольна концентрація Ca^{2+} , яка призводить до активації Ca^{2+} -залежних протеаз (кальпаїнів). Іншим ефектом є запалення і підвищена активність індукцйбельної синтази оксиду азоту (iNOS), що може призвести до окислення/нітрозилування білків, ліпідів і ДНК. М'язова патологія МДД є прогресивною і набагато перевищує нестабільність сарколеми. Таким чином, патологія узгоджується з нестабільністю сарколеми, підвищуючи сприйнятливості до подальшої травми. Нещодавно було продемонстровано, що надмірне окислення або нітрозилування RyR1 може порушити взаємодію калстабіну1 з комплексом RyR1, що призводить до нещільності RyR1 і м'язової слабкості у мишачої моделі м'язової дистрофії (mdx) і, що лікування за допомогою S107 покращує показники функції м'язів у цій мишачій моделі (Bellinger, A. et al. 2009, Nature Medicine, 15:325-330).

Вікова втрата м'язової маси і сили (саркопенія) сприяє інвалідності і підвищенню смертності. Andersson, D. et al. (Cell Metab. 2011 Aug 3;14(2):196-207) повідомляють, що RyR1 від мишей, що зістарілися (24 місяці) є окисленим, цистеїн-нітрозильованим і збіднілим на калстабін1, порівняно з RyR1 від дорослих мишей молодшого віку (3-6 місяців). Така реконструкція комплексу каналу RyR1 призвела до утворення "негерметичних" каналів з підвищеною ймовірністю відкриття, що призводить до внутрішньоклітинного витоку кальцію у скелетних м'язах. Введення мишам, що зістарілися, S107 стабілізувало зв'язування калстабіну1 з RyR1, знизило внутрішньоклітинний витік кальцію, знизило реактивні форми кисню (ROS) і посилило тетанічне вивільнення Ca^{2+} , специфічну для м'язів силу і здатність до фізичного навантаження.

Міжнародні патентні публікації PCT WO 2005/094457, WO 2006/101496 і WO 2007/024717 описують похідні 1,4-бензотіазепіну і їх використання при лікуванні серцевих, скелетно-м'язових і когнітивних порушень, серед інших.

Міжнародна патентна публікація PCT WO 2008/060332 відноситься до використання 1,4-бензотіазепіну для лікування м'язової втоми у пацієнтів, які страждають від патології, такої як м'язова дистрофія, або у пацієнтів, які страждають від м'язової втоми в результаті стійкого, тривалого та/або інтенсивного навантаження або хронічного стресу.

Міжнародна патентна публікація PCT WO 2008/021432 відноситься до використання 1,4-бензотіазепіну для лікування та/або профілактики захворювань, порушень і станів, які впливають на нервову систему.

Міжнародна патентна публікація PCT WO 2012/019076 відноситься до використання похідних 1,4-бензотіазепіну для лікування та/або профілактики серцевої ішемії/реперфузійного пошкодження. Fauconnier et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(32): 13258-63 повідомляють про те, що витік RyR, опосередкований активацією каспази-8, призводить до травми лівого шлуночка після ішемії-реперфузійного пошкодження міокарда, і що лікування за допомогою

S107 інгібувало витік Ca^{2+} з СР, знизило шлуночкові аритмії, розмір інфаркту і ремоделювання лівого шлуночка через 15 діб після реперфузії.

Міжнародна патентна публікація РСТ WO 2012/019071 відноситься до використання похідних 1,4-бензотіазепіну для лікування та/або профілактики саркопенії.

5 Міжнародна патентна публікація РСТ WO 2012/037105 відноситься до використання похідних 1,4-бензотіазепіну для лікування та/або профілактики нейронних порушень і захворювань, спричинених стресом.

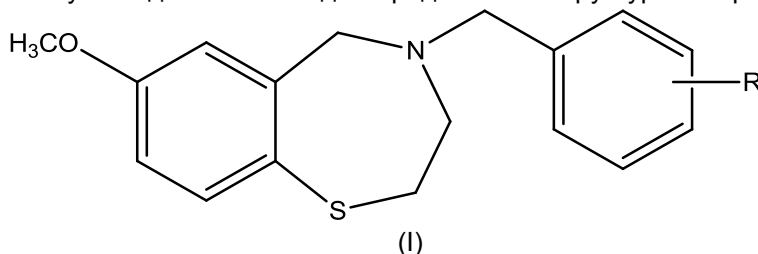
Існує потреба виявлення нових сполук, ефективних для лікування порушень і захворювань, пов'язаних з RyR, в тому числі скелетно-м'язових і серцевих порушень і захворювань. Більш
10 конкретно, залишається потреба у виявленні нових засобів, які можуть бути використані для лікування порушень, пов'язаних з RyR, наприклад, усунення витоку в каналах RyR, і підвищення зв'язування калстабінів з ПКА-фосфорильованими / оксигенованими / нітрозильованими RyR та з мутантними RyR, які в іншому випадку мають понижену спорідненість (афінність) з калстабінами або не зв'язується з ними.

15 СУТНІСТЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід відноситься до нових похідних 1,4-бензотіазепіну і їх фармацевтично прийнятних солей. У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за даним винаходом є стабілізаторами кальцієвих каналів рецептора ріанодину (RyR), які іноді називають "RycalsTM". Даний винахід також відноситься до способів використання цих сполук для лікування порушень і
20 захворювань, пов'язаних з RyR.

Сполуки за даним винаходом обирають з похідних 1,4-бензотіазепіну, описаних у патенті WO 2007/024717. Патент WO 2007/024717 описує структурно подібні сполуки, проте, як додатково описано в даному документі, було виявлено, що ці сполуки є дуже нестійкими а, отже, їх терапевтичне застосування як лікарських засобів є обмеженим. Проблема, що лежить в основі цього застосування, таким чином, полягає у забезпеченні альтернативних похідних 1,4-бензотіазепіну, які є не тільки фармакологічно активними, але також мають сприятливі властивості, такі як висока метаболічна стабільність, а, отже, є придатними як лікарські засоби при лікуванні захворювань і станів, пов'язаних з RyR, наприклад, порушень серцевої, скелетно-м'язової і центральної нервової системи (ЦНС). Несподівано було виявлено, що сполуки формули (I) є стабільними, а також фармакологічно активними, таким чином, забезпечуючи
30 технічне рішення проблеми, що лежить в основі даного винаходу.

Сполуки за даним винаходом представлені структурою Формули (I):

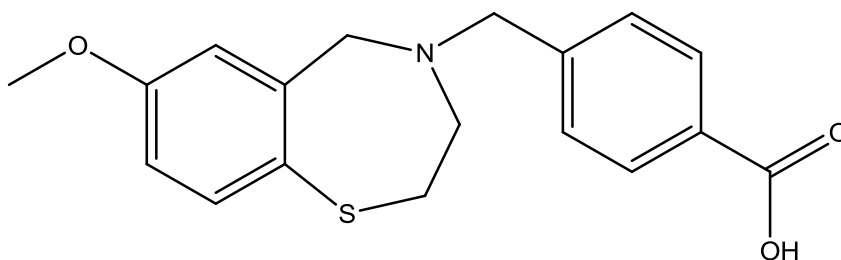


35 де
R являє собою COOH ;
і її фармацевтично прийнятні солі.

Сполуки Формули (I) можуть бути присутніми у формі солі з фармацевтично прийнятною кислотою або основою. Такі солі переважно обирають із групи, що складається з солей натрію, калію, магнію, геміфумарату, гідрохлориду та гідробромиду, причому кожна така можливість представляє собою окремий варіант здійснення даного винаходу. На даний момент переважною сіллю є натрієва сіль. Іншою переважною сіллю на даний момент є сіль геміфумарату.

У деяких конкретних варіантах здійснення сполуку обирають з групи, що складається зі
45 сполуки 1, сполуки 4 і сполуки 6 та їх фармацевтично прийнятних солей. Структури цих сполук описані нижче.

У переважному варіанті здійснення винаходу сполука представлена структурою сполуки (1):



(1)

або її фармацевтично прийнятної солі.

У деяких варіантах здійснення сполука 1 представлена як вихідна сполука. У інших
 5 варіантах здійснення, проте, сполука 1 представлена у формі солі з фармацевтично
 прийнятною кислотою або основою. Переважно, таку сіль обирають із групи, що складається з
 солей натрію, калію, магнію, геміфумарату, гідрохлориду та гідроброміду, причому кожна така
 можливість представляє собою окремий варіант здійснення даного винаходу. На даний момент
 переважною сіллю є натрієва сіль. Іншою переважною сіллю на даний момент є сіль
 10 геміфумарату.

Даний винахід також відноситься до способів синтезу сполук за винаходом і їх солей.

Даний винахід також забезпечує фармацевтичні композиції, які містять одну або більше зі
 сполук за даним винаходом, і, принаймні, одну добавку або ексципієнт, наприклад, наповнювачі,
 розріджувачі, зв'язуючі речовини, розпушувачі, буфери, барвники, емульгатори, агенти, що
 15 покращують смак, гелеутворювачі, ковзаючі речовини, консерванти, солюбілізатори,
 стабілізатори, суспендуючі агенти, підсолоджувачі, тонізуючі агенти, змочуючі агенти,
 емульгуючі агенти, диспергуючі агенти, агенти, що викликають набухання, сповільнювачі,
 змащувальні речовини, абсорбенти, і агенти, що підвищують в'язкість. Композиції можуть бути
 представлені у формі капсул, гранул, порошків, розчинів, саше, суспензій або таблетованій
 20 лікарській формі.

Даний винахід також забезпечує способи лікування або профілактики різних порушень,
 захворювань і станів, пов'язаних з RyR, таких як серцеві, скелетно-м'язові, когнітивні, ЦНС і
 нервово-м'язові порушення і захворювання, та включає в себе введення пацієнту, який
 потребує такого лікування, кількості сполуки Формули (I) або її солі, що є ефективною для
 25 профілактики або лікування порушення або захворювання, пов'язаного з RyR. Даний винахід
 також забезпечує спосіб профілактики або лікування витоку в каналі RyR (в тому числі RyR1,
 RyR2 і RyR3) у пацієнта, включаючи введення пацієнту кількості сполуки Формули (I) або її солі,
 що є ефективною для профілактики або лікування витоку в RyR.

Крім того, даний винахід відноситься до способу модуляції зв'язування RyR і калстабінів у
 30 пацієнта, який включає в себе введення пацієнту кількості сполуки Формули (I) або її солі, що є
 ефективною для модуляції кількості RyR-зв'язаного калстабіну.

Даний винахід також відноситься до використання сполуки Формули (I) для виготовлення
 лікарського засобу для лікування та/або профілактики порушень, захворювань і станів,
 пов'язаних з RyR, таких як серцеві, скелетно-м'язові і когнітивні/ЦНС порушення і захворювання.
 35 В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до використання сполуки Формули (I)
 для виготовлення лікарського засобу для профілактики або лікування витік у каналі RyR. В
 іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до використання сполуки Формули (I) для
 виготовлення лікарського засобу для модуляції кількості RyR-зв'язаних калстабінів.

Способи винаходу можуть бути реалізовані у системі *in vitro* (наприклад, культивовані
 40 клітини або тканини) або *in vivo* (наприклад, у тварин, що не належать до людського роду або у
 людини).

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за даним винаходом представлені в
 поєднанні з терапією пропуску екзонів, наприклад, антисмислових олігонуклеотидів (АО), з тим
 щоб посилити пропуск екзонів у мРНК-мішені, наприклад, гена МДД, як описано далі. Інші
 45 ознаки і переваги даного винаходу стануть очевидними з нижченаведеного докладного опису та
 фігур.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

- Фігура 1A Імуноблот з антитілом калстабіну2, який показує зв'язування калстабіну2 з ПКА-фосфорильованим RyR2 за відсутності (-) або у присутності 100 нМ сполуки 1. (+): зв'язування калстабіну з ПКА-нефосфорильованим RyR2. S36 (US 7.544.678) використовується як позитивний контроль.
- Фігура 1B Імуноблот з антитілом калстабіну2, який показує зв'язування калстабіну2 з ПКА-фосфорильованим RyR2 за відсутності (-) або у присутності 100 нМ сполуки 2, сполуки 3 або сполуки 4. (+): зв'язування калстабіну з ПКА-нефосфорильованим RyR2. S36 використовується як позитивний контроль.
- Фігура 1C Імуноблот з антитілом калстабіну1, який показує зв'язування калстабіну1 з ПКА-фосфорильованим RyR1 за відсутності (Neg) або у присутності зазначених концентрацій сполуки 1 або сполуки 4. (Pos): зв'язування калстабіну з ПКА-нефосфорильованим RyR1. S36 використовується як позитивний контроль.
- Фігура 2 Фігура 2A: Імуноблот з антитілом калстабіну1, який показує рівні калстабіну1 в імунопреципітованих комплексах RyR1 з лізатів великогомілкового м'яза мишей, яким вводили носій (50:50 ДМСО/ПЕГ), тільки ізопротеренол (ISO) або ізопротеренол разом із зазначеними концентраціями сполуки 1 в осмотичних насосах. S36 використовується як контроль при 3,6 мМ.
- Фігура 2B: кількісне визначення % калстабіну1, який повторно зв'язується з RyR1.
- Фігура 3 Щурячу модель хронічної серцевої недостатності індукували ішемічно-реперфузійним (I/P) пошкодженням. Для протоколу I/P, передню низхідну ліву (ПНЛ) коронарну артерію перетискали протягом 1 години.
- Фігура 4 Об'єми лівого шлуночка (ЛШ) і фракція викиду (ФВ) у щурів, які отримували сполуку 1 по 5 мг/кг/добу (5МК) або 10 мг/кг/добу (10МК) у питній воді, в порівнянні з тваринами, які отримували носій (H₂O), і тваринами, які отримували плацебо. Хронічна серцева недостатність була індукована ішемічно-реперфузійним (I/P) пошкодженням. ПНЛ артерію перетискали протягом 1 години; лікування почалося через 1 тиждень після реперфузії і тривало протягом 3 місяців. Ехокардіографічні параметри були отримані після 1, 2 або 3 місяців лікування. Фігура 4A: Кінцево-діастолічний об'єм ЛШ; Фігура 4B: Кінцево-сistolічний об'єм ЛШ; Фігура 4C: ФВ. Фігури 4A і 4B: §P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо; *P<0,05 у порівнянні з тваринами, які отримували носій; †P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували носій. Фігура 4C: §P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо, †P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували носій.
- Фігура 5 Фігури 5A-С зображують вагу тіла (BW) (5A), розмір інфаркту (5B), вагу ЛШ (5C), а Фігура 5D зображує вміст колагену у щурів, які отримували сполуку 1 по 5 мг/кг/добу (5МК) або 10 мг/кг/добу (10МК) у питній воді, в порівнянні з тваринами, які отримували носій (H₂O), і тваринами, які отримували плацебо. Хронічна серцева недостатність була індукована ішемічно-реперфузійним (I/P) пошкодженням. ПНЛ артерію перетискали протягом 1 години; лікування почалося через 1 тиждень після реперфузії і тривало протягом 3 місяців. Параметри були виміряні після 3 місяців лікування. Фігури 5A-С: не мають істотного значення. Фігура 5D: †††P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо; *P<0,05 у порівнянні з тваринами, які отримували носій.
- Фігура 6 Інвазивна гемодинаміка: систолічний тиск крові у лівому шлуночку (СТ ЛШ) (6A), dP/dtmax (6B); та dP/dtmin (6C) у щурів, які отримували сполуку 1 по 5 мг/кг/добу (5МК) або 10 мг/кг/добу (10МК) у питній воді в порівнянні з тваринами, які отримували носій (H₂O), і тваринами, які отримували плацебо. Хронічна серцева недостатність була індукована ішемічно-реперфузійним (I/P) пошкодженням. ПНЛ артерію перетискали протягом 1 години; лікування почалося через 1 тиждень після реперфузії і тривало протягом 3 місяців. Гемодинамічні параметри вимірювалися після 3 місяців лікування. Фігура 6A: не має істотного значення. Фігура 6B: § P<0,05 у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо; *P<0,05 у порівнянні з тваринами, які отримували носій. Фігура 6C: †P<0,01 у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо; *P<0,05 у порівнянні з тваринами, які отримували носій.
- Фігура 7 Концентрації сполуки 1 у плазмі □(мкМ) залежно від часу доби.

- Фігура 8 Фракція викиду (ФВ) у щурів, які отримували сполуку 1 або сполуку А по 5 мг/кг/добу (5МК) у питній воді, в порівнянні з тваринами, які отримували носій (H₂O), і тваринами, які отримували плацебо. ПНЛ артерію перетискали протягом 1 години; лікування почалося через 1 тиждень після реперфузії і тривало протягом 3 місяців. Ехокардіографічні параметри були отримані після 1, 2 або 3 місяців лікування. §P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо; *P<0,05 у порівнянні з тваринами, які отримували носій; †P<0,001 у порівнянні з тваринами, які отримували носій.
- Фігура 9 Вплив сполуки 1 на спонтанну фізичну активність мишей mdx і WT у порівнянні з контрольними тваринами, які отримували носій (H₂O). P<0.001 протягом 1-19 днів активності у мишей mdx, які отримували 10 і 50 мг/кг/добу (цільової дози) разом з питною водою, в порівнянні з контрольними тваринами, які отримували носій.
- Фігура 10 Співвідношення питомої сили-частоти м'яза довгого розгинача пальців (ДРП). Миші (А) mdx отримували сполуку 1 (5, 10 і 50 мг/кг/добу (цільова доза)), яку вводили разом з питною водою, у порівнянні з контрольними тваринами, які отримували носій (H₂O) (n=5). p <0,05, для дози по 50 мг/кг/добу, при частоті 150 Гц і вище. Миші (В) WT, C57BL/6 отримували сполуку 1 (50 мг/кг/добу (цільова доза) разом з питною водою, у порівнянні з контрольними тваринами, які отримували носій (H₂O) (n=4).
- Фігура 11 Середня вага тіла (12А) і середнє споживання води (12В) у мишей mdx і мишей дикого типу, які отримували носій (H₂O) або сполуку 1 (50 мг/кг/добу (цільова доза) разом з питною водою.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

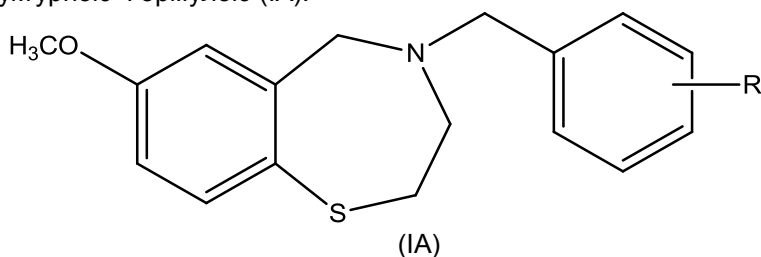
Слід мати на увазі, що докладний опис і конкретні приклади, які вказують на різні варіанти здійснення винаходу, наведені тільки як ілюстрація, оскільки різні зміни і модифікації в межах сутності та обсягу винаходу стануть очевидними для фахівців в даній галузі техніки з цього докладного опису.

Як використовуються в даному описі і у формулі винаходу, що додається, форми однини включають в себе посилання на множину, якщо зміст чітко не вказує на зворотне. Всі публікації, патентні заявки, патенти та інші посилання, згадані тут, включені у всій їх повноті шляхом посилання.

Термін "RycalsTM" відноситься до стабілізаторів кальцієвих каналів рецептора ріанодину (RyR), представлених сполуками загальної Формули (I) або (IA), які пропонуються винаходом, а також конкретними сполуками, позначеними цифровими номерами, як це передбачено винаходом, і тут усі разом називаються "сполукою (сполуками) за винаходом".

Сполуки

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за даним винаходом представлені структурною Формулою (IA):



де

R являє собою COOH або її біоізомер, COOR¹ або CN; і

R¹ являє собою C₁-C₄ алкіл;

і їх фармацевтично прийнятні солі.

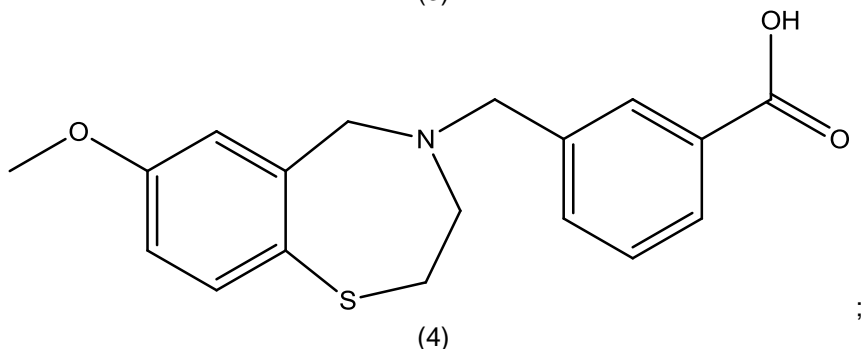
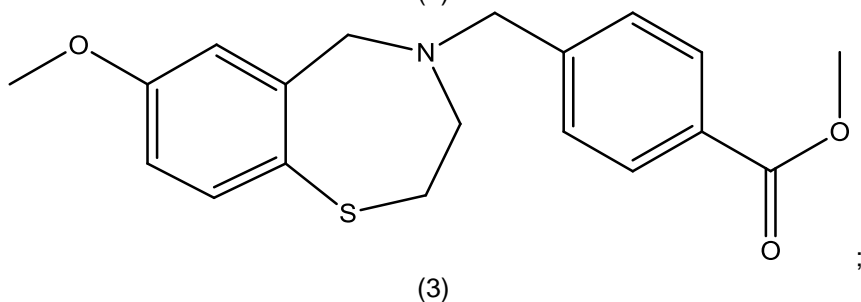
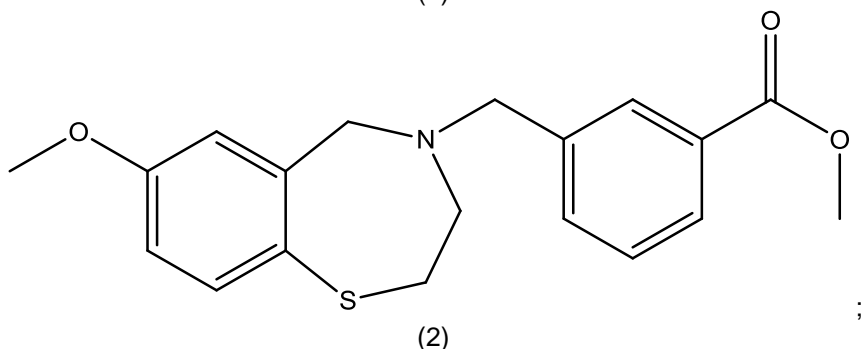
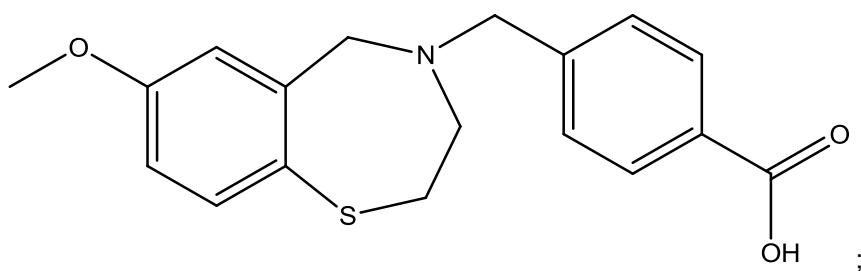
У деяких переважних варіантах здійснення R у Формулі (I) являє собою карбонову кислоту (COOH). В інших переважних варіантах здійснення R у Формулі (I) являє собою біоізомер карбонової кислоти, наприклад, тетразол. Альтернативно, біоізомер карбонової кислоти може являти собою кислотний гетероцикл, такий як 1,2,4-оксадіазол-5(4H)-он, 1,2,4-тіадіазол-5(4H)-он, 1,2,4-оксадіазол-5 (4H)-тіон, 1,3,4-оксадіазол-2(3H)-тіон, 4-метил-1H-1,2,4-триазол-5(4H) - тіон, 5-фтороротова кислота, тощо. Додаткові біоізостери карбонових кислот описані, наприклад, у 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.

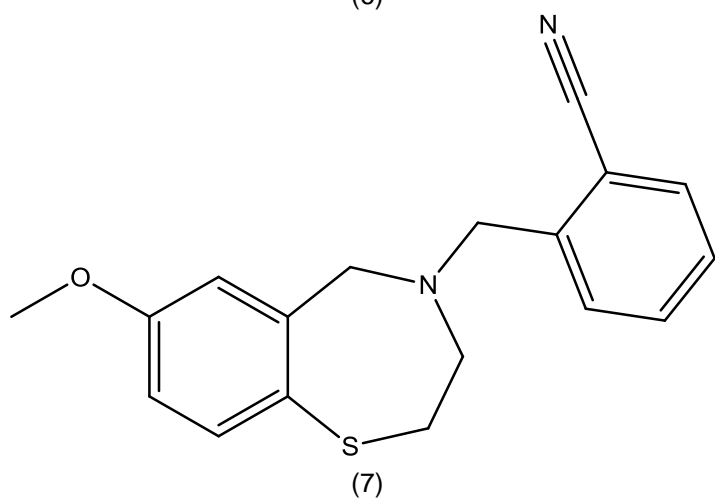
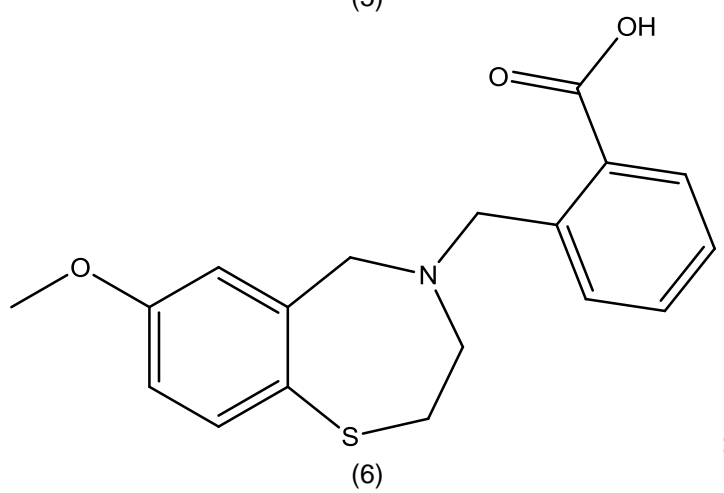
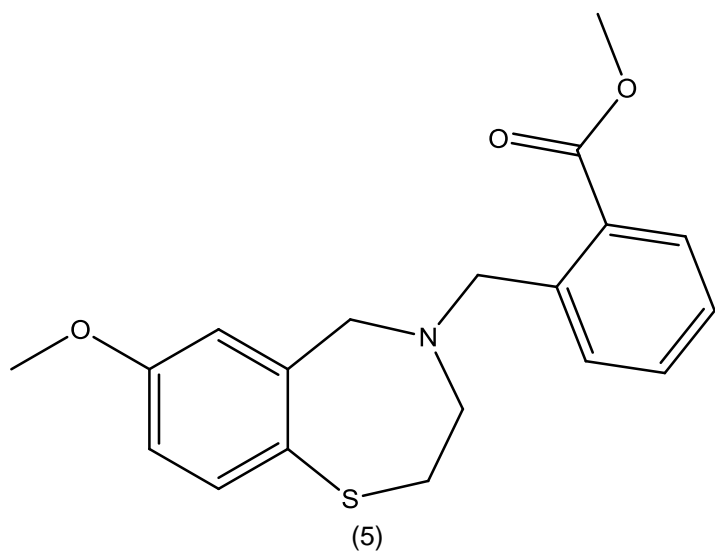
2006; 16: 2380-2386; and Kohara, Y. et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995; 5(17): 1903-1908. Зміст кожного із зазначених вище посилань включено тут шляхом посилання.

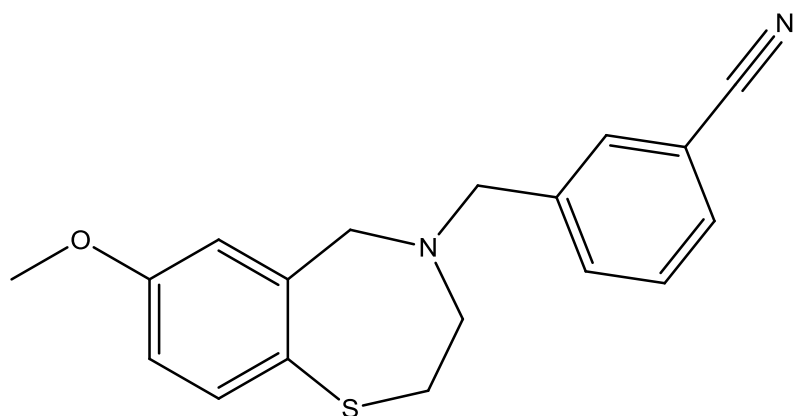
В одному переважному варіанті здійснення винаходу сполуки за даним винаходом представлені структурою Формули (IA) де R являє собою COOH і її фармацевтично прийнятні солі (наприклад, сполуку Формули (I)).

В інших переважних варіантах здійснення R у Формулі (IA) знаходиться в положенні 4 фенільного кільця (тобто положенні 7 бензотіазепінового кільця). Кожна можливість представляє собою окремий варіант здійснення даного винаходу. Сполуки Формули (IA) або (I) можуть бути присутніми у формі солі з фармацевтично прийнятною кислотою або основою. Такі солі переважно обирають із групи, що складається з солей натрію, калію, магнію, геміфумарату, гідрохлориду та гідроброміду, причому кожна така можливість представляє собою окремий варіант здійснення даного винаходу. На даний момент переважною сіллю є натрієва сіль. Іншою переважною сіллю на даний момент є сіль геміфумарату.

У деяких конкретних варіантах здійснення сполуку обирають з групи, що складається зі сполуки 1, сполуки 2, сполуки 3, сполуки 4, сполуки 5, сполуки 6, сполуки 7, сполуки 8, сполуки 9, сполуки 10, сполуки 11, сполуки 12, і їх фармацевтично прийнятних солей. Ці сполуки представлені такими структурами:

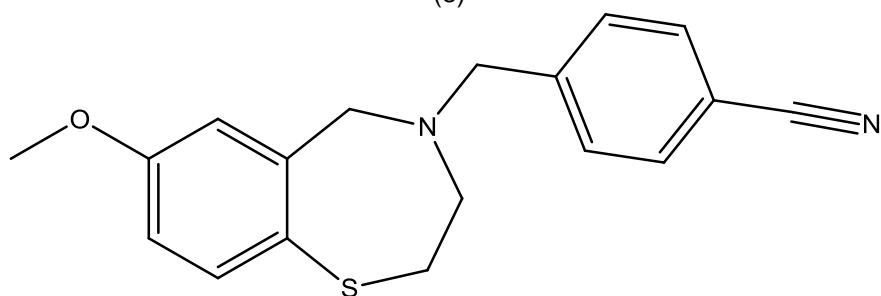






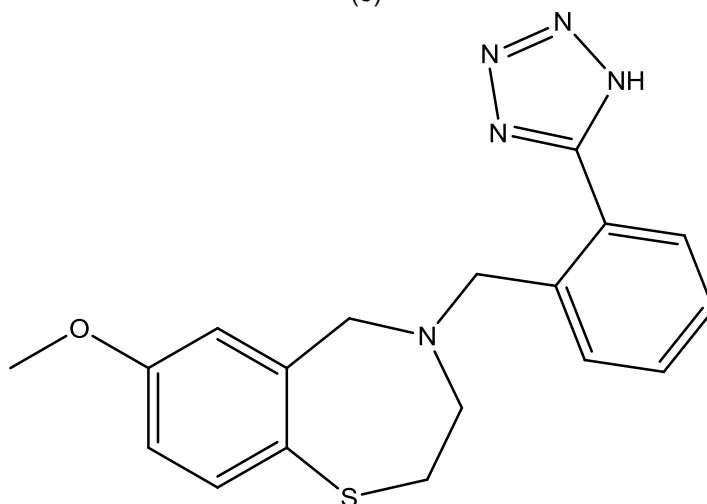
(8)

;



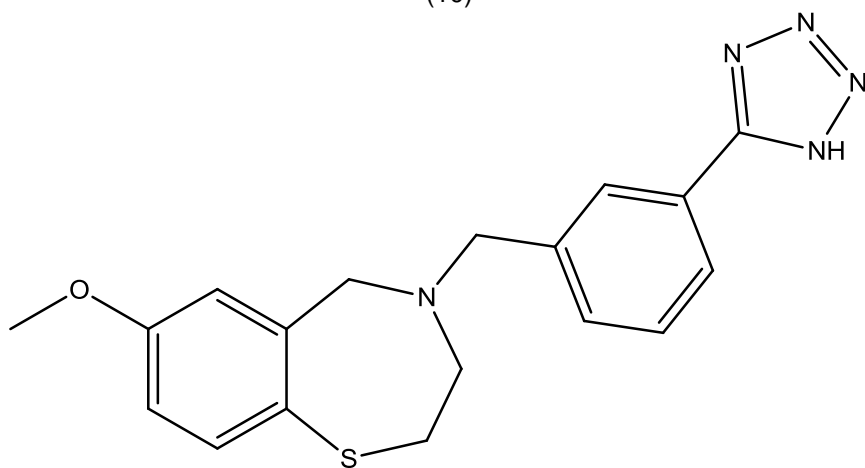
(9)

;



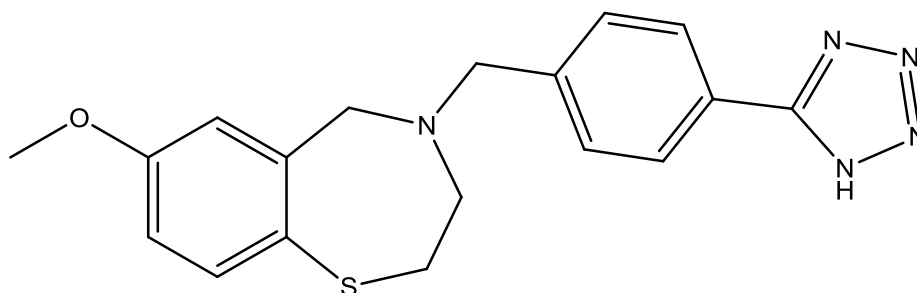
(10)

;



(11)

; i



(12)

Хімічні визначення:

Термін "алкіл", як використовується тут, відноситься до лінійного або розгалуженого насиченого вуглеводню, який містить від 1 до 4 атомів вуглецю ("C₁-C₄ алкіл"). Репрезентативні алкільні групи включають в себе, але не обмежуються, метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, втор-бутіл і трет-бутіл. Алкільна група може бути незаміщеною або заміщеною однією або кількома групами, обраними з галогену, галоалкілу, гідрокси, алкокси, галоалкокси, циклоалкілу, арилу, гетероциклілу, гетероарилу, амідю, алкіламідю, діалкіламідю, нітро, аміно, ціано, N₃, оксо, алкіламіно, діалкіламіно, карбоксилу, тію, тіоалкілу і тіоарилу.

Сполуки за даним винаходом можуть існувати у своїй таутомерній формі. Всі такі таутомерні форми розглядаються тут як частина даного винаходу.

Усі стереоізомери сполук за даним винаходом (наприклад, ті, які можуть існувати завдяки асиметричним атомам вуглецю у різних замісниках), в тому числі енантіомерні форми та діастереомерні форми, розглядаються як такі, що включені в обсяг даного винаходу. Окремі стереоізомери сполук за винаходом можуть, наприклад, бути по суті вільними від інших ізомерів (наприклад, у вигляді чистого або по суті чистого оптичного ізомеру, який має зазначену активність) або можуть бути змішаними, наприклад, у вигляді рацематів, або у вигляді сумішей збагачених одним стереоізомером. Хіральні центри за даним винаходом можуть мати конфігурацію S або R, як визначено у Рекомендаціях Міжнародного союзу теоретичної і прикладної хімії (IUPAC 1974). Рацемічні форми можуть бути відокремлені фізичними методами, такими як, наприклад, фракційна кристалізація, відокремлення або кристалізація діастереомерних похідних або відокремлення за допомогою хіральної колонкової хроматографії. Окремі оптичні ізомери можуть бути отримані з рацематів будь-яким придатним способом, включаючи, без обмеження, звичайні способи, такі як, наприклад, утворення солі за допомогою оптично активної кислоти або основи з подальшою кристалізацією.

Сполуки за даним винаходом, після їх приготування, переважно є виділеними і очищеними для отримання композиції, що містить кількість за вагою, яка дорівнює або є більшою, ніж близько 90 % сполуки, близько 95 % сполуки, і навіть більш переважно більше ніж близько 99 % сполуки ("по суті чистої" сполуки), яка потім використовується або застосовується у рецептурі, як описано тут. Такі "по суті чисті" сполуки за даним винаходом також розглядаються тут як частина даного винаходу.

Терапевтичне застосування

Даний винахід відноситься до сполук, які є придатними для лікування станів, порушень і захворювань, пов'язаних з RyR. Більш конкретно, даний винахід відноситься до сполук, які є придатними для усунення витоку в каналах RyR, що можуть являти собою канали RyR1, RyR2 та/або RyR3. В одному варіанті здійснення сполуки за даним винаходом покращують зв'язування та/або інгібують дисоціацію RyR і калстабіну (наприклад, RyR1 і калстабіну1; RyR2 і калстабіну2 і RyR3 і калстабіну1). "Стани, порушення і захворювання, пов'язані з RyR" означають порушення і захворювання, які можуть лікуватися та/або попереджатися шляхом модуляції RyR і включають в себе, без обмеження, серцеві порушення та захворювання, м'язову втому, скелетно-м'язові порушення та захворювання, порушення та захворювання ЦНС, когнітивну дисфункцію, нервово-м'язові захворювання та порушення, покращення когнітивної функції, ураження та захворювання кісток, ракову кахексію, злоякісну гіпертермію, цукровий діабет, раптову серцеву смерть і синдром раптової дитячої смерті.

Таким чином, в одному варіанті здійснення даний винахід відноситься до способу лікування або профілактики стану, обраного з групи, що складається з серцевих порушень та захворювань, м'язової втоми, скелетно-м'язових порушень та захворювань, порушень та захворювань ЦНС, когнітивної дисфункції, нервово-м'язових захворювань та порушень, уражень та захворювань кісток, ракової кахексії, злоякісної гіпертермії, цукрового діабету, раптової серцевої смерті і синдрому раптової дитячої смерті, або для покращення когнітивної функції, причому спосіб включає в себе стадію введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично

ефективної кількості сполуки Формули (I) або (IA), як описано тут, або її солі, для здійснення такого лікування. На даний момент переважною сполукою є сполука Формули (1).

В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до використання ефективної кількості сполуки Формули (I) або (IA), як описано тут, або її солі, для виготовлення лікарського засобу для лікування або профілактики стану, обраного з групи, що складається з серцевих порушень та захворювань, м'язової втоми, скелетно-м'язових порушень та захворювань, порушень та захворювань ЦНС, нервово-м'язових захворювань та порушень, когнітивної дисфункції, уражень та захворювань кісток, ракової кахексії, злоякісної гіпертермії, цукрового діабету, раптової серцевої смерті і синдрому раптової дитячої смерті, або для покращення когнітивної функції. На даний момент переважною сполукою є сполука Формули (1).

В іншому варіанті здійснення даний винахід відноситься до сполуки Формули (I) або (IA), як описано тут, або її солі, для використання при виготовленні лікарського засобу для лікування або профілактики стану, обраного з групи, що складається з серцевих порушень та захворювань, м'язової втоми, скелетно-м'язових порушень та захворювань, порушень та захворювань ЦНС, когнітивної дисфункції, нервово-м'язових захворювань та порушень, уражень та захворювань кісток, ракової кахексії, злоякісної гіпертермії, цукрового діабету, раптової серцевої смерті і синдрому раптової дитячої смерті, або для покращення когнітивної функції. На даний момент переважною сполукою є сполука Формули (1).

В одному варіанті здійснення стан, порушення або захворювання є пов'язаним з аномальною функцією RyR1. В іншому варіанті здійснення стан, порушення або захворювання є пов'язаним з аномальною функцією RyR2. В іншому варіанті здійснення стан, порушення або захворювання є пов'язаним з аномальною функцією RyR3. Кожна можливість представляє собою окремий варіант здійснення даного винаходу.

Серцеві порушення і захворювання включають в себе, але не обмежуються, порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, викликаним фізичним навантаженням, серцеву недостатність, застійну серцеву недостатність, хронічну серцеву недостатність, гостру серцеву недостатність, систолічну серцеву недостатність, діастолічну серцеву недостатність, гостру декомпенсовану серцеву недостатність, ішемічно-реперфузійне (I/P) пошкодження серця (у тому числі ішемічно-реперфузійне пошкодження після коронарної ангіопластики або після тромболізу при інфаркті міокарда (IM)), хронічну обструктивну хворобу легень і високий кров'яний тиск. Порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, включають в себе, але не обмежуються, передсердну і шлуночкову аритмію, передсердну і шлуночкову фібриляцію, передсердну і шлуночкову тахіаритмію, передсердну і шлуночкову тахікардію, катехоламінергічну поліморфну шлуночкову тахікардію (КПШТ) та їх варіанти, викликані фізичним навантаженням.

Сполуки за винаходом також є корисними при лікуванні м'язової втоми, яка може виникати в результаті тривалого фізичного навантаження або високоінтенсивного фізичного навантаження, або може бути викликана скелетно-м'язовими захворюваннями. Приклади скелетно-м'язових порушень і захворювань включають в себе, але не обмежуються, скелетно-м'язову втому, хворобу серцевини м'язових волокон, скелетно-м'язову втому, викликану фізичним навантаженням, ураження сечового міхура, нетримання сечі, скелетно-м'язову втому, пов'язану з віком, саркопенію, вроджені міопатії, скелетно-м'язові міопатії та/або атрофії, ракову кахексію, міопатію з ураженням серцевини і стрижнів м'язових волокон, мітохондріальні міопатії [наприклад, синдром Кірнса-Сейра (Kearns-Sayre), синдром MELAS (мітохондріальна міопатія, енцефалопатія, лактацидоз та інсульт) і синдром MERRF (міоклонічна епілепсія з рваними червоними волокнами)], ендокринні міопатії, хвороби накопичення м'язового глікогену [наприклад, хвороба Помпе (Pompe), хвороба Андерсен (Andersen) і хвороба Корі (Cori)], міоглобінурії [наприклад, хвороба Мак-Ардла (McArdle), хвороба Таруї (Tarui) і хвороба ДіМауро (DiMauro)], дерматоміозит, осифікуючий міозит, сімейний періодичний параліч, поліміозит, міозит з включеними тільцями, нейроміотонію, синдром скутої людини, злоякісну гіпертермію, загальні м'язові судоми, тетанію, міастенію гравіс, спинальну м'язову атрофію (СМА), спинальну і бульбарну м'язову атрофію (СБМА, також відому як спинобульбарна м'язова атрофія, бульбоспинальна атрофія, бульбоспинальна невропатія, зчеплена з Х-хромосомою (ХBSN), спинальна м'язова атрофія типу 1, зчеплена з Х-хромосомою (SMAХ1) і хвороба Кеннеді (KD)) і м'язову дистрофію. Переважні скелетно-м'язові порушення включають в себе, але не обмежуються, скелетно-м'язову втому, викликану фізичним навантаженням, вроджену міопатію, м'язову дистрофію, скелетно-м'язову втому, пов'язану з віком, саркопенію, хворобу серцевини м'язових волокон, ракову кахексію, ураження сечового міхура і нетримання сечі.

Приклади м'язової дистрофії включають в себе, але не обмежуються, м'язову дистрофію Дюшена (МДД), м'язову дистрофію Беккера (МДБ), поясно-кінцівкову дистрофію (ПКД) -

дистрофію Лейдена), вроджену м'язову дистрофію (ВМД), дистальну м'язову дистрофію, плече-лопаточно-лицеву дистрофію, міотонічну м'язову дистрофію, м'язову дистрофію Емері-Дрейфуса (Emery-Dreifuss) і окулофарінгеальну м'язову дистрофію, причому МДД на даний момент є переважною.

Вроджена м'язова дистрофія, як використовується тут, відноситься до м'язової дистрофії, яка має місце при народженні. ВМД класифікується на основі генетичних мутацій: 1) гени, що кодують структурні білки базальної мембрани або позаклітинного матриксу скелетно-м'язових волокон; 2) гени, що кодують передбачувані або виражені глікозилтрансферази, які в свою чергу впливають на глікозилювання з дістрогліканом, зовнішнім мембранним білком базальної мембрани; та 3) інші. Приклади ВМД, включають, але не обмежуються, ламінін- $\alpha 2$ -дефіцитну ВМД (MDC1A), ВМД Ульріха (UCMD 1, 2 і 3), синдром Уокера-Варбурга (WWS), захворювання м'язів-очей-головного мозку (МОВ), ВМД Фукуяма (FCMD), ВМД плюс вторинний дефіцит ламініну 1 (MDC1B), ВМД плюс вторинний дефіцит ламініну 2 (MDC1C), ВМД з розумовою відсталістю та пахігірією (MDC1D) та синдром ригідного хребта з м'язовою дистрофією типу 1 (RSM1).

Когнітивна дисфункція може бути пов'язана або включає в себе, але не обмежується, втрату пам'яті, втрату пам'яті, що залежить від віку, синдром посттравматичного стресу (ПТСР), синдром дефіциту уваги і гіперактивності (СДУГ), розлад аутистичного спектру (РАС), генералізований тривожний розлад (ГТР), obsесивно-компульсивний розлад (ОКР), шизофренію, біполярний розлад або велику депресію.

Порушення і захворювання ЦНС включають в себе, але не обмежуються, хворобу Альцгеймера (ХА), нейропатію, судоми, хворобу Паркінсона (ХП) і хворобу Хантінгтона (ХХ).

Нервово-м'язові порушення і захворювання включають в себе, але не обмежуються, спинально-церебелярну атаксію (СЦА) і бічний аміотрофічний склероз (БАС, хворобу Лу Геріга).

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за даним винаходом поліпшують когнітивну функцію, яка може бути обрана з короткочасної пам'яті, довготривалої пам'яті, уваги, навчання та будь-якої їх комбінації.

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за даним винаходом є корисними при лікуванні ракової кахексії, тобто, м'язової слабкості, що пов'язана з раком в цілому, і, переважно, м'язової слабкості при метастатичному раку, наприклад, метастази в кістки. М'язова слабкість і атрофія м'язів (кахексія) є загальними паранеопластичними симптомами у онкологічних хворих. Такі стани спричиняють значну втому і різко знижують якість життя пацієнта. Даний винахід відноситься до способу лікування і профілактики м'язової слабкості у пацієнта, що хворіє на рак, ґрунтуючись, зокрема, на відкритті, що, у деяких видів раку, наприклад, раку передміхурової залози і раку молочної залози з метастазами в кістки, RyR1 окислюється і це призводить до втрати його "герметичності". Крім того, було встановлено, що профілактика витоку шляхом введення сполук "Rycal" покращує функцію м'язів. Приклади раку включають в себе, але не обмежуються, рак молочної залози, рак передміхурової залози, рак кісток, рак підшлункової залози, рак легенів, рак товстої кишки і рак шлунково-кишкового тракту.

Терапія пропуску екзонів

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки за даним винаходом модулюють (наприклад, посилюють) сплайсинг мРНК шляхом посилення пропуску екзонів, опосередкованого антисмисловими олігонуклеотидами. Така модуляція сплайсингу здійснюється у присутності антисмислових олігонуклеотидів (АО), які є специфічними для послідовностей сплайсингу, що представляють інтерес. У деяких варіантах здійснення даного винаходу, сполука формули (I) або (IA) і АО можуть діяти синергічно, причому сполука формули (I) або (IA) посилює пропуск екзонів, опосередкований АО. Таким чином, у деяких варіантах здійснення даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції для використання при лікуванні або профілактиці будь-якого зі станів, описаних тут, які пов'язані з негерметичним RyR, додатково включаючи використання антисмислового олігонуклеотиду, який є специфічним для послідовності сплайсингу у послідовності мРНК, для посилення пропуску екзонів у мРНК-мішені.

Один конкретний варіант для посилення пропуску екзонів за допомогою сполук за даним винаходом стосується м'язової дистрофії Дюшена (МДД). МДД являє собою смертельну рецесивну хворобу, зчеплену з Х-хромосомою, що характеризується прогресуючою м'язовою слабкістю протягом усього життя пацієнта. МДД, в першу чергу, викликана множинними делеціями екзонів зі зміною рамки читування у гені МДД, що призводить до абляції виробництва білка дистрофіну. Втрата експресії дистрофіну, сама по собі, не пояснює патофізіології МДД. Пошкодження дистрофін-глікопротеїнового комплексу (ДГК) також призводить до окислювального стресу, мітохондріального перевантаження Ca^{2+} та апоптозу,

підвищення припливу Ca^{2+} у м'язи і сигналізації патологічного Ca^{2+} . МДД немає радикальної терапії і єдиним підтвердженням фармакологічним лікуванням є прийом кортикостероїдів, які можуть продовжити здатність пересуватися, але мають суттєві побічні ефекти. Пропуск екзонів, опосередкований антисмисловим олігонуклеотидом, є перспективним терапевтичним підходом, спрямованим на відновлення рамки зчитування МДД і забезпечує експресію непошкодженого дистрофін-глікопротеїнового комплексу. На сьогоднішній день, низькі рівні білка дистрофіну були вироблені у людей за допомогою цього способу. Kendall et al. (Sci Transl Med, 2012, 4(164), p. 164ra160) повідомляли про те, що деякі малі молекули, такі як дантролен та інші модулятори RyR, стимулюють пропуск екзонів з використанням антисмислових олігомерів для підвищення пропуску екзонів з метою відновлення рамки зчитування мРНК, сарколемного білка дистрофіну і дистрофін-глікопротеїнового комплексу у скелетних м'язах мишей mdx, мишачої моделі МДД.

Таким чином, в одному варіанті здійснення даний винахід відноситься до способу лікування МДД шляхом введення пацієнту, який цього потребує, сполуки формули (I) або (IA) відповідно до даного винаходу, у поєднанні з антисмисловим олігонуклеотидом (АО), який є специфічним для послідовності сплайсингу одного або більше екзонів гена МДД, наприклад екзону 23, 45, 44, 50, 51, 52 та/або 53 гена МДД. Переважні АО включають в себе, але не обмежуються, АО, націлені на екзон МДД 23, 50 та/або 51 гена МДД, наприклад, 2'-О-метил (2'ОМе) тіофосфат або фосфордіамідат морфоліно (PMO) АО. Приклади таких АО, включають в себе, але не обмежуються, Pro051/GSK2402968, AVI4658/Eteplirsen і PMO E23 морфоліно (5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3').

Термін "ефективна кількість", "достатня кількість" або "терапевтично ефективна кількість" агента, як використовується тут взаємозамінно, означає, що кількість є достатньою для досягнення корисних або бажаних результатів, у тому числі клінічних результатів і, як така, "ефективна кількість" або її варіанти, залежить від контексту, в якому вона застосовується. Реакція у деяких варіантах здійснення є профілактичною, в інших - терапевтичною, і ще в інших варіантах являє собою їх поєднання. Термін "ефективна кількість" також включає в себе кількість сполуки за даним винаходом, яка є "терапевтично ефективною", і яка дозволяє уникнути або істотно послаблює небажані побічні ефекти.

Як використовується в даному описі, а також є добре відомим у даній галузі техніки, термін "лікування" являє собою підхід для отримання корисних або бажаних результатів, у тому числі клінічних результатів. Корисні або бажані клінічні результати можуть включати в себе, але не обмежуються, полегшення або поліпшення одного або більше симптомів або станів, зниження ступеня захворювання, стабілізацію (тобто, не погіршення) стану захворювання, запобігання поширенню хвороби, затримку або уповільнення прогресування захворювання, покращення або тимчасове полегшення хворобливого стану і ремісію (або часткову, або повну), що піддається або не піддається виявленню. "Лікування" може також означати подовження виживання у порівнянні з очікуваним виживанням, за умови неотримання лікування.

Фармацевтичні композиції

Сполуки за винаходом виготовляють у вигляді фармацевтичних композицій для введення пацієнту-людині у біологічно сумісній формі, придатній для введення *in vivo*. Відповідно до іншого аспекту, даний винахід відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить сполуки за винаходом у суміші з фармацевтично прийнятним розріджувачем та/або носієм. Фармацевтично-прийнятний носій, переважно є "прийнятним" у сенсі сумісності з іншими інгредієнтами композиції і не має шкідливого впливу на реципієнта, який приймає його.

Сполука може вводиться окремо, але переважно її вводять з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями. Фармацевтично прийнятний носій, який використовується в даному описі, може бути обраний з різних органічних або неорганічних матеріалів, які використовуються як матеріали для фармацевтичних композицій і, які включені як будь-який один або більше з наповнювачів, розріджувачів, зв'язуючих речовин, розпушувачів, буферів, барвників, емульгаторів, агентів, що покращують смак, гелеутворювачів, ковзаючих речовин, консервантів, солюбілізаторів, стабілізаторів, суспендуючих агентів, підсолоджувачів, тонізуючих агентів, змочуючих агентів, емульгуючих агентів, диспергуючих агентів, агентів, що викликають набухання, сповільнювачів, змащувальних речовин, абсорбентів і агентів, що підвищують в'язкість.

Сполуки за даним винаходом вводять пацієнту-людині або тварині за допомогою відомих процедур, в тому числі, без обмеження, шляхом перорального, сублінгвального, буккального, парентерального (внутрішньовенного, внутрішньом'язового або підшкірного), трансдермального, підшкірного або чрезшкірного, інтраназального, інтравагінального, ректального, очного та респіраторного (через інгаляцію) введення. Сполуки за даним винаходом також можуть вводиться пацієнту шляхом доставки до м'язів пацієнта, в тому числі,

але не обмежуючись, до серцевих або скелетних м'язів пацієнта. В одному варіанті здійснення сполука вводиться пацієнту шляхом спрямованої доставки до клітин серцевого м'яза через катетер, введений у серце пацієнта. В інших варіантах здійснення сполуки можуть бути введені безпосередньо у ЦНС, наприклад, шляхом ендолюмбальної ін'єкції або інтравентрикулярної інфузії сполук безпосередньо у спинномозкову рідину (СМР), або шляхом інтравентрикулярного, інтратекального або інтерстиціального введення. Пероральне введення є переважним на даний момент.

Фармацевтичні композиції відповідно до винаходу для перорального введення у твердій формі включають в себе, зокрема, таблетки або драже, під'язикові таблетки, саше, капсули, в тому числі желатинові капсули, порошки, гранули, а композиції для перорального, назального, буккального або очного введення у рідкій формі включають в себе, зокрема, емульсії, розчини, суспензії, краплі, сиропи і аерозолі. Сполуки також можуть бути введені у вигляді суспензії або розчину з питною водою або з їжею. Приклади прийнятних фармацевтичних носіїв включають в себе, але не обмежуються, похідні целюлози, в тому числі карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гідроксипропілцеллюлозу, гідроксипропілметилцеллюлозу, етилцеллюлозу та мікрокристалічну целюлозу; цукор, такий як маніт, сахарозу або лактозу; гліцерин, аравійську камедь, стеарат магнію, стеарилфумарат натрію, фізіологічний розчин, альгінат натрію, крохмаль, тальк та воду, серед інших.

Фармацевтичні композиції відповідно до винаходу для парентеральних ін'єкцій включають в себе, зокрема, стерильні розчини, які можуть бути водними або неводними, дисперсії, суспензії або емульсії, а також стерильні порошки для відновлення ін'єкційних розчинів або дисперсій. Сполуки за винаходом можуть бути з'єднані зі стерильним водним розчином, який є ізотонічним з кров'ю пацієнта. Такий склад отримують шляхом розчинення твердого активного інгредієнта у воді, яка містить фізіологічно сумісні речовини, такі як хлорид натрію, гліцин тощо, і має буферний рН, сумісний з фізіологічними умовами, таким чином, щоб утворити водний розчин, який згодом набуває стерильності. Склад міститься у разових або багаторазових дозованих контейнерах, наприклад, герметичних ампулах або флаконах. Склад доставляється будь-яким видом ін'єкції, в тому числі, без обмеження, епіфасціальним, інтракапсулярним, внутрішньочерепним, внутрішньошкірним, інтратекальним, внутрішньом'язовим, інтраорбітальним, внутрішньочеревним, інтраспинальним, інтрастернальним, внутрішньосудинним, внутрішньовенним, паренхіматозним, підшкірним або сублінгвальним шляхом, або через катетер, введений у серце пацієнта.

Фармацевтичні композиції для ректального або вагінального введення являють собою переважно супозиторії, а композиції для підшкірного або чре́зшкірного введення включають в себе, зокрема, порошки, аерозолі, креми, мазі, гелі та пластирі.

Для чре́зшкірного введення, сполуки за даним винаходом поєднують з підсилювачами чре́зшкірного проникнення, такими як пропіленгліколь, поліетиленгліколь, ізопропанол, етанол, олеїнова кислота, N-метилпіролідон, тощо, які покращують проникність шкіри для сполук за винаходом, і дозволяють сполукам проникати через шкіру у кровотік. Композиції сполук/підсилювача можуть також додатково поєднуватися з полімерною речовиною, такою як етилцелюлоза, гідроксипропілцелюлоза, етилен/вінілацетат, полівінілпіролідон, тощо, для отримання композиції у формі гелю, яка розчиняється в розчиннику, випарюється до бажаної в'язкості, а потім наноситься на матеріал основи для отримання пластиру.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом отримують способами, добре відомими у фармацевтичній галузі, включаючи, але не обмежуючись, способи мокрої і сухої грануляції, або шляхом прямого пресування. Вибір носія визначається розчинністю і хімічною природою сполук, обраним шляхом введення і стандартною фармацевтичною практикою.

Фармацевтичні композиції, зазначені вище, ілюструють винахід, але жодним чином не обмежують його.

Відповідно до способів здійснення даного винаходу, будь-яка з цих сполук може бути введена пацієнту (або контактує з клітинами пацієнта) у кількості, ефективній для обмеження або запобігання зниженню рівня RyR-пов'язаного калстабіну у пацієнта, зокрема, у клітинах пацієнта. Ця кількість легко визначається фахівцем у даній галузі техніки, на основі відомих процедур, в тому числі аналізу кривих титрування, визначених *in vivo*, і способів та аналізів, описаних тут. Відповідна кількість сполук за винаходом, ефективна для обмеження або запобігання зниженню рівня RyR-пов'язаного калстабіну у пацієнта знаходиться в діапазоні від близько 0,01 мг/кг/добу до близько 100 мг/кг/добу (наприклад, 1, 2, 5, 10, 20, 25, 50 або 100 мг/кг/добу), та/або є кількістю, достатньою для досягнення рівнів плазми в діапазоні від близько 300 нг/мл до близько 5000 нг/мл. Альтернативно, кількість сполук за винаходом знаходиться в діапазоні від близько 1 мг/кг/добу до близько 50 мг/кг/добу. Альтернативно, кількість сполук за

винаходом знаходиться в діапазоні від близько 10 мг/кг/добу до близько 20 мг/кг/добу. Крім того, тут включені кількості від близько 0,01 мг/кг/добу або 0,05 мг/кг/добу до близько 5 мг/кг/добу або близько 10 мг/кг/добу, які можуть вводитися.

Способи синтезу

- 5 Даний винахід забезпечує, у додатковому аспекті, способи отримання сполуки за даним винаходом і її солей. Більш конкретно, даний винахід відноситься до способів отримання сполук Формули (I) або (IA), наприклад, сполуки 1, сполуки 2, сполуки 3, сполуки 4, сполуки 5, сполуки 6, сполуки 7, сполуки 8, сполуки 9, сполуки 10, сполуки 11 і сполуки 12 або їх солей. Різні шляхи синтезу сполук описані у прикладах. Загальний шлях синтезу (ROS) представлено на схемі 1, наведеній нижче:

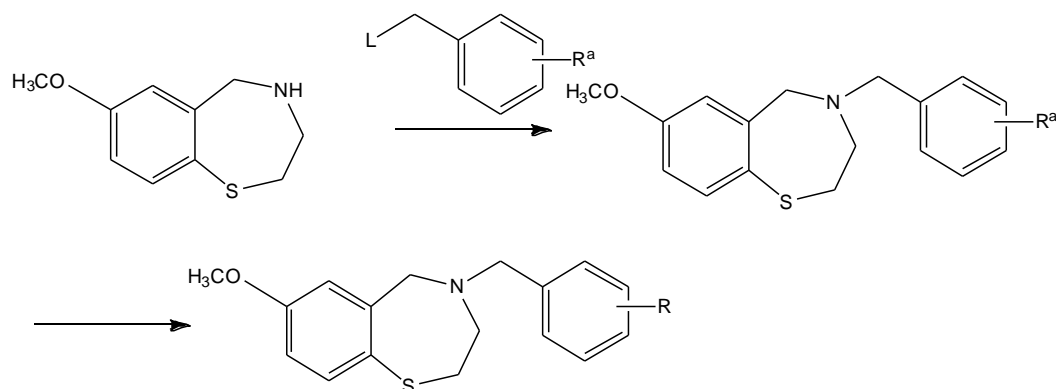


Схема 1

- 15 На схемі 1, R^a являє собою COOR^1 або CN ; R^1 являє собою $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкіл, і L являє собою заміщувану групу, яка, як приклад, являє собою галоген, сульфат ($\text{OSO}_2\text{R}'$, де R' являє собою алкіл або арил, наприклад, OMs (мезилат), OTs (тозилат)), тощо. Амінний вихідний матеріал піддає реакції з алкілюючим агентом (похідною бензилу, зображеною вище), переважно у присутності основи, для отримання бажаного продукту або його попередника ($\text{R}=\text{R}^a$). За
- 20 необхідності, такий попередник додатково може бути підданий реакції для конвертації групи R^a у групу R , як проілюстровано тут у експериментальному розділі нижче, або будь-яким іншим способом, відомим фахівцеві в даній галузі техніки. Наприклад, складноефірний попередник ($\text{R}^a = \text{COOR}^1$, де R^1 являє собою $\text{C}_1\text{-C}_4$ алкіл) може бути конвертований у відповідну карбонову кислоту ($\text{R}=\text{COOH}$) шляхом гідролізу у кислому або лужному середовищі відповідно до відомих
- 25 способів. Альтернативно, нітрилів попередник ($\text{R}^a = \text{CN}$) може бути конвертований у тетразол (ізомер карбонової кислоти) шляхом реакції з азидом натрію у відповідних умовах, або карбонову кислоту ($\text{R}=\text{COOH}$) шляхом гідролізу.

- Амінний вихідний матеріал може бути отриманий у відповідності зі способами, описаними в $\text{WO } 2009/111463$ або $\text{WO } 2007/024717$, або будь-яким іншим способом, відомим фахівцеві в
- 30 даній галузі техніки. Зміст всіх зазначених вище посилань включено тут за допомогою посилання. Тип основи особливо не обмежують. Переважні основи включають в себе, але не обмежуються, гідриди (наприклад, гідрид натрію або калію) і N,N -диізопропілетиламін. Інші відповідні основи включають в себе, але не обмежуються, органічну основу, таку як третинний амін, обраний з групи, що складається з ациклічних амінів (наприклад, триметиламін, триетиламін, диметилфеніламін, диізопропілетиламін і трибутиламін), циклічних амінів (наприклад, N -метилморфолін) і ароматичних амінів (диметиланілін, диметиламінопіридин і піридин).

- Реакція може проводитися в присутності або за відсутності розчинника. Тип розчинника, при використанні, особливо не обмежують, причому приклади включають в себе розчинники, такі як
- 40 складний ефір (наприклад, етилацетат), простий ефір (наприклад, ТГФ), хлорований розчинник (наприклад, дихлорметан або хлороформ), диметилформамід (ДМФ) та інші розчинники, такі як ацетонітрил або толуол, або суміші цих розчинників одного з одним або з водою.

- Солі сполук формули (I), де $\text{R}=\text{COOH}$, можуть бути отримані за допомогою реакції вихідної молекули з відповідною основою, наприклад, NaOH або KOH , з отриманням відповідних солей
- 45 лужних металів, наприклад, натрієвих або калієвих солей. Альтернативно, складні ефіри ($\text{R}=\text{COOR}^1$) можуть бути безпосередньо конвертовані у солі шляхом реакцій з відповідними основами.

Солі сполук формули (I) можуть бути також отримані за допомогою реакції вихідної молекули з відповідною кислотою, наприклад, HCl , фумаровою кислотою або пара-

толуолсульфоною кислотою з отриманням відповідних солей, наприклад, гідрохлориду, тозилату або геміфумарату.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади наведені як ілюстрації деяких переважних варіантів здійснення відповідно до винаходу.

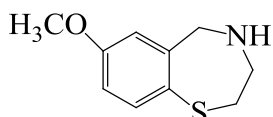
Приклад 1: Синтез

Інструменти:

ЯМР: спектрометр Bruker AVANCE III 400 або Varian Mercury 300

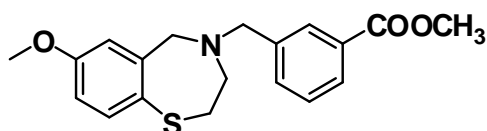
РХ/МС: система хроматографії Waters Delta 600, оснащена автоматичним пробовідбірником AutoSampler 717Plus, детектором на фотодіодній матриці Photo Diode Array Detector 2996 і масовим детектором Mass Detector 3100, або Shimadzu 210.

Загальна процедура для алкілювання 7-метокси-2,3,4,5-тетрагідробензо[е][1,4]тіазепіну ("амін").



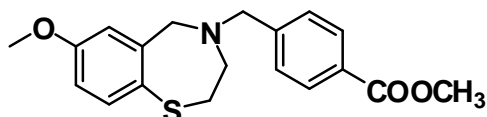
Амін

Амін (структура, зображена вище) (1 ммоль) розчинили у 3 мл дихлорметану. До розчину додали алкілюючий реагент (1 ммоль) з наступним додаванням N,N-диізопропілетиламіну (0,34 мл, 2 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Отриманий розчин завантажили безпосередньо у колонку і елюювали сумішшю гексану/етилацетату (2:1, об./об.).



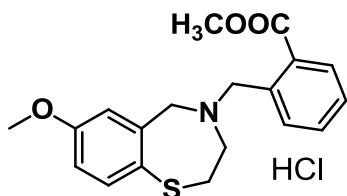
Сполука 2

Метил 3-((7-метокси-2,3-дигідробензо[ф][1,4]тіазепін-4(5Н)-іл)метил)бензоат: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,96 (м, 2H), 7,46 (м, 3H), 6,70 (дд, $J=8,4$ Гц, 3,0 Гц, 1H), 6,50 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 4,09 (с, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,72 (с, 3H), 3,57 (с, 2H), 3,35 (м, 2H), 2,72 (м, 2H). МС: 344 (M+1)



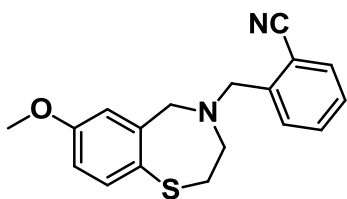
Сполука 3

Метил 4-((7-метокси-2,3-дигідробензо[ф][1,4]тіазепін-4(5Н)-іл)метил)бензоат: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,99 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,46 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,37 (д, $J=8,7$ Гц, 2H), 6,70 (дд, $J=8,4$ Гц, 3,0 Гц, 1H), 6,50 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 4,09 (с, 2H), 3,90 (с, 3H), 3,72 (с, 3H), 3,57 (с, 2H), 3,35 (м, 2H), 2,72 (м, 2H). МС: 344 (M+1)



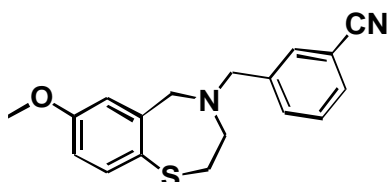
Сполука 5

Метил 2-((7-метокси-2,3-дигідробензо[ф][1,4]тіазепін-4(5Н)-іл)метил)бензоат: сполуку конвертували у хлористоводневу сіль за допомогою 2М HCl в ефірі. ^1H ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 10,33 (ушир., 1H), 8,08 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 7,80-7,65 (м, 3H), 7,51 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,14 (с, 1H), 6,99 (дд, $J=8,4$, 2,1 Гц, 1H), 4,90-4,40 (м, ушир., 4H), 3,88 (с, 3H), 3,78 (с, 3H), 3,40 (м, 2H), 3,26 (м, 1H), 3,11 (м, 1H). МС: 344 (M+1)



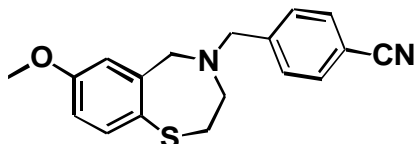
Сполука 7

2-((7-метокси-2,3-дигідробензо[f][1,4]тіазепін-4(5H)-іл)метил)бензонітрил: ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,67-7,26 (м, 5H), 6,73 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 6,74 (дд, $J=2,7, 8,4$ Гц, 1H), 4,14 (с, 2H), 3,78 (с, 3H), 3,70 (с, 2H), 3,36 (м, 2H), 2,76 (м, 2H). МС: 311 (M+1)



Сполука 8

3-((7-метокси-2,3-дигідробензо[f][1,4]тіазепін-4(5H)-іл)метил)бензонітрил: ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,64-7,42 (м, 5H), 6,74 (дд, $J=2,7, 8,4$ Гц, 1H), 6,48 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 4,08 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,57 (с, 2H), 3,36 (м, 2H), 2,76 (м, 2H). МС: 311 (M+1)

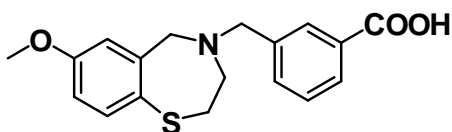


Сполука 9

4-((7-метокси-2,3-дигідробензо[f][1,4]тіазепін-4(5H)-іл)метил)бензонітрил: ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,64 (д, $J=7,2$ Гц, 2H), 7,42 (м, 3H), 6,74 (дд, $J=2,7, 8,4$ Гц, 1H), 6,48 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 4,08 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,58 (с, 2H), 3,36 (м, 2H), 2,76 (м, 2H). МС: 311 (M+1)

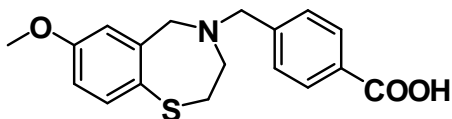
Гідроліз складного ефіру (загальна процедура)

Складний метиловий ефір (3 ммоль) розчинили у суміші 30 мл ТГФ/метанолу/1М NaOH (1:1:1, об./об.). Суміш перемішували протягом 8 годин, і тонкошарова хроматографія (ТШХ) засвідчила повне зникнення складного ефіру. Додали 1 мл концентрованого HCl для доведення до кислого pH. Органічний розчинник видалили і отриманий твердий залишок зібрали за допомогою фільтрації. Твердий залишок висушили на повітрі.



Сполука 4

3-((7-метокси-2,3-дигідробензо[f][1,4]тіазепін-4(5H)-іл)метил)бензойна кислота: цю сполуку було отримано шляхом екстрагування з EtOAc як розчинником. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 8,10 (с, 1H), 8,04 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,80 (ушир., 1H), 7,46 (м, 2H), 6,80 (м, 2H), 4,40 (с, 2H), 3,90 (с, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,42 (с, 2H), 2,86 (с, 2H). МС: 330 (M+1), 328 (M-1).



Сполука 1

4-((7-метокси-2,3-дигідробензо[f][1,4]тіазепін-4(5H)-іл)метил) бензойна кислота: цю сполуку було отримано шляхом екстрагування з EtOAc як розчинником. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 8,02 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,46 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,42 (д, $J=8,7$ Гц, 2H), 6,70 (дд, $J=8,4$ Гц, 3,0 Гц, 1H), 6,50 (д, $J=3,0$ Гц, 1H), 4,11 (с, 2H), 3,72 (с, 3H), 3,62 (с, 2H), 3,35 (м, 2H), 2,76 (м, 2H). МС: 330 (M+1), 328 (M-1).

Сполука 1, натрієва сіль:

Натрієву сіль сполуки 1 отримали з вихідної молекули за допомогою 1 еквіваленту NaOH в

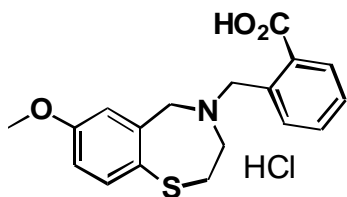
EtOH (темп. плавлення солі: > 290 °C).

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 600 МГц), δ (ч.н.м.): 7,77 (2H, м), 7,41 (1H, д), 7,13 (2H, м), 6,75 (1H, дд), 6,63 (1H, д), 4,00 (2H, с), 3,70 (3H, с), 3,49 (2H, с), 3,18 (2H, м), 2,70 (2H, м).

Сполука 1, сіль геміфумарату:

5 1,6 г сполуки 1 (нейтральної форми) і 265 мг фумарової кислоти ввели у круглодонну колбу. Після додавання 18 мл ацетону і 2 мл води, реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником. Спостерігалось часткове розчинення (але не повне освітлення) з наступним осадженням. Потім реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом ночі. Після охолодження твердий залишок виділили за допомогою фільтрації, промили 3 мл ацетону і

10 сушили у вакуумі (40 °C/10 мбар) протягом 4 годин.
¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 600 МГц), δ (ч.н.м.): 12,97 (2H, ушир.с), 7,90 (2H, м), 7,43 (1H, д), 7,40 (2H, м), 6,77 (1H, дд), 6,64 (1H, д), 6,62 (1H, с), 4,03 (2H, с), 3,70 (3H, с), 3,58 (2H, с), 3,20 (2H, м), 2,72 (2H, м).



15

Сполука 6

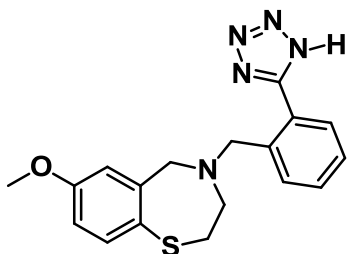
2-((7-метокси-2,3-дигідробензо[f][1,4]тіазепін-4(5H)-іл)метил)бензойна кислота: сполуку конвертували у хлористоводневу сіль за допомогою 2М HCl в ефірі. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆): 10,10 (ушир., 1H), 8,08 (д, J=7,5 Гц, 1H), 7,66-7,51 (м, 4H), 7,17 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,99 (дд, J=8,4, 2,1 Гц, 1H), 4,80-4,40 (м, ушир., 4H), 3,78 (с, 3H), 3,46 (м, 2H), 3,13 (м, 2H). МС: 330 (M+1), 328 (M-1).

20

Синтез тетразолу (загальна процедура)

Нітриловий попередник (3,22 ммоль), азид натрію (830 мг, 12,9 ммоль) і гідрохлорид триетиламіну (1,72 г, 12,9 ммоль) перемішували у 40 мл безводного ДМФ при температурі 100 °C протягом 5 днів. ДМФ видалили у високому вакуумі і залишок змішали з водою. Водний розчин екстрагували дихлорметаном (3 × 100мл), чисту сполуку очищали за допомогою колонкової хроматографії (етилацетатом/метанолом).

25

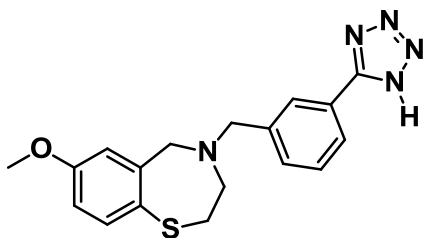


30

Сполука 10

4-(2-(1H-тетразол-5-іл)бензил)-7-метокси-2,3,4,5-тетрагідробензо[f][1,4]тіазепін: ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃, і крапля CD₃OD): 8,30 (д, J=8,7 Гц, 1H), 7,53 (м, 2H), 7,14 (т, J=7,8 Гц, 1H), 7,20 (д, J=7,5 Гц, 1H), 6,84 (дд, J=2,7,8,4 Гц, 1H), 6,69 (д, J=2,7 Гц, 1H), 4,46 (с, 2H), 3,80 (с, 2H), 3,75 (с, 2H), 3,43 (м, 2H), 2,96 (м, 2H). МС: 354 (M+1), 352 (M-1)

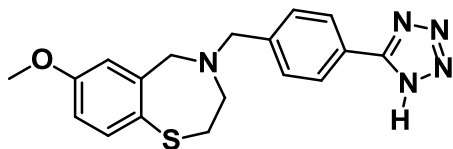
35



Сполука 11

4-(3-(1H-тетразол-5-іл)бензил)-7-метокси-2,3,4,5-тетрагідробензо[f][1,4]тіазепін: ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃): 8,16 (с, 1H), 7,90 (д, J=7,5 Гц, 1H), 7,40 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,20 (м, 2H), 6,74 (дд, J=2,7, 8,4 Гц, 1H), 6,58 (д, J=2,7 Гц, 1H), 4,18 (с, 2H), 3,75 (с, 5H), 3,36 (м, 2H), 2,76 (м, 2H). МС: 354 (M+1), 352 (M-1)

40



Сполука 12

4-(4-(1H-тетразол-5-іл)бензил)-7-метокси-2,3,4,5-тетрагідробензо[*f*][1,4]тіазепін: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , і крапля CD_3OD): 7,99 (д, $J=7,2$ Гц, 2H), 7,42 (м, 3H), 6,74 (дд, $J=2,7, 8,4$ Гц, 1H), 6,53 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 4,10 (с, 2H), 3,71 (с, 3H), 3,58 (с, 2H), 3,36 (м, 2H), 2,76 (м, 2H).). МС: 354 (M+1), 352 (M-1)

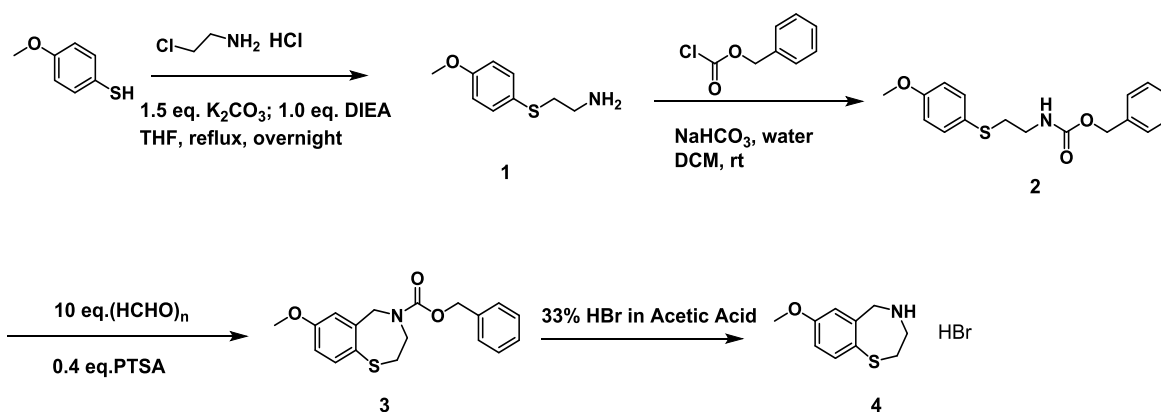
Синтез 7-метокси-2,3,4,5-тетрагідробензо[*f*][1,4]тіазепін ("амін").

кімн. темп.

33 % HBr у оцтовій кислоті

вода

ТГФ, зворотний холодильник протягом ночі



2-(4-метоксифенілтіо)етанамін (1)

4-метокситіофенол (50 г, 0,357 моль), моногідрохлорид 2-хлоретиламіну (39,8 г, 0,343 моль), K_2CO_3 (78,8 г, 0,57 моль) і діізопропілетиламін (32 мл, 0,178 моль) змішали у 200 мл ТГФ. Суміш дегазували протягом 5 хвилин при зниженому тиску і нагрівали зі зворотним холодильником в атмосфері аргону протягом ночі. Розчинник видалили і додали воду (300 мл) у колбу. Суміш екстрагували дихлорметаном (3 × 200 мл). Органічні шари зібрали, дихлорметан видалили і додали 50 мл концентрованого HCl з подальшим додаванням 200 мл води. Розчин екстрагували 1:1 EtOAc /гексаном (3 × 200 мл). Водний шар довели до рН 10 за допомогою 2 М NaOH і екстрагували дихлорметаном (3 × 200 мл). Об'єднаний органічний розчин сушили над безводним сульфатом натрію. Після видалення розчинника отримали 61 г цільової сполуки у вигляді безбарвної рідини з виходом 97 %.

^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,35 (д, $J=8,7$ Гц, 2H), 6,81 (д, $J=8,7$ Гц, 2H), 3,77 (с, 3H), 2,88-2,80 (м, 4H), 1,44 (с, 2H).

Бензил 2-(4-метоксифенілтіо)етилкарбамат (2)

Перший спосіб

У колбу, що містить сполуку 1 (8,0 г, 43,7 ммоль), бікарбонат натрію (12,1 г, 144 ммоль), воду (100 мл) і дихлорметан (200 мл) додали бензиловий ефір хлормурашиної кислоти (8,2 г, 48,1 ммоль, розведений у 100 мл дихлорметану) по краплях при 0 °C. Після додавання, суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 5 годин. Органічний шар зібрали, а водний розчин екстрагували 100 мл дихлорметану. Об'єднаний органічний розчин висушили над сульфатом натрію. Розчинник видалили і отриманий твердий залишок розтирали з 200 мл ТГФ/гексану (1:10). Твердий залишок зібрали і висушили, залишаючи цільовий продукт (12,9 г) з виходом 93 %.

Альтернативний спосіб

До розчину сполуки 1 (10 г, 54,6 ммоль) і триетиламіну (15 мл, 106 ммоль) у 200 мл дихлорметані додали бензиловий ефір хлормурашиної кислоти (7,24 мл, 51,5 ммоль, розведений у 100 мл дихлорметану) по краплях при 0 °C. Після додавання, цей розчин перемішували при кімнатній температурі протягом однієї години. Твердий залишок видалили шляхом фільтрування. Розчин екстрагували 100 мл 0,1 М HCl і 100 мл насиченого карбонату

натрію і висушили над безводним сульфатом натрію. Після видалення розчинника отримали білу тверду речовину, яку перемішували у 200 мл ТГФ/гексану (1:20) протягом трьох годин. Твердий залишок зібрали за допомогою фільтрування з отриманням 14,2 г цільової сполуки з виходом 87 %.

5 ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,35 (м, 7H), 6,83 (д, $J=8,7$ Гц, 2H), 5,07 (м, 3H), 3,77 (с, 3H), 3,10 (д, $J=6,3$ Гц, 2H), 2,92 (т, $J=6,3$ Гц, 2H).

Бензил 7-метокси-2,3-дигідробензо[*f*][1,4]тіазепін-4(5H)-карбоксилат (3)

10 Суміш сполуки 2 (7,3 г, 23 ммоль), параформальдегіду (6,9 г 0,23 моль) і р-толуолсульфонової кислоти (1,45 г, 7,6 ммоль) у 250 мл толуолу перемішували при температурі 70 °С протягом ночі. Після охолодження до кімнатної температури, твердий залишок відфільтрували. Розчин екстрагували насиченим карбонатом натрію (100 мл), і органічний шар висушили над безводним сульфатом натрію. Цільовий продукт (7,4 г) отримали у вигляді рідини після видалення розчинника з виходом 97 %.

15 ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,44 (д, $J=8,1$ Гц, 0,77H), 7,32 (м, 5,60H), 7,07 (д, $J=2,7$ Гц, 0,33H), 6,68 (м, 1,30H), 5,04 (с, 2H), 4,59 (сс, 2H), 3,96 (ушир., 1,80), 3,80 (сс, 1,23 H), 3,55 (с, 1,97H), 2,76 (м, 2H).

7-метокси-2,3,4,5-тетрагідробензо[*f*][1,4]тіазепін гідробромід (амін) (сіль 4 HBr)

Перший спосіб

20 Розчин HBr (33 % у оцтовій кислоті, 10 мл) додали до сполуки 3 (4,2 г, 12,8 ммоль). Після додавання, почав виділятися двоокис вуглецю і утворився білий твердий залишок. Суміші дали відстоятися при кімнатній температурі протягом ще 2 годин. До суміші додали діетиловий ефір (150 мл) і суміш перемішували протягом 30 хвилин. Твердий залишок зібрали за допомогою фільтрації і промили діетиловим ефіром. Твердий залишок висушили під вакуумом для отримання 3,40 г цільової сполуки з виходом 91,8 %.

25 ^1H -ЯМР (300 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 9,02 (ушир., 2H), 7,52 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,27 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 6,92 (дд, $J=8,4$, 2,7 Гц, 1H), 4,41 (с, 2H), 3,77 (с, 3H), 3,53 (м, 2H), 2,96 (м, 2H).

Альтернативний спосіб (вільна основа 4a)

30 Сполуку 3 (10 г, 30 ммоль) змішали з 50 мл концентрованого HCl, 50 мл води і 30 мл діоксану. Суміш перемішували при 100 °С протягом ночі. Після охолодження до кімнатної температури, більшу частину розчинника і HCl видалили при зниженому тиску. До розчину додали воду (100 мл) і твердий залишок відфільтрували. Водний розчин екстрагували сумішшю етилацетату/гексану (1:1,3 × 100 мл) і підружили шляхом додавання 15 г NaOH. Суміш екстрагували дихлорметаном (3 × 150 мл). Об'єднаний розчин висушили над безводним сульфатом натрію. Після видалення розчинника отримали рідину, яка затверднула після витримання при кімнатній температурі, залишаючи 6,2 г цільової сполуки.

35 ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3): 7,42 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 6,78 (д, $J=2,7$ Гц, H), 6,68 (дд, $J=2,7$, 8,1 Гц, 1H), 4,08 (с, 2H), 3,96 (ушир., 1,80), 3,76 (с, 3H), 3,38 (м, 2H), 2,68 (м, 2H).

ПРИКЛАД 2: Зв'язування калстабіну2 з ПКА-фосфорильованим RyR2

40 Серцеві мембрани CP приготували, як було описано раніше (Marx et al., 2000; Kaftan et al., Circ. Res., 1996, 78:990-97). Імуноблотинг мікросом (50 мкг) проводили, як описано, з анти-антитілом калстабіну 1:1000 (Jayaraman et al., J. Biol. Chem., 1992, 267:9474-77) протягом 1 години при кімнатній температурі (Reiken et al., Circulation, 107:2459-66, 2003). Після інкубації з HRP-міченим анти-IgG кролика (1:5000 розбавлення; Transduction Laboratories, Lexington, Ky.), блоти були розроблені з використанням ECL (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) і їх піддавали виявленню на рентгенівській плівці або піддавали впливу вторинних антитіл, мічених інфрачервоним барвником, та піддавали візуалізації на обладнанні фірми Li-Cor Biosciences (модель Odyssey). Якщо не вказано інше, сполуки тестували при концентрації 100 нМ. Репрезентативний аналіз зв'язування калстабіну2 представлено нижче.

А. ПКА фосфорильовання серцевого саркоплазматичного ретикулуму (ССР)

50 Реакційну суміш сформували у 1,5 мл пробірці. 200 мкг серцевого CP додали до реакційної суміші кіназного буфера, ПКА і АТФ з кінцевим об'ємом 100 мкл (нижче зазначеної реакційної суміші). АТФ додали останнім, щоб ініціювати реакцію.

Реакційна суміш:

55 20 мкл = Зразок (серцевий CP, 2 або 10 мкг/мкл)
10 мкл = 10х кіназного буфера (80 мМ MgCl_2 , 100 мМ EGTA, 500 мМ Tris/PIPES), pH = 7,0
20 мкл = ПКА (2 одиниці/мкл) (Sigma # P2645)
10 мкл = 10х АТФ (1,0 мМ) (Sigma 9187)
40 мкл = дистильованої H_2O

1. Пробірки інкубували при температурі 30 °С протягом 30 хвилин.

60 2. Реакційну суміш потім перенесли у 0,5 мл товстостінні пробірки.

3. Пробірки, що містять реакційну суміш, центрифугували протягом 10 хвилин при 50.000хg у центрифугу Sorvall Centrifuge RCM120EX з використанням ротора S120AT3. Центрифугування при 50.000хg протягом 10 хвилин є достатнім для виділення мікросом.

4. Отриманий осад промили 4 рази зв'язуючим буферним розчином (10 mM імідазолу, 300 mM сахарози, pH 7,4). Щоразу додавали 100 мкл 1х зв'язуючого буферу у пробірку для промивання осаду. Осад ресуспендували шляхом промивання вгору і вниз за допомогою піпетки. Після останнього центрифугування додали 50 мкл зв'язуючого буферу і осади з усіх пробірок знову об'єднали. Реакційну суміш зберігали при температурі -20 °C.

5. Фосфорильовання було підтверджене шляхом відокремлення близько 10 мкг ССР за допомогою електрофорезу у 6 % поліакриламідному гелі (PAGE) та аналізу імуноблотів як для загального RyR (5029 Ат., 1:3000 розбавлення або моноклональні Ат. від Affinity Bioreagents, Cat # MA3-916, розведення 1:2000), так і для ПКА-фосфорильованого RyR2 (P2809 Ат., 1:10000 розведення).

6. Аліквоти можуть зберігатися при -80 °C.

В. Аналіз повторного зв'язування калстабіну

1. ПКА-фосфорильований ССР (приблизно 20 мкг) інкубували з 250 нМ калстабіну 2 у 100 мкл зв'язуючого буферу (як описано вище) разом зі сполуками або без них.

2. Реакцію проводили у 0,5 мл товстостінній пробірці (Hitachi Centrifuge ware, Catalog # B4105).

3. Калстабін2 додали як останній реагент у реакційну суміш. Реакцію проводили при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

4. Після завершення реакції, пробірки центрифугували протягом 10 хвилин при 100000 g (центрифуга Sorvall RCM120EX з ротором S120AT3).

5. Отриманий осад промили 4 рази у 1х зв'язуючому буфері при 4 °C. Після кожної промивки пробірки центрифугували при 50000 g протягом 10 хвилин при 4 °C.

6. Після останньої промивки, супернатант видаляли.

7. Додали 20 мкл буферу для зразків (2х) [6х буфер для зразків описаний нижче] і осад ресуспендували за допомогою піпетки та/або шляхом короточасного перемішування вихровим способом. Суспензію перенесли в 1,5 мл мікроцентрифужну пробірку.

8. Пробірки нагрівали при 90 °C протягом 4 хвилин.

9. Білки відокремили, використовуючи 15 % SDS/PAGE.

10. Зв'язування калстабіну2 виявили за допомогою анти-FKBP (Jayaraman et al., J. Biol. Chem. 1992;267:9474-77, 1:2000) первинного антитіла і відповідного вторинного антитіла.

6х Буфер для зразків

7,0 мл 4х Tris-HCl/SDS, pH 6,8

3,0 мл гліцерину (30 % кінцева концентрація)

1,0 г SDS (10 % кінцева концентрація)

0,93 г DTT (0,6 M кінцева)

1 мг бромфеноловий синій (0,001 % кінцева концентрація)

Дистильована вода до 10 мл кінцевого об'єму.

Зберігати у 1мл аліквотах при -70 °C.

Результати:

Фігура 1А зображує імуноблот з антитілом калстабіну2, який показує зв'язування калстабіну2 з ПКА-фосфорильованим RyR2 за відсутності (-) або у присутності 100 нМ сполуки 1. (+): зв'язування калстабіну з ПКА-нефосфорильованим RyR2. S36, бензотіазепін, описаний в патенті US 7.544.678, використовується як позитивний контроль. Як зображено, сполука 1, у концентрації 100 нМ, запобігає дисоціації калстабіну2 з ПКА-фосфорильованого RyR2 та/або посилює (повторне) зв'язування калстабіну2 з ПКА-фосфорильованим RyR.

Як зображено на Фігурі 1В, було виявлено, що наступні репрезентативні сполуки також запобігають дисоціації калстабіну2 з ПКА-фосфорильованого RyR2, та/або посилюють (повторне) зв'язування калстабіну2 з ПКА-фосфорильованим RyR2 при тестуванні у вищезгаданому аналізі повторного зв'язування калстабіну2 при 100 нМ: сполука 2, сполука 3 і сполука 4.

ПРИКЛАД 3: Зв'язування калстабіну1 з ПКА-фосфорильованим RyR1

Мембрани СР зі скелетних м'язів були отримані способом, аналогічним описаному у Прикладі 2, і як додатково описано в патентній заявці US № 2004/0224368, зміст якої включено в даний опис шляхом посилання. Імуноблотинг мікросом (50 мкг) проводили, як описано, з анти-антитілом калстабіну1 (Zymed) (1:1000). Блоти були розроблені і кількісно обчислені, як описано у Прикладі 2.

Фігура 1С зображує імуноблот з антитілом калстабіну1, який показує зв'язування калстабіну1

з ПКА-фосфорильованим RyR1 за відсутності (Neg) або у присутності зазначених концентрацій сполуки 1 або сполуки 4. (Pos): зв'язування калстабіну з ПКА-нефосфорильованим RyR1. S36 використовується як контроль. Як показано, сполука 1 і сполука 4 запобігали дисоціації калстабіну1 з ПКА-фосфорильованого RyR1 та/або посилювали (повторне) зв'язування калстабіну1 з ПКА-фосфорильованим RyR1 залежно від дози, з оціночним EC50 близько 100 нМ і 150 нМ, відповідно.

ПРИКЛАД 4: Повторне зв'язування калстабіну1 з RyR1 у мишей, яким вводили ізопротеренол

Ізопротеренол, агоніст бета-адренергічного рецептора, викликає серцеву недостатність у мишей через надмірну стимуляцію бета-адренергічного рецептора. Одночасно з цим відбувається активація ПКА, фосфорилування RyR2 на CP, і зниження взаємодії калстабіну2 (FKBP12.6) з RyR2. Аналогічна послідовність подій має місце у скелетному м'язі, в якому RyR1 фосфорилується, що призводить до зниження зв'язування калстабіну1 (FKBP12) з RyR1.

Як докладно описано у міжнародній публікації № WO2008/064264, зміст якої включено в даний опис шляхом посилання, хронічне введення ізопротеренолу мишам дикого типу забезпечує швидкий і надійний спосіб індукування змін у біохімії RyR, які можуть бути легко визначені кількісно. Ці зміни включають в себе підвищення фосфорилування RyR і супутнє зниження зв'язування калстабіну.

Тварини і реагенти

Мишей C57BL/6 утримували і досліджували згідно з затвердженими протоколами. Синтетичний бета-адренергічний агоніст, ізопротеренол (ISO) отримали від компанії Sigma (I65627) і приготували у вигляді маточного розчину 100 мг/мл у воді. Буфер для лізису отримали шляхом додавання сахарози (1 мМ), дитіотреїтолу (320 мМ) та 1 таблетки інгібітору протеази (10x) у 10 мл маточний розчин (10 мМ HEPES, 1 мМ EDTA, 20 мМ NaF, 2 мМ Na₃VO₄).

Підготовка осмотичного насосу та хірургічна імплантація

Мишам постійно вводили шляхом інфузії протягом п'яти днів 10 мг/мл ізопротеренолу (1 мкл/годину) за допомогою підшкірно імплантованого осмотичного насосу для інфузії (осмотичний мінінасос Alzet, модель 2001, Durect Corporation, Cupertino, CA).

Для завантаження лікарського засобу, осмотичний насос утримувався вертикально і 200 мкл розчину препарату вводили в насос через 1 мл шприц (прикріплений до канюли), який містив надлишок розчину препарату (~ 250-300 мкл). Розчин препарату вводили повільно вниз, у той час як шприц повільно підіймали до тих пір, поки насос не переповнювався. Переливання витісненої рідини при закупорюванні насосу підтверджувало, що насос був заповнений належним чином.

Завантажені осмотичні насоси були імплантовані підшкірно за допомогою наступних стадій. Мишу-реципієнту анестезували 1,5-2 % ізофлураном в O₂, який вводили зі швидкістю 0,6 л/хвилину, потім її вагу вимірювали і реєстрували. Потім мишу помістили грудьми вниз на пінополістирол, так щоб її морда знаходилася у носовому конусі. Хутро обрізали на задній частині шиї, розширюючи за вухами до верхньої частини голови. Цю ділянку обережно протерли 70 % спиртом, і зробили невеликий надріз по серединній лінії на потилиці голови/шиї. Тримач шовного матеріалу протерли спиртом, вставили у розріз і відкрили, щоб звільнити шкіру від основної тканини. Щоб розмістити насос, цей отвір було розширено назад до задньої частини тулубу. Завантажений насос вставили в отвір так, щоб його місце випуску було розташоване в стороні від розрізу, і дали можливість осісти під шкірою з мінімальним натягом. Розріз закрили 5,0 нейлоновим шовним матеріалом, що потребувало приблизно 5-6 швів, і цю ділянку обережно протерли 70 % спиртом. Після хірургічної операції мишей помістили в окремі клітки, щоб звести до мінімуму пошкодження і, можливо, активацію симпатичної нервової системи.

Відокремлення скелетного м'яза

Відокремлення тканини скелетного м'яза миші здійснювали у такий спосіб. М'язи ноги відкрили шляхом розтину шкіри на гомілковостопному суглобі і потягнувши вгору. Тканину тримали змоченою буфером Тіроде (10 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 0,42 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ MgCl₂, 11,9 мМ NaHCO₃, 5 мМ глюкози, 1,8 мМ CaCl₂, отриманого шляхом додавання 20 мг CaCl₂ у 100 мл 1X буфера, приготованого з розчину 10X без CaCl₂). Наступні м'язи були відокремлені і заморожені в рідкому азоті. Довгий розгинач пальців (ДРП) відокремили шляхом введення ножиців між бічним сухожиллям і Х, утвореним ДРП і сухожиллям великогомілкового м'яза, розрізаючи вгору до коліна; розрізаючи малоомілковий м'яз, щоб викрити віялоподібне сухожилля литкового м'яза; вводячи пінцет під Х і під м'яз, щоб послабити сухожилля ДРП; надрізаючи сухожилля ДРП і підтягуючи м'язи; і, нарешті, надрізаючи для відокремлення ДРП. Камбалоподібний м'яз відокремили шляхом видалення малоомілкового м'яза від верхньої частини литкового м'яза; відкриваючи камбалоподібний м'яз

на нижній частині литкового м'яза шляхом розрізання і підймання вгору Ахіллового сухожилля; розрізаючи камбалоподібний м'яз у верхній частині м'яза під коліном; і, нарешті, потягнувши камбалоподібний м'яз і відрізавши його від литкового м'яза. Великогомілковий м'яз відокремили шляхом відрізання сухожилля великогомілкового м'яза від передньої частини гомілковостопного суглоба, потягнувши сухожилля вгору, і відрізаючи його від кістки. Широкий м'яз (м'яз стегна) відокремили від обох ніг, розрізаючи м'яз трохи вище коліна і видаляючи м'язовий пучок. Зразки заморозили в рідкому азоті.

Імунопреципітація RyR1 з тканини лізатів

RyR1 імунопреципітували зі зразків шляхом інкубації 200-500 мкг гомогенату з 2 мкл анти-RyR1 антитіла (Zymed) у 0,5 мл модифікованого буферу RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,9 % NaCl, 5,0 mM NaF, 1,0 mM Na₃VO₄, 0,5 % Triton-X100 і інгібітори протеази) при температурі 4 °C протягом 1,5 годин. Потім зразки інкубували з гранулами Протеїн А сефарози (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) при температурі 4 °C протягом 1 години, після чого гранули промили три рази крижаним буфером RIPA. Зразки нагріли до 95 °C і фракціонували за розміром за допомогою SDS-PAGE (15 % SDS-PAGE для калстабіну). Імуноблоти були розроблені з використанням анти-FKBP антитіла (FKBP 12/12.6, Jayaraman et al., J. Biol. Chem. 1992;267:9474-77) при розведенні 1:2000. Антитіла розводили у 5 % молоці або TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,05 % Tween® 20, 0,5 % Triton X-100).

Результати

Осмотичні насоси, що містять ізопротеренол разом з тестованою сполукою або без неї імплантували в мишей, як описано вище. Мишей піддавали осмотичній перфузії протягом п'яти днів або тільки з носієм (ДМСО/ПЕГ), тільки ізопротеренолом (ISO) (0,5 мг/кг/годину), або у поєднання ізопротеренолу (0,5 мг/кг/годину) зі сполукою 1 у зазначених концентраціях. На 6-й день, кожну мишу умертвляли, і тканини скелетних м'язів відокремили та використовували для аналізу зв'язування калстабіну1 в імунопреципітатах RyR1.

Вплив сполуки 1 на підвищення зв'язування калстабіну1 з RyR 1 у скелетних м'язах, відокремлених від мишей, які отримували ізопротеренол, зображено на Фігурі 2А (імуноблот) і Фігурі 2В (графічне кількісне відображення). Як зображено, сполука 1 підвищила рівні калстабіну1, зв'язаного з RyR1 у мембранах скелетних м'язів, до рівня, аналогічного тому, що спостерігається при введенні 3,6 mM S36, іншу похідну бензотіазепіну використовували як позитивний контроль (WO2008/064264). Подібні результати були отримані для сполуки 4 (дані не показані).

ПРИКЛАД 5: Вплив сполуки 1 у моделі хронічної постішемічної серцевої недостатності у щурів

Ціль

Ціллю даного дослідження було перевірити здатність сполуки 1 до зменшення серцевої дисфункції і послаблення шлуночкового ремоделювання у моделі серцевої недостатності, викликаній ішемічно-реперфузійним пошкодженням.

Методологія

Хронічна серцева недостатність була індукована у щурів-самців Wistar (224-240 г, 10-11 тижнів) шляхом ішемічно-реперфузійного (I/P) пошкодження. Для протоколу I/P, передню низхідну ліву (ПНЛ) коронарну артерію перетискали протягом 1 години. Медикаментозне лікування (5 мг/кг/добу або 10 мг/кг/добу у питній воді) було розпочато через 1 тиждень після реперфузії і тривало протягом 3 місяців періоду дослідження. Ефективність сполуки 1 оцінювали за даними ехокардіографії через один, два і три місяці після початку лікування, і за допомогою інвазивної гемодинаміки у 3 місяці в порівнянні з тваринами, які отримували носій, і тваринами, які отримували плацебо. Серцеві зразки були також проаналізовані з метою оцінки гіпертрофії і вмісту колагену. Кров збирали від кожного щура в останній день дослідження для оцінки концентрації препарату в плазмі, як показано на Фігурі 3. Схема дослідження представлена на Фігурі 3. Експерименти виконували у сліпий спосіб.

Статистичні методи

На основі параметрів, вимірюваних з плином часу, порівняння тварин, які отримували плацебо, з тваринами, які отримували носій, і порівняння способів медикаментозного лікування аналізували за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з повторними вимірами. На основі параметрів, вимірюваних при умертвленні тварин і даних морфометрії, порівняння тварин, які отримували плацебо, з тваринами, які отримували носій, аналізували за допомогою Т-тесту, а порівняння способів медикаментозного лікування – за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу з подальшим тестом Даннетта (Dunnett).

Результати

I/P тварини, які отримували носій, у порівнянні з тваринами, які отримували плацебо,

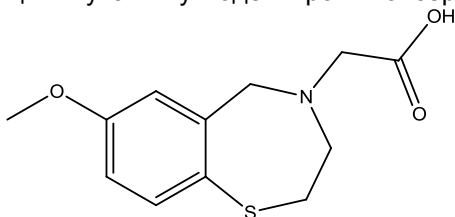
продемонстрували підвищений кінцево-сistolічний об'єм лівого шлуночка (КСО ЛШ) і підвищений кінцево-діастолічний об'єм лівого шлуночка (КДО ЛШ) (Фігури 4А і 4В), пригнічену серцеву функцію, яка вимірювалася зниженою фракцією викиду (ФВ) (Фігура 4С), і підвищений вміст інтерстиціального колагену (Фігура 5D). Сполука 1, яку вводили по 5 і 10 мг/кг/добу, значно підвищила ФВ, а також знизилася як КСО ЛШ, так і КДО ЛШ, у порівнянні з носієм, за проміжок часу від одного до трьох місяців (Фігури 4А-С), а також знизилася вміст інтерстиціального колагену (Фігура 5D).

Дослідження інвазивної гемодинаміки (через 3 місяці) засвідчило збереження dP/dt_{max} і dP/dt_{min} у лівому шлуночку тварин, які отримували сполуку 1 по 5 і 10 мг/кг/добу в порівнянні з тваринами, які отримували носій (Фігури 6В і 6С), без статистично значущої зміни систолічного тиску у ЛШ після лікування (Фігура 6А).

Жодного впливу на вагу тіла (BW), розмір інфаркту або гіпертрофію (вагу ЛШ) не спостерігалось після лікування (Фігури 5А-С). Концентрації препарату у плазмі зображені на Фігурі 7.

Результати свідчать про те, що сполука 1, при таких низьких концентраціях, як 5 мг/кг/добу, має сприятливий вплив як на систолічну, так і діастолічну серцеву функції у моделі хронічної постішемічної серцевої недостатності у щурів.

Сполука 1 була значно і несподівано активнішою порівняно зі сполукою А, структурно пов'язаною похідною бензотіазепіну, описаною в WO 2007/024717. Як показано на Фігурі 8, сполука А, яку вводили у концентрації 5 мг/кг/добу протягом 3-х місяців, не змогла поліпшити систолічну і діастолічну серцеву функцію в порівнянні зі сполукою 1 у моделі хронічної постішемічної серцевої недостатності у щурів при завершенні дослідження. Таким чином, сприятливі ефекти сполуки 1, але не сполуки А, спостерігалися при дозі 5 мг/кг/добу після 3 місяців лікування у моделі хронічної серцевої недостатності у щурів.



Сполука А

ПРИКЛАД 6: Вплив сполуки 1 на функцію м'язів у моделі м'язової дистрофії у мишей (mdx)

Ціль

Ціллю даного дослідження було перевірити, чи покращує лікування сполукою 1 функцію м'язів у мишачій моделі з дефіцитом дистрофіну (mdx).

Методологія

Мишей C57BL/10ScSn-МДД^{mdx}/J (скорочено mdx, n=5 у кожній групі), віком 6 тижнів і близько 20 грамів, на початку дослідження, акліматизували до кліток з колесом протягом шести днів, перш ніж провести їх рандомізацію на групи, які отримували лікування або носієм (H₂O), або цільові дози по 5 мг/кг/добу, 10 мг/кг/добу або 50 мг/кг/добу (фактичні дози: 7,9 мг/кг/добу; 12,8 мг/кг/добу; і 61,5 мг/кг/день, відповідно, визначаються на основі щотижневого вимірюваного споживання розчину препарату, поділеного на вагу тіла) натрієвої солі сполуки 1 (у розрахунку на вагу вихідного препарату; натрієва сіль згадується тут далі у цьому Прикладі як "сполука 1"), які вводили разом з питною водою ad libitum (досхочу) протягом 4 тижнів. Підібрані за віком миші C57BL/6 (скорочено - WT (дикого типу), n=4 у кожній групі) були рандомізовані на групи, які отримували лікування або носієм (H₂O), або цільову дозу 50 мг/кг/добу (фактична доза: 67,7 мг/кг/добу) натрієвої солі сполуки 1.

Довільну активність на колесі, вагу тіла і середнє споживання води вимірювали протягом перших 3 тижнів. Питому м'язову силу вимірювали після 4 тижнів лікування, в кінці дослідження.

Пройдену відстань (км/добу) протягом 24 годин аналізували як індекс поліпшеної функціональної активності (див., DMD_M.2.1.002 SOP at <http://www.treat-nmd.eu/>). Наприкінці дослідження, м'яз довгого розгинача пальців (ДРП) відокремили для аналізу сили м'язів, як додатково описано нижче. Кров збирали від кожної миші шляхом ретроорбітальної кровотечі в кінці дослідження (після завершення темного часу доби - о 7 годині ранку), щоб оцінити концентрації препарату в плазмі. Експерименти виконували у сліпий спосіб.

Вимірювання сили

В кінці дослідження, м'яз ДРП відтягли від задніх кінцівок для аналізу ізометричної сили за допомогою системи для дослідження м'язів 407A Muscle Test System від Aurora Scientific (Aurora, Ontario, Canada). Шовний матеріал 6-0 прив'язали до кожного сухожилля і усього м'яза

ДРП, сухожилля до сухожилля, перенесли у ванну Раньоті (Ragnoti) з O_2/CO_2 (95 %/5 %) барботованим розчином Тіроде (у мМ: NaCl 121, KCl 5,0, $CaCl_2$ 1,8, $MgCl_2$, NaH_2PO_4 , $NaHCO_3$ 24 і глюкози 5,5). За допомогою шовного матеріалу одне сухожилля прив'язали вертикально до крюка з нержавіючої сталі, приєднаного до датчика сили. Інше сухожилля з шовним матеріалом було затиснуте внизу у рухомому важелі системи Aurora. М'яз ДРП стимулювали для скорочення за допомогою електричного поля між двома платиновими електродами. На початку кожного експерименту, довжину м'язів корегували для отримання максимальної сили. Співвідношення сили-частоти визначали шляхом ініціювання скорочення з використанням поступово наростаючих частот стимуляції (5-250 Гц протягом 200 мс за надпорогової напруги). Між стимуляціями м'язу давали можливість відпочити ~ 3 хвилини. Наприкінці вимірювання сили, довжину (L_0) м'яза ДРП, закріпленого шовним матеріалом у системі Aurora, вимірювали за винятком сухожиль. Потім м'яз ДРП видаляли із системи і зважували, після відсікання кінцевих сухожиль і шовного матеріалу. Потім м'яз ДРП заморозили в рідкому азоті. Площу поперечного перерізу (mm^2) м'яза ДРП розраховували, поділивши вагу м'яза ДРП на довжину м'яза ДРП і константу щільності м'язів ссавців $1,056 \text{ mg}/m^3$ (Yamada, T., et al. Arthritis and rheumatism 60:3280-3289). Щоб визначити питому силу ДРП (kN/m^2), абсолютну тетанічну силу поділили на площу поперечного перерізу м'яза ДРП.

Статистичні методи

Для визначення статистичної значущості, т-критерій Стьюдента використовували для порівняння між двома групами. Усі узагальнені дані були виражені як середня величина \pm SEM (стандартна похибка середньої величини).

Результати

Здатність сполуки 1 для поліпшення довільного фізичного навантаження у мишей mdx піддали тестуванню. Після акліматизації мишей до клітки з довільним колесом, активність мишей на довільному колесі контролювали за допомогою комп'ютера 24 години 7 днів на тиждень. Зібрані дані транскрибували у відстань, пройдену за добу протягом 3 тижнів. Миші mdx, які отримували 10 і 50 мг/кг/добу (цільову дозу) сполуки 1 проходили значно більші відстані на колесі у порівнянні з мишами mdx, які отримували тільки носій (H_2O) ($P < 0,001$ від доби 1 до доби 19). Ефект лікування спостерігався вже через 2-3 днів після початку лікування і тривав протягом усього періоду моніторингу активності. Відсутність ефекту сполуки 1 на пройдену відстань спостерігалася у мишей дикого типу (WT), які отримували 50 мг/кг/добу сполуки 1 (Фігура 9). Крім того, як визначено вимірами сили *in vitro* у м'язі ДРП (Фігура 10), лікування сполукою 1 підвищувало питому силу у м'язах мишей mdx залежно від дози. При частотах стимуляції 150 Гц і вище миші mdx, які отримували по 50 мг/кг/добу, продемонстрували статистично значуще збільшення питомої м'язової сили ($P < 0,05$). Відсутність ефекту лікування сполукою 1 на питому м'язову силу спостерігалася у мишей WT.

Як зображено на Фігурі 11, лікування сполукою 1 не впливає на вагу тіла. Не спостерігалася ефекту, залежного від дози, на споживання води. Ранковий контакт сполуки 1 з кров'ю становив (середнє значення \pm SEM) $3,3 \pm 0,4$ мкм для мишей mdx, які отримували дозу 5 мг/кг/добу, $10,7 \pm 0,9$ мкм для мишей mdx, які отримували дозу 10 мг/кг/добу, $52,8 \pm 1,7$ мкм для мишей mdx, які отримували дозу 50 мг/кг/добу і $72,8 \pm 7,0$ мкм для мишей WT, які отримували дозу 50 мг/кг/добу. Узяті разом, результати показують, що, в порівнянні з контрольними тваринами, які отримували носій, лікування сполукою 1 у дозі 10 мг/кг/добу і 50 мг/кг/добу (цільова доза) покращило здатність до фізичного навантаження на довільному колесі після 3 тижнів і підвищило питому м'язову силу після 4 тижнів у мишей mdx, мишачої моделі м'язової дистрофії Дюшена (МДД), тим самим демонструючи корисність сполуки 1 і її аналогів, як заявлено тут, при лікуванні м'язової дистрофії.

ПРИКЛАД 7: Метаболічна стабільність

Метаболічну стабільність сполуки 1, репрезентативної RycalTM згідно з даним винаходом, порівнювали зі сполукою В і сполукою С, структурно спорідненими похідними бензотіазепіну, описаними в WO 2007/024717.

А. Метаболічна стабільність у мікросомах печінки людини

Способи:

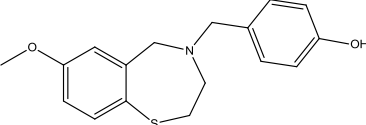
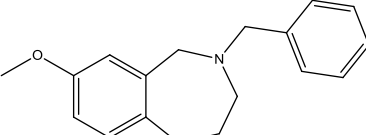
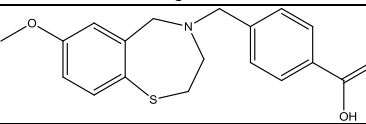
Солюбілізація сполуки: маточні розчини готували у ДМСО, а робочі розчини - у воді, що містить 1 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

Прогнозування метаболічної біодоступності: Прогнозування метаболічної біодоступності (MF%) ґрунтувалися на вимірах метаболічної стабільності *in vitro* у мікросомах печінки, виходячи з припущення про повне поглинання. Коротко, незмінені препарати були кількісно визначені за допомогою РХ-МС-МС після інкубації (10^{-7} М) у мікросомах печінки щурів і людини (0,33 мг білка/мл) через 0, 5, 15, 30 і 60 хвилин інкубації у присутності НАДФН (1 мМ).

Ферментативну реакцію зупинили метанолом (об./об.), і білки осаджували шляхом центрифугування. Власні кліренси *in vitro* (Clint_mic), виражені у мл/хв/г білка, являли собою кут нахилу графіка лінійної залежності (після LN лінеаризації) залишкової концентрації незмінного препарату в залежності від часу інкубації. *In vitro* кліренси (Clint) потім масштабували до всього тіла *in vivo* (vivoClint) з використанням 0,045 мг білка/кг печінки і печінки вагою 11 г для щурів і 1,2 кг для людини. *In vivo* кліренси (Clint) потім трансформували у печінкові кліренси (HepCl) з використанням добре перемішаної моделі ($HepCl = vivoClint \cdot HBF / (vivoClint + HBF)$), де HBF (печінковий кровотік) були взяті як 22 мл/хв для щурів і 1500 мл/хв для людини. MF% потім віднімали від коефіцієнта очищення (кліренса) за наступним рівнянням ($MF\% = 1 - HepCl / HBF$).
Результати представлені в Таблиці 1:

Таблиця 1

Стабільність у мікросомах людини

Сполука	Структура	Мікросоми щура			Мікросоми людини		
		Clint_mic щура мл/хв/г білка	MF mic %	Клас	Clint_mic людини мл/хв/г білка	MF mic %	Клас
B		823	5	дуже низький	285	6	дуже низький
C		1926	2	дуже низький	1326	2	дуже низький
1		101	30	проміжний	9.1	75	високий

a. Clint_mic: власний кліренс *in vitro* у мл/хв/г білка

b. MF%: метаболічна біодоступність у %

В. Метаболічна стабільність у печінкових гепатоцитах щурів і людини
Солюбілізація сполуки: маточні розчини готували у ДМСО, а робочі розчини - у середовищі Вільяма (William), що містить 1/10 плазми щура або 1/4 людської плазми.
Визначення метаболічної стабільності: Сполуки інкубували при 10^{-7} М з ізольованими гепатоцитами ($6E + 5$ клітин/мл для гепатоцитів щурів і $4E+5$ клітин/мл для гепатоцитів людини) при 37 °C у плазмі від одних зразків, розчинених у середовищі Вільяма (1/10 розведення для щурів і 1/4 розведення для людини). Проведення вимірювань здійснювали на 0, 10, 20, 30, 60 і 120 хвилинах і ферментативну реакцію зупиняли метанолом (об./об.). Білки осаджували центрифугуванням і супернатант аналізували за допомогою РХ/МС/МС. Кліренс (Clint), виражений у мл/хв/г білка, розраховували для печінкових мікросом з використанням коефіцієнта 0,134 мг білка/мл для $4E+5$ клітин/мл для людини і 0,201 мг білка/мл для $6E+5$ клітин/мл для щурів. Наявність еталонного препарату і потенціального метаболіту перевіряли за допомогою РХ/МС/МС при аналізі кожного зразка. Результати представлені в Таблиці 2:

Таблиця 2

Стабільність у гепатоцитах щурів і людини

Сполука	Гепатоцити щура			Гепатоцити людини		
	Clint (мл/хв/г білка)	MF щура %	Q клітин/мл	Clint (мл/хв/г білка)	MF людини %	Q клітин/мл
B	1334	3	6.00E+05	693	3	4.00E+05
1	5	90	6.00E+05	0	100	4.00E+05
C	2610	2	6.00E+05	100	16	4.00E+05

a. Clint_{mic}: власний кліренс in vitro у мл/хв/г білка

b. MF%: метаболічна біодоступність у %

c. Q: Кількість клітин на мл.

5 C. Метаболічна стабільність у мікросомах мишей та щурів

Матеріали і способи

Буфер для розведення: 0,1 M Tris-HCl буфер при pH 7,4, що містить 5 мМ ЕДТА.

10 Розчину кофактору відновленого нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФН): До 50 мл пробірки "falcon", що містить 2,79 мл буферу для розведення додали 0,429 мл НАДФН-відновлюючого розчину А і 0,079 мл НАДФН-відновлюючого розчину В.

Приготування мікросом: (1,5 мг/мл розчин) 50 мл пробірку "falcon", що містить 3,32 мл буферу для розведення попередньо нагрівали при температурі 37 °C протягом 15 хвилин (принаймні 10 хв.). Додали 0,178 мл мікросом (24,6 мг/мл) до попередньо нагрітого буферу для розведення. Концентрація білка цього приготування мікросом становила 1,25 мг/мл.

15 Зразок (тестова сполука) - вихідний і проміжний маточні розчини: приготували 1 мг/мл (0,5 мг/мл використовували для сполуки 1) розчину тестової сполуки в метанолі. 100 мкМ проміжного розчину тестової сполуки з вихідного маточного розчину приготували з використанням буферу для розведення. 5 мкМ розчину приготували шляхом розведення 100 мкМ проміжного розчину з використанням буферу для розведення.

20 Експеримент:

(Експерименти проводили у 1,5 мл центрифужній мікропробірці "еппENDORF")

0 хвилинна інкубація. Процедура:

a. Додати 100 мкл попередньо нагрітих мікросом

25 b. Додати 50 мкл 5 мкМ розчину тестової сполуки

c. Додати 500 мкл холодного стоп-реагента (крижаний метанол)

d. Додати 100 мкл розчину кофактору НАДФН до мікропробірки еппENDORF

a. Перемішувати вихровим способом мікропробірку еппENDORF

"t" хвилинна інкубація

b. Додати 100 мкл розчину кофактору НАДФН до мікропробірки еппENDORF

30 c. Додати 50 мкл 5 мкМ розчину тестової сполуки

d. Додати 100 мкл попередньо нагрітих мікросом

e. Інкубувати мікропробірку еппENDORF при 37 °C і 300 об. на хвилину протягом "t" хвилин у термоміксері

35 f. Видалити мікропробірку еппENDORF з термоміксера

g. Додати 500 мкл холодного стоп-реагента (крижаний метанол)

h. Перемішувати вихровим способом мікропробірку еппENDORF.

Обидва зразки, інкубовані "0" і "t" хвилин, центрифугували при 15.000 gcf при 4 °C протягом 15 хвилин. 500 мкл розчину супернатанту видалили і піддали його аналізу PX/MC (SIM - контроль заданих іонів).

40 Результати виражені як % тестової сполуки, що залишилася = (Площа піку MC зразка "t" хв. / Площа піку зразка "0" хв.)*100. Площа MC, що використовується, являє собою середнє значення дублюючих ін'єкцій.

Часові точки = 0, 15, 30 і 60 хвилин для кожної тестової сполуки.

Позитивний контроль:

45 2 мкМ Іміпраміну - 5 хвилинну і 2 мкМ Іміпраміну - 15 хвилинну інкубацію використовували як позитивний контроль для проведення експериментів стабільності мікросом печінки щурів і мишей.

Результати представлені в Таблиці 3:

Таблиця 3

Стабільність у мікросомах мишей і щурів

	Сполука (1)	Сполука (B)	Сполука (C)
Метаболічна стабільність in vitro			
Мікротоми щурів (% залишилося)			
15 хв.	54 %	1 %	0 %
30 хв.	17 %	0 %	0 %
1 год.	2 %	0 %	0 %
Мікросоми мишей (% залишилося)			
15 хв.	99 %	0 %	0 %
30 хв.	98 %	0 %	0 %
1 год.	82 %	0 %	0 %

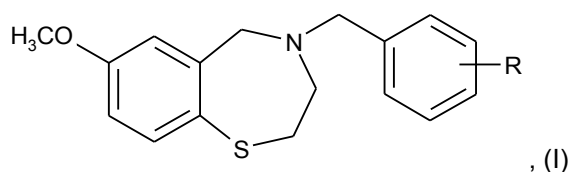
Дивно, як показано в Таблицях 1-3, сполука 1 була значно стабільнішою у мікросомах мишей, щурів та людини, і у гепатоцитах щурів та людини, в порівнянні зі структурними аналогами - сполуками B і C, описаними в WO 2007/024717, обидві з яких, як було встановлено, мають низьку метаболічну стабільність in vitro у тестованих системах, що робить ці сполуки непридатними для розробки у якості кандидатів на лікарський препарат. Дивно і несподівано, заміна груп Н або ОН у сполуках відомого рівня техніки групою СООН призвела до отримання сполуки 1, яка відзначається високою метаболічною стабільністю у всіх тестових системах. Підвищена метаболічна стабільність Сполуки 1 у порівнянні з її структурними аналогами, дійсно, є дивною і обґрунтовує несподівані переваги цієї сполуки над сполуками, відомими в даній галузі техніки.

Усі публікації, посилання, патенти і патентні заявки, цитовані тут, включені шляхом посилання у всій своїй повноті в тій же мірі, якби кожна окрема заявка, патент або патентна заявка були конкретно та окремо вказані як такі, що включені шляхом посилання у їх повному обсязі.

Наведений вище опис конкретних варіантів здійснення настільки повно розкриває загальний характер винаходу, що інші можуть, із застосуванням сучасних знань, легко модифікувати та/або адаптувати для різних застосувань такі конкретні варіанти без зайвого експериментування і без відходу від загальної концепції, і, таким чином, такі адаптації та модифікації повинні і мають на меті розумітися в рамках сенсу і обсягу еквівалентів розкритих варіантів здійснення. Слід розуміти, що фразеологія або термінологія, використовувана тут, має на меті ілюстрацію, а не обмеження. Засоби, матеріали і стадії для виконання різних функцій, описаних тут, можуть набувати різних альтернативних форм без відступу від винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука, яка представлена структурою Формули (I):



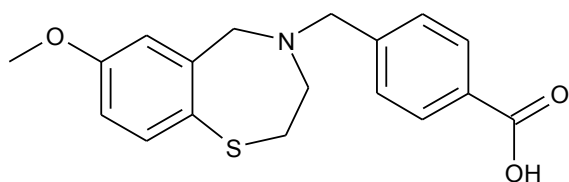
де

R являє собою СООН;
або її фармацевтично прийнятні солі.

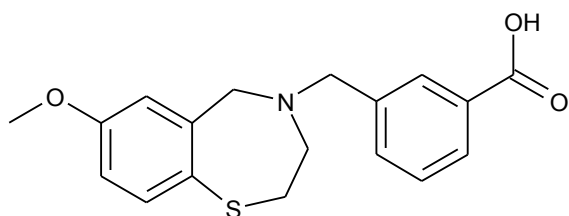
2. Сполука за п. 1 у формі солі з фармацевтично прийнятною кислотою або основою.

3. Сполука за п. 2, яка **відрізняється** тим, що сіль вибирають з групи, що складається з натрію, калію, магнію, геміфумарату, гідрохлориду і гідроброміду, переважно сіль являє собою сіль натрію або геміфумарату.

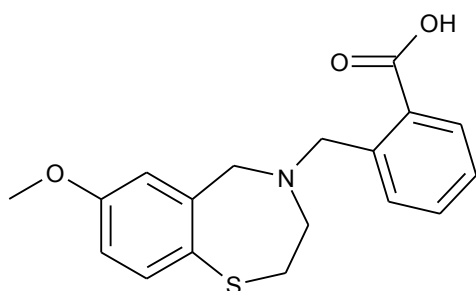
4. Сполука за п. 1, яку вибирають з групи, що складається з:



(1)

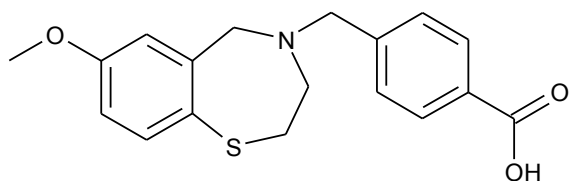


(4)



(6)

5. Сполука за п. 1, яка представлена структурою Формули (1):



(1)

або її фармацевтично прийнятні солі.

6. Сполука за п. 5 у формі солі з фармацевтично прийнятною кислотою або основою.

7. Сполука за п. 6, яка **відрізняється** тим, що сіль вибирають з групи, що складається з натрію, калію, магнію, геміфумарату, гідрохлориду і гідроброміду.

8. Сполука за п. 7, яка **відрізняється** тим, що сіль являє собою натрієву сіль.

9. Сполука за п. 7, яка **відрізняється** тим, що сіль являє собою сіль геміфумарату.

10. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-9 у поєднанні з одним або кількома фармацевтично прийнятними наповнювачами або носіями.

11. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вибраного з групи, що складається з серцевих порушень та захворювань, м'язової втоми, скелетно-м'язових порушень та захворювань, порушень та захворювань ЦНС, когнітивної дисфункції, нервово-м'язових порушень та захворювань, уражень та захворювань кісток, ракової кахексії, злоякісної гіпертермії, цукрового діабету, раптової серцевої смерті і синдрому раптової дитячої смерті, або для покращення когнітивної функції.

12. Спосіб лікування або профілактики стану, вибраного з групи, що складається з серцевих порушень та захворювань, м'язової втоми, скелетно-м'язових порушень та захворювань, порушень та захворювань ЦНС, когнітивної дисфункції, нервово-м'язових порушень та захворювань, уражень та захворювань кісток, ракової кахексії, злоякісної гіпертермії, цукрового діабету, раптової серцевої смерті і синдрому раптової дитячої смерті, або для покращення когнітивної функції, за яким вводять пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-9 або фармацевтичної композиції за п. 10 для здійснення такого лікування.

13. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де стан є пов'язаним з аномальною функцією рецептора ріанодину 1 (RyR1), рецептора ріанодину типу 2 (RyR2), рецептора ріанодину типу 3 (RyR3) або їх поєднання.

5 14. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де стан є пов'язаним з аномальною функцією рецептора ріанодину 1 (RyR1), рецептора ріанодину типу 2 (RyR2), рецептора ріанодину типу 3 (RyR3) або їх поєднання.

10 15. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де серцеві порушення і захворювання вибирають з групи, що складається з порушень і захворювань, пов'язаних з нерегулярним серцебиттям, таких як порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, вибрані з групи, що складається з передсердної і шлуночкової аритмії, передсердної і шлуночкової фібриляції, передсердної і шлуночкової тахіаритмії, передсердної і шлуночкової тахікардії, катехоламінергічної поліморфної шлуночкової тахікардії (КПШТ) та їх варіантів, викликаних фізичним навантаженням; порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, викликані фізичним навантаженням; серцева недостатність; застійна серцева недостатність; хронічна серцева недостатність; гостра серцева недостатність; систолічна серцева недостатність; діастолічна серцева недостатність; гостра декомпенсована серцева недостатність; ішемічно-реперфузійне (I/P) пошкодження серця; хронічна обструктивна хвороба легень; ішемічно-реперфузійне пошкодження після коронарної ангіопластики або після тромболізу при лікуванні інфаркту міокарда (ІМ) і високий кров'яний тиск.

15 16. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де серцеві порушення і захворювання вибирають з групи, що складається з порушень і захворювань, пов'язаних з нерегулярним серцебиттям, таких як порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, вибрані з групи, що складається з передсердної і шлуночкової аритмії, передсердної і шлуночкової фібриляції, передсердної і шлуночкової тахіаритмії, передсердної і шлуночкової тахікардії, катехоламінергічної поліморфної шлуночкової тахікардії (КПШТ) та їх варіантів, викликаних фізичним навантаженням; порушення і захворювання, пов'язані з нерегулярним серцебиттям, викликані фізичним навантаженням; серцева недостатність; застійна серцева недостатність; хронічна серцева недостатність; гостра серцева недостатність; систолічна серцева недостатність; діастолічна серцева недостатність; гостра декомпенсована серцева недостатність; ішемічно-реперфузійне (I/P) пошкодження серця; хронічна обструктивна хвороба легень; ішемічно-реперфузійне пошкодження після коронарної ангіопластики або після тромболізу при лікуванні інфаркту міокарда (ІМ) і високий кров'яний тиск.

30 17. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де м'язова втома виникає внаслідок скелетно-м'язового захворювання, порушення або стану.

35 18. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де м'язова втома виникає внаслідок скелетно-м'язового захворювання, порушення або стану.

40 19. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де скелетно-м'язове порушення, захворювання або стан вибирають з групи, що складається з скелетно-м'язової втоми, викликані фізичним навантаженням; м'язової втоми, викликані фізичним навантаженням, яка виникає в результаті тривалого фізичного навантаження або високоінтенсивного фізичного навантаження; вродженої міопатії; м'язової дистрофії, такої як м'язова дистрофія Дюшена (МДД), м'язова дистрофія Беккера (МДБ), поясно-кінцівкова дистрофія (ПКД), плечолопатково-лицева дистрофія, міотонічна м'язова дистрофія, вроджена м'язова дистрофія (ВМД), дистальна м'язова дистрофія, м'язова дистрофія Емері-Дрейфуса і окулофарингеальна м'язова дистрофія; спінальної м'язової атрофії (СМА), спінальної і бульбарної м'язової атрофії (СБМА), м'язової втоми, пов'язаної з віком, саркопенії, хвороби серцевини м'язових волокон, ракової кахексії, ураження сечового міхура і нетримання сечі.

45 20. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де скелетно-м'язове порушення, захворювання або стан вибирають з групи, що складається з скелетно-м'язової втоми, викликані фізичним навантаженням; м'язової втоми, викликані фізичним навантаженням, яка виникає в результаті тривалого фізичного навантаження або високоінтенсивного фізичного навантаження; вродженої міопатії; м'язової дистрофії, такої як м'язова дистрофія Дюшена (МДД), м'язова дистрофія Беккера (МДБ), поясно-кінцівкова дистрофія (ПКД), плечолопатково-лицева дистрофія, міотонічна м'язова

дистрофія, вроджена м'язова дистрофія (ВМД), дистальна м'язова дистрофія, м'язова дистрофія Емері-Дрейфуса і окулофарингеальна м'язова дистрофія; спінальної м'язової атрофії (СМА), спінальної і бульбарної м'язової атрофії (СБМА), м'язової втоми, пов'язаної з віком, саркопенії, хвороби серцевини м'язових волокон, ракової кахексії, ураження сечового міхура і нетримання сечі.

21. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де порушення і захворювання ЦНС вибирають з групи, що складається з хвороби Альцгеймера (ХА), нейропатії, судом, хвороби Паркінсона (ХП) і хвороби Хантінгтона (ХХ); і нервово-м'язові порушення і захворювання вибирають з групи, що складається зі спінально-церебелярної атаксії (СЦА) і бічного аміотрофічного склерозу (БАС, хвороби Лу Геріа).

22. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де порушення і захворювання ЦНС вибирають з групи, що складається з хвороби Альцгеймера (ХА), нейропатії, судом, хвороби Паркінсона (ХП) і хвороби Хантінгтона (ХХ); і нервово-м'язові порушення і захворювання вибирають з групи, що складається зі спінально-церебелярної атаксії (СЦА) і бічного аміотрофічного склерозу (БАС, хвороби Лу Геріа).

23. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де когнітивна дисфункція є пов'язаною зі стресом або пов'язаною з віком, або когнітивна функція, яка потребує поліпшення, являє собою короточасну пам'ять, довготривалу пам'ять, увагу або навчання, або когнітивна дисфункція є пов'язаною із захворюванням або порушенням, вибраним з групи, що складається з хвороби Альцгеймера (ХА), синдрому дефіциту уваги і гіперактивності (СДУГ), розладу аутистичного спектра (РАС), генералізованого тривожного розладу (ГТР), обсесивно-компульсивного розладу (ОКР), хвороби Паркінсона (ХП), синдрому посттравматичного стресу (ПТСР), шизофренії, біполярного розладу або великої депресії.

24. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де когнітивна дисфункція є пов'язаною зі стресом або пов'язаною з віком, або когнітивна функція, яка потребує поліпшення, являє собою короточасну пам'ять, довготривалу пам'ять, увагу або навчання, або когнітивна дисфункція є пов'язаною із захворюванням або порушенням, вибраним з групи, що складається з хвороби Альцгеймера (ХА), синдрому дефіциту уваги і гіперактивності (СДУГ), розладу аутистичного спектра (РАС), генералізованого тривожного розладу (ГТР), обсесивно-компульсивного розладу (ОКР), хвороби Паркінсона (ХП), синдрому посттравматичного стресу (ПТСР), шизофренії, біполярного розладу або великої депресії.

25. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вказаного в п. 11, де стан являє собою ракову кахексію, переважно викликану раком, який має метастази у кістки.

26. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де стан являє собою ракову кахексію, переважно викликану раком, який має метастази у кістки.

27. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де сполука за будь-яким з пп. 1-9 використовується у дозі, достатній для відновлення або поліпшення зв'язування калстабіну-2 з RyR2.

28. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де сполука за будь-яким з пп. 1-9 використовується у дозі, достатній для відновлення або поліпшення зв'язування калстабіну-1 з RyR1.

29. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12, де сполука за будь-яким з пп. 1-9 використовується у дозі, достатній для зниження витоку Ca^{2+} через канал RyR.

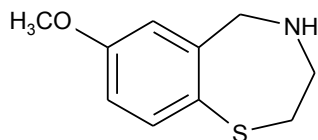
30. Сполука за будь-яким з пп. 1-9 або її сіль для застосування у лікуванні або профілактиці стану, вибраного з групи, що складається з серцевих порушень та захворювань, м'язової втоми, скелетно-м'язових порушень та захворювань, порушень та захворювань ЦНС, когнітивної дисфункції, нервово-м'язових порушень та захворювань, уражень та захворювань кісток, ракової кахексії, злоякісної гіпертермії, цукрового діабету, раптової серцевої смерті і синдрому раптової дитячої смерті, або для покращення когнітивної функції.

31. Фармацевтична композиція за п. 10 в поєднанні з антисмисловим олігонуклеотидом (АО), який є специфічним для послідовності сплайсингу у мРНК-мішені, для посилення пропуску екзонів у зазначеній мРНК-мішені, для застосування в способі лікування або профілактики стану, вказаного в п. 12.

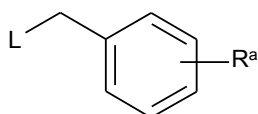
32. Фармацевтична композиція за п. 31 для застосування у лікуванні м'язової дистрофії Дюшена (МДД), яка **відрізняється** тим, що антисмисловий олігонуклеотид (АО) є специфічним для послідовності сплайсингу принаймні одного екзона гена МДД, переважно послідовності сплайсингу екзона 23, 45, 44, 50, 51, 52 та/або 53 гена МДД.

5 33. Спосіб лікування пацієнта, який має м'язову дистрофію Дюшена (МДД), за яким вводять зазначеному пацієнту сполуку за будь-яким з пп. 1-9, або фармацевтичну композицію за п. 10, у поєднанні з антисмисловим олігонуклеотидом (АО), який є специфічним для послідовності сплайсингу принаймні одного екзона гена МДД, переважно послідовності сплайсингу екзона 23, 45, 44, 50, 51, 52 та/або 53 гена МДД.

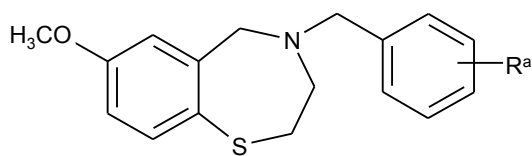
10 34. Спосіб отримання сполуки за будь-яким з пп. 1-9, за яким здійснюють взаємодію сполуки формули



зі сполукою формули



15 де R^a являє собою COOR^1 або CN ; R^1 являє собою $\text{C}_1\text{-C}_4$ -алкіл і L являє собою заміщувану групу, для отримання сполуки формули:



; і

конвертування групи R^a у групу R для отримання сполуки формули (I).