

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902106832A1

Publication Date

20140603

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Title

USO DEI CORRETTORI DEL CFTR NEL TRATTAMENTO DELLE
PATOLOGIE DEL MUSCOLO STRIATO

NUOVO USO

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda composti, e i loro sali farmaceuticamente compatibili, che sono correttori della maturazione cellulare della proteina
5 “Regolatore della Conduttanza Trans Membrana della Fibrosi Cistica”, (qui di seguito CFTR), per l'uso nel trattamento di malattie genetiche del muscolo striato come le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody's (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

10 CONTESTO DELL'INVENZIONE

Le malattie genetiche sono patologie causate da macroscopiche alterazioni dei cromosomi o da microscopiche lesioni (mutazioni puntiformi, delezioni o inserzioni) dei geni: il difetto genetico è ereditabile quando l'alterazione del genoma, presente nei genitori, può essere trasmessa alla progenie. Un difetto
15 genetico è autosomico dominante quando solo una copia mutata del gene (ereditata da un genitore) è necessaria e sufficiente perchè un organismo risulti affetto. Un difetto genetico è autosomico recessivo quando due copie del gene (ereditate da entrambi i genitori) devono essere mutate perchè un organismo risulti affetto. Più di 4000 patologie umane sono dovute a mutazioni di un singolo gene, molte delle
20 quali coinvolgono il tessuto muscolare striato. Tra queste patologie, le sarcoglicanopatie sono gravi distrofie muscolari causate principalmente da mutazioni missenso presenti nei geni codificanti α -, β -, γ - o δ -sarcoglicano e vengono classificate come Distrofie dei Cingoli di tipo 2D, 2E, 2C e 2F, rispettivamente (Laval and Bushby 2004). I sarcoglicani (SGs) formano un
25 complesso tetramericamente strettamente legato al complesso delle proteine associate alla distrofina che svolgono un fondamentale ruolo strutturale e sono coinvolti nel “signaling cellulare” [Barton 2006, Yoshida et al 1998]. In particolare, α -SG è una ectoATPasi [Sandona et al 2004], enzima probabilmente coinvolto nella modulazione ATP-dipendente della contrattilità del muscolo scheletrico [Sandona et
30 al 2005]. I difetti genetici in un singolo sarcoglicano causano la perdita o la forte riduzione dell'espressione anche di tutte le altre subunità con conseguente impossibilità di formare il complesso e localizzare in membrana [Sandona and Betto

2009]. Recentemente, è stato dimostrato che i mutanti missenso di α -SG sono substrati del controllo qualità del reticolo endoplasmatico (RE) e vengono prematuramente eliminate dal sistema ubiquitina-proteasoma [Gastaldello et al 2008, Bartoli et al 2008].

5 Nel 1969, Brody per primo descrisse in un paziente umano un disordine muscolare caratterizzato da un "un deficit del rilassamento muscolare in seguito ad esercizio fisico": la contrazione muscolare risultava nella norma, ma in seguito a ripetute contrazioni si riscontrava un ritardo nella fase di rilassamento, [Brody 1969]. Attualmente la malattia di Brody (BD) è nota come una rara malattia genetica del
10 muscolo scheletrico dovuto a una deficienza della Ca^{2+} -ATPase (SERCA) del reticolo sarco(endo)plasmatico causata da mutazioni missenso, non senso e delezioni in frame del gene ATP2A1, che codifica l'isoforma SERCA1 [Bertchtold et al 2000].

Le tre isoforme della proteina SERCA sono differenzialmente espresse da tre geni
15 distinti. L'isoforma SERCA1 è espressa nei muscoli a contrazione rapida (tipo 2). La deficienza di SERCA1 ha come risultato un ritardo nel rilassamento muscolare dovuto ad un prolungato aumento della concentrazione di calcio nel citoplasma delle fibre muscolari.

Nella specie bovina è stato descritto un disordine muscolare definito
20 "pseudomiopia congenita" (PMT) [Testoni et al 2008]. I sintomi clinici sono una contrattura muscolare indotta da esercizio. Il sequenziamento del DNA ha fornito l'evidenza di una mutazione missenso (R164H) nel gene ATP2A1 bovino [Drögemüller et al 2008]. Inoltre, i risultati biochimici hanno chiaramente dimostrato che i muscoli patologici dei bovini presentano una riduzione selettiva
25 dei livelli di espressione della proteina SERCA1, che giustifica la ridotta attività Ca^{2+} -ATPasica. Di contro, i livelli di mRNA della SERCA1, riscontrati in tutti gli animali affetti dalla patologia, sono risultati comparabili con i livelli di espressione dell'mRNA nei campioni sani [Sacchetto et al 2009].

Sia per la patologia di Brody che per la PMT bovina, la selettiva riduzione dei livelli
30 di espressione della SERCA1, a causa di un difetto del gene ATP2A1, è stata indicata come causa della malattia, e la PMT bovina è stata designata come vera omologa della malattia umana di Brody.

Poichè le mutazioni del gene ATP2A1 non interessano la trascrizione [Sacchetto et al 2009], si è ipotizzato che la risultante proteina potesse essere alterata e presentasse dunque una aumentata suscettibilità alla degradazione attraverso la via ubiquitina-proteasoma (SR). Questa ipotesi si è rivelata corretta: i risultati hanno
5 dimostrato che il mutante R164H della SERCA1 è substrato del sistema controllo qualità e che è prematuramente eliminato dal pathway ubiquitina-proteasoma (Sacchetto et al. Risultati non pubblicati).

La tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT) è una patologia aritmogena, ereditaria, potenzialmente fatale, caratterizzata da una aritmia
10 cardiaca molto grave indotta da stress e/o da emozioni [Liu et al 2008]. Mutazioni nel gene del recettore per la rianodina cardiaca (RyR2) sono state associate alla forma autosomica dominante della CPVT, mentre la forma autosomica recessiva della CPVT è stata associata a mutazioni dei geni *CASQ2* e, recentemente, *TRDN* che codificano la calsequestrina2 e la triadina, rispettivamente [Beard et al 2004; Roux-
15 Buisson et al. 2012]. Queste proteine, assieme al RyR2 e alla giuntina, formano un complesso macromolecolare quaternario a livello del RS giunzionale dei cardiomiociti, responsabile del rilascio del Ca^{2+} dal RS durante la contrazione del muscolo cardiaco. Studi intrapresi sui modelli knock-in della forma dominante e recessiva della CPVT hanno dimostrato che l'abnorme rilascio di Ca^{2+} induce ampie
20 onde di Ca^{2+} ritardate "dopo depolarizzazione" e una "attività indotta", che nel loro insieme determinano aritmie [Liu et al 2009]. Nel modello di topo knock-in (*CASQ2^{R33Q/R33Q}*), la drastica riduzione di *CASQ2* è accompagnata dalla diminuzione di triadina (25%) e giuntina (70%) senza nessun cambiamento dei relativi trascritti [Rizzi et al 2008]. Il mutante di triadina T59R, recentemente identificato in un
25 paziente CPVT, è stato studiato in modelli cellulari e animali suggerendo che esso venga prematuramente eliminato dal sistema ubiquitina-proteasoma della cellula [Roux-Buisson N et al. 2012].

Sarcoglicanopatie, BD e CPVT, anche se interessano il muscolo striato, sono malattie
30 genetiche molto diverse sia per sintomatologia che per eziologia. Tuttavia, è possibile riconoscere quale tratto comune di questi disordini la rimozione

P127272.IT.01

postrascrizionale del prodotto del gene mutato causata da problemi di ripiegamento, che porta ad una *de facto* perdita di funzione .

Al momento attuale non ci sono trattamenti efficaci per le sarcoglicanopatie, per la malattia di Brody (BD) o per le forme recessive della Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT).

Le forme recessive di CPVT, ad esempio, mostrano una incompleta risposta ai β -bloccanti, che ha come esito il riproporsi di aritmie ventricolari e l'arresto cardiaco [Hayashi et al 2009]. I pazienti BD sono comunemente trattati con il dantrolene [Vattemi et al. 2010], un rilassante muscolare (che blocca il complesso recettori della diidropiridina e RyR), ma che, a causa della tossicità epatica, è controindicato per i trattamenti a lungo termine. La terapia genica e cellulare sono entrambe sottoposte a valutazione per la cura delle sarcoglicanopatie e della CPVT, tuttavia sono ancora lontane dall'entrare in trial clinici [Daniel et al 2007; Denegri et al 2012]. La strategia dell'exon skipping, molto promettente nella Distrofia muscolare di Duchenne [Hoffman et al 2011], non è appropriata per le sarcoglicanopatie, la CPVT e la BD poiché le rispettive proteine mutate non possiedono domini di cui si possa fare a meno che possano essere eliminati. L'uso di molecole in grado di promuovere stop-codon-read-through è potenzialmente applicabile in queste malattie quando è presente una mutazione nonsense. Tuttavia, nelle sarcoglicanopatie, ad esempio, la percentuale di mutazioni missenso è largamente superiore a quella degli altri difetti genici .

Allo stato attuale non esistono dunque farmaci approvati per il trattamento delle sarcoglicanopatie, della malattia di Brody (BD) e delle forme recessive della Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT) e quindi c'è una grande necessità, insoddisfatta, di individuare nuovi trattamenti farmacologici per la cura di queste malattie.

Noi abbiamo trovato che piccole molecole conosciute come "correttori del CFTR" sono in grado di cambiare il fenotipo patologico delle sarcoglicanopatie, BD e CPVT promuovendo il ripiegamento e il corretto posizionamento delle proteine mutate mal ripiegate. Questi correttori possono quindi essere usati nel trattamento di malattie genetiche a carico del muscolo striato quali le sarcoglicanopatie, la malattia

P127272.IT.01

di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica .

Referenze

- 5 Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 2004, 85:33-69.
- Bartoli M, Gicquel E, Barrault L, Soheili T, Malissen M, Malissen B, Vincent-Lacaze N, Perez N, Udd B, Danos O, Richard I. Mannosidase I inhibition rescues the human α -sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Hum Mol Genet* 2008, 17:1214-21.
- 10 Barton ER. Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 2006, 290:C411-419.
- 15 Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000, 80:1215-65.
- Brody IA. Muscle contracture induced by exercise: a syndrome attributable to decreased relaxing factor. *New Eng. J Med* 1969, 281:187-92.
- 20 Daniel N, Richard I, Bartoli M. Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 1608–24.
- Denegri M, Avelino Cruz JE, Boncompagni S, De Simone SA, Auricchio A, Villani L, Volpe P, Protasi F, Napolitano C, Priori SG. Gene therapy rescues molecular, structural and electrical defects in a model of genetic arrhythmias. *Circ Res.* 2012, 110:663-8.
- 25 Drögemüller C, Drögemüller M, Leeb T, Mascarello F, Testoni S, Rossi M, Gentile A, Damiani E, Sacchetto R. Identification of a missense mutation in the bovine ATP2A1 gene in congenital pseudomyotonia of Chianina cattle: an animal model of human Brody disease. *Genomics* 2008, 92: 474-77.
- 30

P127272.IT.01

Gastaldello S, D'Angelo S, Franzoso S, Fanin M, Angelini C, Betto R, Sandonà D. Inhibition of proteasome activity promotes the correct localization of disease-causing α -sarcoglycan mutants in HEK-293 cells constitutively expressing β , γ -, and δ -sarcoglycan. *Am J Pathol* 2008, 173:170-81.

5

Hayashi M, Denjoy I, Extramiana F, Maltret A, Buisson NR, Lupoglazoff JM, Klug D, Hayashi M, Takatsuki S, Villain E, Kamblock J, Messali A, Guicheney P, Lunardi J, Leenhardt A. Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2009, 119:2426-34.

10

Hoffman EP, Bronson A, Levin AA, Takeda S, Yokota T, Baudy AR, Connor EM. Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy muscle progress in exon skipping and stop codon read through. *Am J Pathol*. 2011, 179:12-22.

15

Laval SH and Bushby KMD. Limb-girdle muscular dystrophies – from genetics to molecular pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2004, 30: 91–105.

Liu N, Ruan Y, Priori SG. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008, 51:23-30.

20

Liu N, Rizzi N, Boveri L, Priori SG. Ryanodine receptor and calsequestrin in arrhythmogenesis: what we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2009, 46:149-159.

25

Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Nori A, Turcato F, Colombi B, Bicciato S, Arcelli D, Spedito A, Scelsi M, Villani L, Esposito G, Boncompagni S, Protasi F, Volpe P, Priori SG. Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calsequestrin: A complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res* 2008, 103:298–306.

30

Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvain A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I, Durand P, Guicheney P, Kyndt F, Leenhardt A, Le Marec H, Lucet V, Mabo P, Probst V,

P127272.IT.01

Monnier N, Ray PF, Santoni E, Trémeaux P, Lacampagne A, Fauré J, Lunardi J, Marty I. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 2012, 21:2759-67.

- 5 Sacchetto R, Testoni S, Gentile A, Damiani E, Rossi M, Liguori R, Drögemüller C, Mascarello F. A defective SERCA1 protein is responsible for congenital pseudomyotonia in Chianina cattle. *Am J Pathol* 2009, 174:565-73.

- 10 Sandonà D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R. Characterization of the ATP-hydrolyzing activity of α -sarcoglycan. *Biochem J* 2004, 381:105-12.

Sandonà D, Danieli-Betto D, Germinario E, Biral D, Martinello T, Liroy A, Tarricone E, Gastaldello S, Betto R. The T-tubule membrane ATP-operated P2X₄ receptor influences contractility of skeletal muscle. *FASEB Journal* 2005, 19:1184-1186.

- 15 Sandonà D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Rev Mol Med* 2009, 11:e28.

Testoni S, Boni P, Gentile A. Congenital pseudomyotonia in Chianina cattle. *Vet Rec* 2008, 163:252.

20

Vattemi G, Gualandi F, Oosterhof A, Marini M, Tonin P, Rimessi P, Neri M, Guglielmi V, Russignan A, Poli C, van Kuppevelt TH, Ferlini A, Tomelleri G. Brody Disease: Insights Into Biochemical Features of SERCA1 and Identification of a Novel Mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010, 69:246-52.

25

Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M. Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 1583-1590.

30 **RIASSUNTO DELL'INVENZIONE**

La soluzione fornita dalla presente invenzione riguarda l'uso dei correttori del CFTR, in grado di promuovere il ripiegamento e la maturazione del CFTR, nel

P127272.IT.01

trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato scelte tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody e le forme recessive di Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica .

5 Quindi, la presente invenzione, intende usare un correttore del CFTR per il trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody e le forme recessive di Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica

10 Secondo un altro aspetto, la presente invenzione fornisce un metodo di trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody e le forme recessive di Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica comprendente la somministrazione di una efficace e sicura dose di un correttore del CFTR a un paziente che lo necessita.

15 Secondo un altro aspetto, la presente invenzione fornisce la composizione farmaceutica comprendente un correttore del CFTR e uno o più eccipienti, farmacologicamente accettabili, da usare nel trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody e le forme recessive di Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica.

20

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1 **I correttori del CFTR inducono il recupero del mutante R98H di alfa-sarcoglicano nel modello cellulare HEK293.** Il livello proteico di alfa-sarcoglicano (α -SG) è stato determinato mediante western blot (un esperimento rappresentativo viene mostrato nella parte alta della figura) sul totale di proteine purificate da cellule, esprimenti il mutante R98H, trattate sia con i correttori del CFTR (composti A, B, C, D, E ed F come indicato), MG132 (inibitore del proteasoma) usato come controllo positivo, o l'agente veicolante dei correttori (DMSO) usato come controllo negativo. Cellule esprimenti la forma wild type di alfa-sarcoglicano sono state usate per comparazione. Per normalizzare il contenuto proteico, è stata determinata l'espressione della proteina β -actina, usata quale marcatore interno. Il grafico nella parte bassa della figura mostra i valori medi (+/- errore standard) dell'espressione

25

30

P127272.IT.01

di alfa-sarcoglicano determinati mediante analisi densitometrica su almeno tre esperimenti indipendenti. I valori sono espressi come percentuale del contenuto di proteina alfa-sarcoglicano presente in cellule esprimenti il mutante R98H trattate con l'agente veicolante. **, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$.

5

Figure 2 I correttori di CFTR inducono la corretta localizzazione di membrana del muante di alfa-sarcoglicano V247M in cellule HEK293. Cellule esprimenti il mutante di alfa-sarcoglicano V247M coltivate su vetrino sono state trattate con l'agente veicolante i correttori (DMSO) usato come controllo negativo, MG132 usato
10 come controllo positivo, il composto E e il composto D. Cellule esprimenti la forma wild type di alfa-sarcoglicano (α -SG WT) sono state utilizzate per comparazione. Dopo i trattamenti, cellule intatte sono state immuno-decorate con un anticorpo specifico per un epitopo extracellulare di alfa-sarcoglicano così da marcare solo la
15 proteine presente nella membrana plasmatica delle cellule. L'anticorpo legato è stato visualizzato grazie all'uso di un anticorpo secondario coniugato con il fluoroforo TRITC. Le immagini sono state raccolte tramite microscopio confocale a luce laser (Leica). Sotto ogni immagine di fluorescenza è riportato lo stesso campo raccolto in luce trasmessa.

Figure 3 I correttori del CFTR inducono il recupero del mutante R164H di SERCA1 nelle cellule HEK293. Il livello proteico di SERCA1 è stato determinato mediante western blot (un esperimento rappresentativo è mostrato nella parte alta della figura) sul lisato proteico totale purificato da cellule HEK293 esprimenti il mutante R164H e trattate con i correttori del CFTR, (composti A, B, C, D, E and F come
25 indicato), MG132 o l'agente veicolante i correttori (DMSO). Cellule esprimenti la forma wild type di SERCA1 sono state usate per confronto. Per normalizzare il contenuto proteico, è stata determinata l'espressione della proteina β -actina, usata quale marcatore interno. Il grafico nella parte bassa della figura mostra i valori medi (+/- errore standard) dell'espressione di SERCA1 determinati mediante analisi
30 densitometrica su almeno tre esperimenti indipendenti. I valori sono espressi come percentuale del contenuto di proteina SERCA1 presente in cellule esprimenti il la forma wild type. ***, $P \leq 0.001$; **, $P \leq 0,01$; *, $P \leq 0.05$.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**Definizioni**

Il termine "CFTR" come usato da qui in poi indica il "Regolatore della Conduttanza Trans Membrana della Fibrosi Cistica", o una mutazione del CFTR capace di
5 regolarne l'attività, includente, ma non limitato, al $\Delta F508$ CFTR .

Il termine "correttori del CFTR" come usato da qui in poi indica una molecola in grado di correggere la "maturazione" difettiva della proteina e dunque in grado di aumentare il numero di CFTR presenti nella membrana cellulare "Protein folding" come usato da qui in poi indica il processo attraverso il quale una catena
10 polipeptidica si ripiega in una conformazione tridimensionale specifica, assumendo la sua forma funzionale o conformazionale.

Per "trafficking della proteina" si intende il meccanismo attraverso il quale le proteine destinate alla membrana plasmatica o alla secrezione transitano attraverso il Reticolo Endoplasmatico, l'apparato di Golgi e mediante il trasporto vescicolare
15 raggiungono la destinazione finale.

Il termine "proteina misfolded", come usato da qui in poi, indica una proteina incapace di raggiungere la sua forma funzionale o conformazionale a causa della presenza di aminoacidi non corretti o della delezione di aminoacidi.

Il termine "mutazione missenso", come usato da qui, in poi indica una mutazione puntiforme consistente nel cambiamento di un singolo nucleotide che causa un
20 cambio di significato del codone con il conseguente inserimento di un aminoacido differente.

Il termine "mutazione non senso", come usato da qui in poi, indica una mutazione puntiforme consistente nel cambiamento di un singolo nucleotide che trasforma un
25 codone codificante un aminoacido in un codone di stop.

Il termine "delezione in frame", come usato da qui in poi, indica un mutazione genetica causata dalla perdita di tre nucleotidi, o multipli di tre, da una sequenza di DNA che causa la perdita di uno o più aminoacidi senza produrre ulteriori conseguenze sulla sequenza proteica.

Il termine "ubiquitina" si riferisce a una piccola proteina regolatoria che può essere covalentemente legata alle proteine così da marcarle per la loro distruzione
30 attraverso il proteasoma.

P127272.IT.01

Il termine “proteasoma” si riferisce ad un complesso proteico macromolecolare responsabile della degradazione dipendente da ATP delle proteine marcate con ubiquitina.

5 Il termine “coltura primaria”, come usato di seguito, indica cellule umane o di origine animale isolate mediante dissociazione meccanica e/o enzimatica da uno specifico tessuto o frammento biotico di tessuto.

10 Il termine “biopsia muscolare”, come usato di seguito, indica un frammento di tessuto muscolare scheletrico rimosso da un soggetto umano o animale che può essere usato per diagnosticare una patologia del tessuto muscolare e che può essere usato, dopo acquisizione del consenso informato del soggetto umano, per scopi di ricerca.

15 Il termine “animale modello di malattia” indica un animale vivo, non umano, che a causa di una variazione naturale del suo genoma, o a causa di una manipolazione genica artificiale del suo genoma, sviluppa una patologia simile ad una malattia umana.

20 Il termine “topo Knock out (KO)” indica un topo geneticamente ingegnerizzato nel quale un gene esistente è stato inattivato, o “knocked out,” mediante la sua sostituzione o la sua distruzione con un frammento artificiale di DNA. La mancanza dell’attività di quel gene causa un cambiamento del fenotipo del topo e può portare allo sviluppo di una patologia simile ad una malattia umana.

25 Il termine “topo Knock in (KI)”, come usato di seguito, indica un topo geneticamente ingegnerizzato nel quale la regione codificante di un gene viene rimpiazzata dalla stessa regione codificante contenente però una mutazione puntiforme. L’espressione del gene mutato causa un cambiamento del fenotipo del topo e può portare allo sviluppo di una patologia simile ad una malattia umana.

Il termine LGMD-2D significa “Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2D” ovvero distrofia dei cingoli di tipo 2D (sarcoglicanopatia) causata da mutazione del gene *SGCA* codificante alfa-sarcoglicano.

30 Il termine LGMD-2E significa “Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2E” ovvero distrofia dei cingoli di tipo 2E (sarcoglicanopatia) causata da mutazione del gene *SGCB* codificante beta- sarcoglicano.

P127272.IT.01

Il termine LGMD-2C significa "Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2C" ovvero distrofia dei cingoli di tipo 2C (sarcoglicanopatia) causata da mutazione del gene *SGCG* codificante gamma-sarcoglicano.

5 Il termine LGMD-2F significa "Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2F" ovvero distrofia dei cingoli di tipo 2F (sarcoglycanopathy(sarcoglicanopatia) causata da mutazione del gene *SGCD* codificante delta- sarcoglicano.

Come usato da qui in poi, "trattare" in riferimento ad una malattia significa: (1) migliorare una malattia o una o più delle manifestazioni biologiche della malattia, (2) interferire con (a) uno o più punti della cascata biologica che causa o è responsabile della malattia o (b) una o più manifestazione biologica della malattia, 10 (3) alleviare uno o più dei sintomi o degli effetti associati con la malattia, o (4) rallentare la progressione dalla malattia o una o più delle manifestazioni biologiche dalla malattia.

"Il trattamento," ad esempio, include qualunque trattamento di una condizione 15 patologica o malattia nel mammifero, particolarmente nell'uomo, e include: (a) la prevenzione della condizione patologica o della malattia, del disordine o del sintomo dovuto a questa condizione, che si manifesta in un soggetto che può essere predisposto alla condizione patologica, o alla malattia o al disordine ma nel quale, tale condizione non è stata ancora diagnosticata; (b) l'inibizione della condizione 20 patologica o malattia, del disordine o sintomo di questo, e quindi l'arresto del suo decorso; e (c) l'attenuazione, l'alleviamento o il miglioramento della condizione patologia o della malattia o del disordine o del suo sintomo, come ad esempio determinando la regressione della condizione patologia o della malattia o del disordine o del suo sintomo.

25 Come qui usato, "sicura e efficace quantità" in riferimento a un composto di formula (I) o ad un sale di questo farmaceuticamente compatibile, o un altro agente farmaceuticamente attivo, significa una quantità del composto sufficiente a trattare la condizione patologica del paziente, ma sufficientemente bassa da evitare effetti secondari gravi (in un ragionevole rapporto beneficio/rischio) secondo l'intento dei 30 criteri medici. Una quantità sicura ed efficace del composto sarà variabile a seconda del particolare composto considerato (ad esempio tenendo in considerazione la forza, l'efficacia e l'emivita del composto); la via di somministrazione scelta; la

P127272.IT.01

malattia da trattare; la severità della malattia da trattare; l'età, la statura, il peso e la condizione fisica del paziente da trattare; la storia medica del paziente da trattare; la durata del trattamento; la natura di terapie concomitanti ; gli effetti terapeutici desiderati.

5 Come qui usato, "paziente" si riferisce ad un soggetto umano (sia adulto che bambino) o altro soggetto animale affetto dalla malattia. Nella presente realizzazione "paziente" è riferito ad un soggetto umano.

Come qui usato, "eccipiente farmaceuticamente accettabile" significa una sostanza farmaceuticamente compatibile, una miscela di ingredienti o una sostanza
10 veicolante atti a dare forma o consistenza al composto farmaceutico. Ogni eccipiente deve essere compatibile con gli altri ingredienti del composto farmaceutico quando mescolato con essi, così da evitare le interazioni che potrebbero sostanzialmente ridurre l'efficacia del composto di formula (I) o del sale di questo farmaceuticamente idoneo quando somministrati ad un paziente e le interazioni che
15 potrebbero dar luogo a composti farmaceutici non farmaceuticamente idonei. In aggiunta ciascun eccipiente deve essere per forza farmaceuticamente-idoneo che significa di sufficiente alta purezza.

Nella sua realizzazione, la presente invenzione fornisce correttori del
20 processamento cellulare della proteina "Regolatore della Conduttanza di Trans Membrana della Fibrosi Cistica" (da qui in avanti CFTR), nel trattamento di malattie genetiche che affliggono il muscolo striato tra le quali le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

25 Nella presente realizzazione le malattie genetiche che affliggono il muscolo striato sono le sarcoglicanopatie o la malattia di Brody (BD) o le le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

30 I correttori del CFRT in uso nella presente invenzione sono ampiamente descritti, ad esempio nel brevetto US Numeri US8227615, US8143295, US7977322, US7939558, US7645789 US6770663; nella domanda di brevetto US Numeri US20120184583,

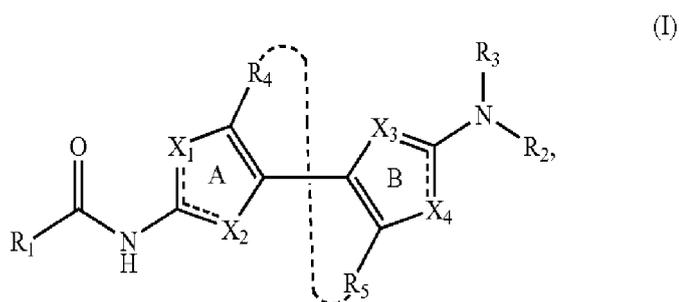
P127272.IT.01

US20120101143, US20120004405, US20110281873, US20110257223,
 US20110245322, US20110201544, US20110177999, US20110071206,
 US20110060024, US20100331297, US20100273839, US20100144798,
 US20100113555, US20090246137, US20090253736, US20090221597,
 5 US20090131492, US20080319008, US20080318984, US20080176899,
 US20080161371, US20060052358, US20050113423;
 nel brevetto europeo Numero EP1912983 B1; nella domanda di brevetto
 giapponese Numero 2009057364; nelle PCT domande di brevetto internazionali
 WO2012021974 WO2012036573 WO2011137427, WO2011133956,
 10 WO2011133953, WO2011133951, WO2011008931, WO2010151747,
 WO2010068863, WO2010066912, WO2010048125, WO2010054138,
 WO2009123896, WO2009105234, WO2009108657, WO2009062118,
 WO2009051909, WO2009051910, WO2009039567, WO2009023509,
 WO2008141119, WO2008127399, WO2007075946, WO2007021982,
 15 WO2006101740, WO2006052821, WO2005120497, WO2005075435,
 WO2004080972, WO2004111014

La preparazione di tali composti è ampiamente descritta nelle pubblicazioni sopra
 menzionate.

20

Una prima classe rappresentativa di correttori del CFTR è resa nota nel
 WO2009051909 come composto di formula (I)



25

o sali, soluzioni, idrati, e forme profarmaco di questi, e stereoisomeri di questi,
 dove:

A e B sono anelli aromatici ciascuno indipendentemente scelti tra tiazolo e ossazolo,
 con X1, X2, X3 e X4 eteroatomi scelti tra N, O e S, con ciascuna linea tratteggiata che

P127272.IT.01

connette X1 a X2 entro l'anello A, e X3 a X4 entro l'anello B, essendo un singolo o doppio legame, a condizione che quando un legame è un doppio legame poi l'altro legame sia un singolo legame, e con la linea tratteggiata che connette R4 e R5 ad indicare gli isomeri di rotazione attorno alla linea solida di legame che connette gli
 5 anelli A e B,

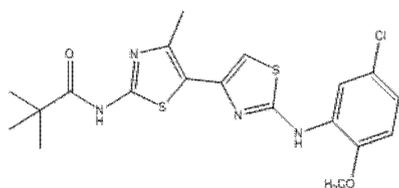
R1 è un gruppo sostituito o non sostituito con gruppi alifatici e gruppi arilici, a condizione che quando R1 è un fenile non sostituito allora R3 o R5 è diverso dall'idrogeno;

10 R2 è un arile sostituito o non sostituito;

R3 è un idrogeno o un gruppo alifatico sostituito o non sostituito; e R4 e R5 sono rispettivamente idrogeni, gruppi alifatici minori sostituiti o non sostituiti, oppure formano un ponte che coinvolge un eteroatomo o una catena alifatica minore sostituita o non sostituita; la linea tratteggiata che connette R4 e R5
 15 indica sia l'assenza di legame tra R4 e R5 che rimangono così indipendenti, o formano il suddetto legame tra R4 e R5.

Un composto di formula (I) particolarmente favorito è

20

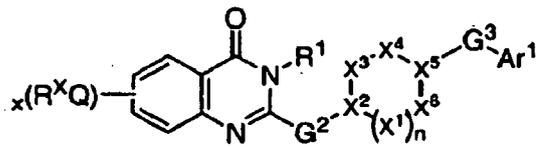


25

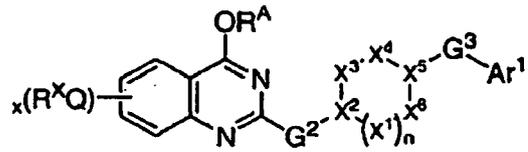
N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide. (da qui in avanti Composto A).

Una seconda classe rappresentativa di correttori CFTR è descritta in WO2004111014 come composto di formule (V-A,V-B e V-E)

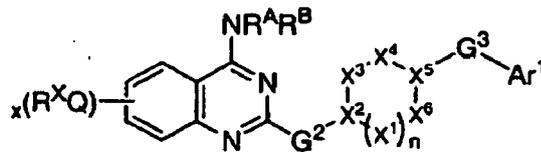
30



V-A



V-B



V-E

o sali di questo farmaceuticamente accettabili,

dove RA e RB sono rispettivamente V-RV, o RA e RB tenuti insieme con l'atomo di azoto, formano un anello 3-12 monociclico o biciclico, parzialmente insaturo, o
 5 completamente insaturo avente 0-4 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno o zolfo. Detto anello può essere sostituito.

V è un legame oppure è a una catena C1-C6 alchlidene, che può essere sostituita dove fino a due unità di metilene di V possono essere indipendentemente sostituiti con -CO-, -CS-, -COCO-, -CONR'-, -CONR'NR'-, -CO2-, -OCO-, -NR'CO2-, -O-, -NR'CONR'-,
 10 -OCONR'-, -NR'NR', -NR'NR'CO-, -NR'CO-' -S-, -SO, -SO2-, -NR'-, -SO2NR'-, NR'SO2-, -NR'SO2NR'-, e ogni significato di RV è indipendentemente scelto tra R', un alogeno, NO2, o CN, e dove RA e RB, o ogni anello formato da RA e RB tenuto insieme dall'atomo di azoto, possono essere indipendentemente sostituiti da q che prende il posto di U-RU, dove q is 0-5, U è un legame o una catena di alchilideni contenente
 15 C1-C6 atomi che possono essere sostituiti in cui dove fino a due unità di metilene di U possono essere indipendentemente sostituiti con -CO-, -CS-, -COCO-, -CONR'-, -CONR'NR'-, -CO2-, -OCO-, -NR-CO2-, -O-, -NR'CONR'-, -OCONR'-, -NR'NR', -NR'NR'CO-, -NR'CO-, -S-, -SO, -SO2- -NR'-, -SO2NR'-, -NR'SO2-, -NR'SO2NR'-, e ogni significato di RU è indipendentemente scelto tra R', un alogeno, NO2, o CN,

20 R1 è assente o è Y-RY;

P127272.IT.01

Y è un legame una catena di alchilideni C1-C6, che può essere sostituita, dove fino a due unità di metilene di Y possono essere indipendentemente sostituiti con -CO-, -CONR-, -O-, -NRCO-, -S-, -SO2-, -NR-, -SO2NR-, o -NRSO2-, e ogni significato di RY è indipendentemente scelto tra R', OR', SR', N (R')2, un alogeno, NO2, o CN, a

5 condizione che quando R1 è presente, sia sempre legato ad un atomo di azoto mediante un atomo di carbonio; ciascuna sostituzione di R è indipendentemente scelta tra l'idrogeno o un gruppo alifatico C1-8 sostituito a scelta; e ciascuna sostituzione di R' indipendentemente scelta tra l'idrogeno o un gruppo sostituito a scelta tra un gruppo alifatico C1-C8, un 3-8-ramificato anello monociclico saturo,

10 parzialmente insaturo, o totalmente insaturo avente 0-3 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno, o zolfo, o un 8-12 ramificato anello biciclicico saturo, parzialmente insaturo, o totalmente insaturo avente 0-5 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno, o zolfo; o due sostituzioni di R', o due sostituzioni di R, sono tenuti insieme con gli atomi ai quali sono legati a formare un

15 anello 3-12 monociclico o biciclicico, che può essere sostituito, saturo, parzialmente insaturo, o totalmente insaturo avente 0-4 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno, o zolfo; Q è un legame o una catena di C1-C6 alchilideni che può essere sostituita dove fino a due unità di metilene di Q possono essere indipendentemente rimpiazzate da -CO-, -CS-, -COCO-, -CONR-, -CONRNRCO2-, -

20 OCO-, -NRCO2-, -O-, -NRCONR-, -OCONR-, -NRNR, -NRNRCO-, -NRCO-, -S-, -SO-, -SO2-, -NR-, -SO2NR-, -NRSO2-, -NRSO2NR-, e ogni significato di RX è indipendentemente R', un alogeno, NO2, o CN; dove x è 0-5; dove G2 e G3 sono ciascuno indipendentemente assenti o una catena di C1-C6 alchilideni che può essere sostituita e , dove una o due unità di metilene possono essere indipendentemente

25 sostituite da -CO-, -CS-, -SO-, -SO2-, -NR'-, NSO2R'-, NCOR'-, -O-, o -S-, e dove uno o due atomi di idrogeno di una o più unità di metilene possono essere sostituiti da R' Ar1 è assente o è un anello monociclico 3-8, saturo, parzialmente insaturo, o totalmente insaturo avente 0-3 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno, o zolfo, o un anello biciclicico 8-12 saturo, parzialmente insaturo, o

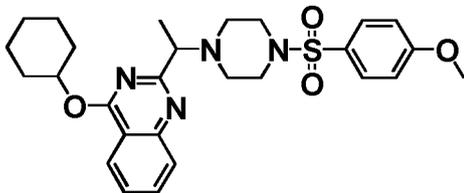
30 totalmente insaturo avente 0-5 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno, o zolfo; dove Ar1 può essere sostituito con (WRW)m, dove m 0-5 e W è un legame o è una C1-C6 catena di alchilideni, che può essere sostituita, dove fino a due

P127272.IT.01

unità di metilene di T possono essere indipendentemente rimpiazzate da -CO-, -CS-,
 -COCO-, -CONR-, -CONRNR-, -CO₂-, -OCO-, -NRCO₂-, -O-, -NRCONR-, -OCONR-, -NRNR,
 -NRNRCO-, -NRCO-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -NRSO₂NR-, e ciascun
 significato di RW è indipendentemente scelto tra R', un alogeno, NO₂, or CN; dove n
 5 è 0, 1, o 2; X₂ e X₅ sono ciascuno indipendentemente scelti tra CR' o N; e ciascun
 valore di X₁, quando presente, e X₃, X₄ e X₆ sono ciascun indipendentemente, se la
 valenza e la stabilità permettono, scelti tra C (R')₂, -O-, -NR-, S, C=O, or C=S.

Un composto di formula (V-B) particolarmente favorito è

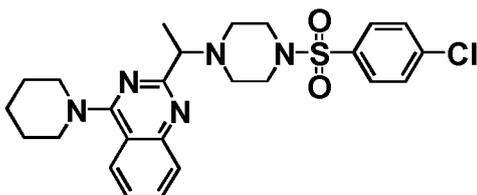
10



15

4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina
 (da qui in avanti Composto B).

20 Un composto di formula (V-E) particolarmente favorito è



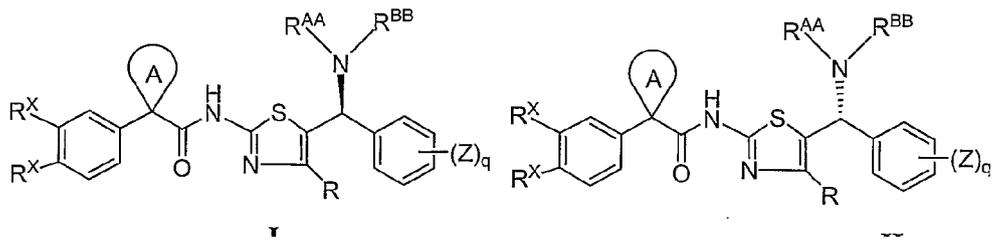
25

2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina
 (da qui in avanti Composto C).

Una terza classe rappresentativa di correttori del CFTR è descritta in
 30 WO2007021982

Un composto di formula (III) o (IIIa)

P127272.IT.01



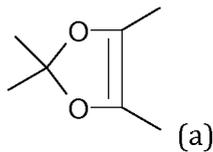
(III)

(IIIa)

5

o un sale di questo farmaceuticamente idoneo, dove: ciascun

R^x è indipendentemente un idrogeno, un alogeno, CF_3 , C1-C4 alchil, o -OC1-C4 alchil; a condizione che entrambe gli R^x non siano simultaneamente idrogeni; o I due R^x , presi insieme formino l'anello (a):



10

X è CH_2 , CF_2 , CH_2-CH_2 , or CF_2-CF_2 ; l'anello A è un anello 3-7 monociclico cicloachilico;

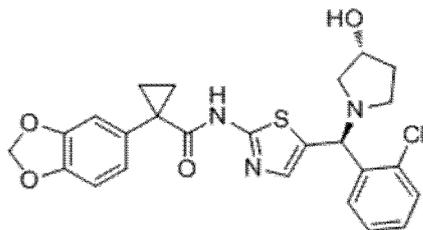
R^{AA} e R^{BB} , assieme all'atomo do idrogeno, formano un anello pirrolidinilico sostituito con OR' ;

15 R' è un idrogeno o un C1-C6 alifatico, dove fino a due unità di carbonio del suddetto alifatico possono essere indipendentemente sostituite da -CO-, -CS-, -COCO-, -CONR-, -CONRNR-, -CO₂-, -OCO-, -NRCO₂-, -O-, -NRCONR-, -OCONR-, -NRNR-, -NRNRCO-, -NRCO-, -S-, -SO-, -SO₂-, -NR-, -SO₂NR-, NRSO₂-, or -NRSO₂NR-;

R è un idrogeno o un gruppo C1-C6 alifatico;

20 Z è un sostituyente elettron attrattore; e q è 0-3.

Un composto di formula (III) (V-E) particolarmente favorito è

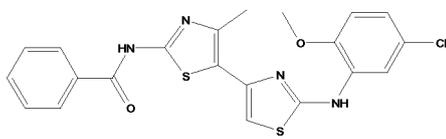


P127272.IT.01

1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (da qui in avanti Composto D).

In un'altra realizzazione, la presente invenzione fornisce i correttori del CFTR per
 5 l'uso nel trattamento di malattie genetiche che affliggono il muscolo striato scelte tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT) che sono selezionati tra:

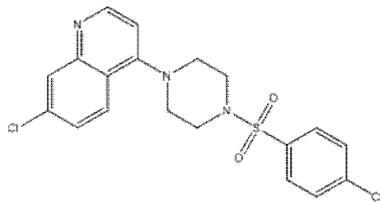
10



15

N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzamide (da qui in avanti Composto E).

20

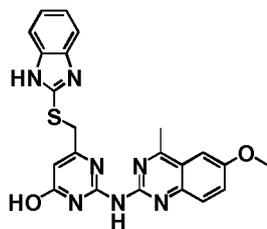


7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonyl)piperazin-1-il)chinolina
 (da qui in avanti Composto F).

25

In una ulteriore realizzazione, la presente invenzione fornisce i correttori del CFTR per l'uso nel trattamento di malattie genetiche che affliggono il muscolo striato scelte tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT) che sono scelti tra:

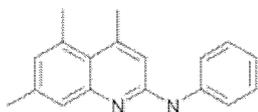
30



P127272.IT.01

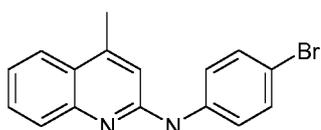
6-(1H-Benzoimidazol-2-il-sulfanilmetil)-2-(6-metossi-4-metil-chinazolina-2-ilamino)-pirimidin-4-olo;(Composto G).

5

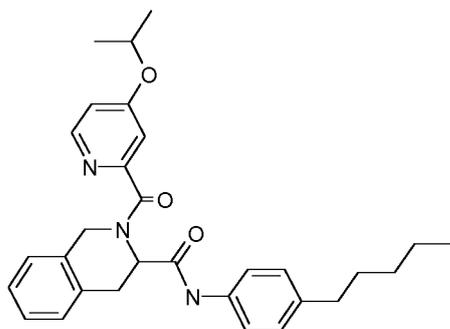


4,5,7-trimetil-N-fenilchinolin-2-amina;(Composto H).

10



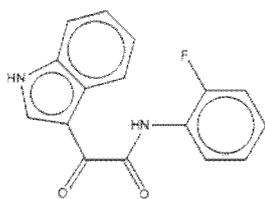
N-(4-bromofenil)-4-metilchinolin-2-amina; (Composto I).



15

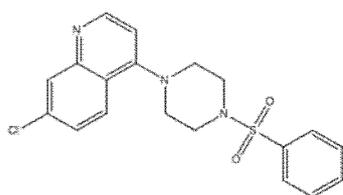
2-(4-isoprossipicolinoil)-N-(4-pentilfenil)-1,2,3,4-tetraidroisochinolina-3-carbossiammide (Composto L).

20



N-(2-fluorofenil)-2-(1H-indol-3-il)-2-ossoacetammide; (Composto M).

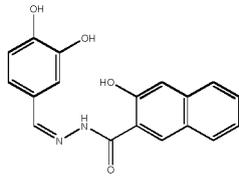
25



P127272.IT.01

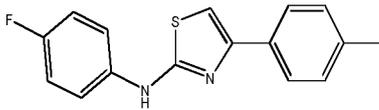
7-cloro-4-(4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina(Composto N).

5



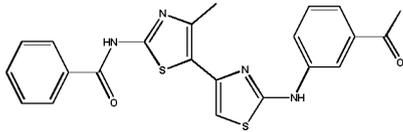
(Z)-N'-(3,4-di idrossibenzilidene)-3-idrossi-2-naftoidrazide;(Composto O).

10



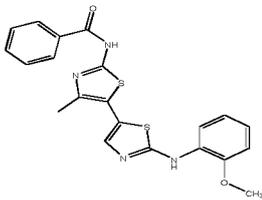
N-(4-fluorofenil)-4-p-toliltiazol-2-ammina(Composto P).

15



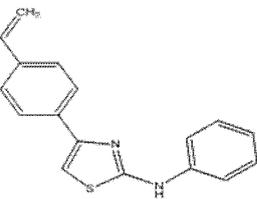
N-(2-(3-acetilfenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)benzamide; (Composto Q).

20



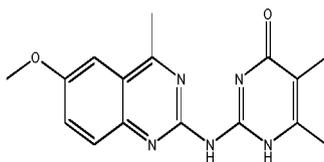
N-(2'-(2-metossifenilamino)-4-metill-5,5'-bitiazol-2-il)benzamide;(Composto R).

25



N-fenil-4-(4-vinilfenil)tiazol-2-ammina; (Composto S).

30

2-(6-metossi-4-metilchinazolina-2-il-amino)-5,6-dimetilpirimidin-4(1H)-one.
(Composto T).

P127272.IT.01

I composti dell'invenzione possono essere somministrati come sale farmaceutico appropriato. Come usato da qui in poi, il termine "sale farmaceutico appropriato" si riferisce a un sale che mantiene l'attività biologica desiderata del composto e mostra minimi effetti tossici indesiderati. I sali farmaceutici dei composti possono essere usati per fornire maggior stabilità o solubilità ad una molecola così da facilitare la formulazione in dosi. Questi sali farmaceutici possono essere preparati *in situ* durante la fase finale di isolamento e purificazione, o separatamente, facendo reagire il composto purificato, o un sale farmaceuticamente non appropriato con una base o un acido opportuno, vedi Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **1977**, 66, 1-19

10

Preparazione dei composti

I composti da usare in accordo con l'invenzione possono essere preparati secondo vari metodi, inclusa la chimica standard. Alcune delle sostanze base da usare secondo l'invenzione sono ben note e facilmente disponibili da fornitori di prodotti chimici.

15

Quindi per esempio, il Composto A può essere preparato secondo la procedura descritta in WO 2009051909.

I Composti B e C possono essere preparati in accordo con la procedura descritta in WO200411104.

20

Il Composto D può essere preparato secondo la procedura descritta in WO 2005075435.

I Composti G, E, L, P, Q, R e S, possono essere preparati secondo la procedura descritta in US 6770663.

I Composti F e N sono composti disponibili commercialmente.

25

Il Composto M può essere preparato in accordo con la procedura descritta in WO2006699256.

Il Composto O può essere preparato secondo quanto descritto in JP 2009057364.

Metodi d'uso

30

I metodi di trattamento dell'invenzione comprendono la somministrazione di una dose sicura ed efficace di un correttore del CFTR al paziente che la necessita.

P127272.IT.01

Un correttore del CFTR, in accordo con l'invenzione può essere somministrato mediante qualsiasi via di somministrazione adatta, ma in particolare mediante somministrazione orale.

- 5 Un correttore del CFTR, in accordo con l'invenzione, può essere somministrato secondo un regime di dosaggio, per il quale un numero di dosi vengono somministrate a intervalli diversi di tempo per un dato periodo. Per esempio, le dosi possono essere somministrate una, due, tre o quattro volte al giorno.
- 10 Le dosi possono essere somministrate fino al raggiungimento dell'effetto terapeutico desiderato o indefinitamente per mantenere l'effetto terapeutico desiderato. Il dosaggio adatto, comprendente la durata di tale regime, può dipendere dalla gravità della malattia che deve essere trattata, dall'età e dalle condizioni fisiche del paziente, dalla storia medica del paziente, dalla natura di
- 15 terapie concomitanti, dall'effetto terapeutico desiderato, e da fattori legati alle conoscenze e all'esperienza del professionista esperto. Sarà inoltre compito del professionista esperto capire se un regime terapeutico richieda un aggiustamento nel dosaggio o nella tempistica in base alla risposta individuale del paziente.
- 20 In un certo ambito, l'invenzione fornisce un correttore del CFTR nel trattamento di una malattia genetica che colpisce il muscolo striato selezionata tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).
- 25 Da un lato, l'invenzione fornisce un correttore del CFTR da usare nel trattamento delle sarcoglicanopatie.

Da un lato, l'invenzione fornisce un correttore del CFTR da usare nel trattamento della malattia di Brody (BD).

P127272.IT.01

Da un lato, l'invenzione fornisce un correttore del CFTR da usare nel trattamento delle forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

5 In un aspetto essenziale, l'invenzione utilizza un correttore del CFTR nella preparazione di un medicinale da usare per il trattamento di malattie genetiche che affliggono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

10

In un ulteriore aspetto essenziale, l'invenzione fornisce un metodo di trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT) comprendente la
15 somministrazione di un dose sicura ed efficace di un correttore del CFTR a un paziente che la necessita.

In un aspetto essenziale, l'invenzione fornisce un correttore del CFTR selezionato tra:

- 20 N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide
(Composto A);
4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina
(Composto B);
2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina
25 (Composto C);
1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);
N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide
(Composto E);
30 7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina
(Composto F);

P127272.IT.01

- 6-(1H-Benzoimidazol-2-il-sulfanilmetil)-2-(6-metossi-4-metil-chinazolina-2-il-amino)-pirimidin-4-olo (Composto G);
 4,5,7-trimetil-N-fenilchinolin-2-amina (Composto H);
 N-(4-bromofenil)-4-metilchinolin-2-amina (Composto I);
- 5 2-(4-isopropossipicolinoil)-N-(4-pentilfenil)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolina-3-carbossiammide (Composto L);
 N-(2-fluorofenil)-2-(1H-indol-3-il)-2-ossoacetammide (Composto M);
 7-cloro-4-(4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto N);
 7-cloro-4-(4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto O);
- 10 N-(4-fluorofenil)-4-p-toliltiazol-2-ammina (Composto P);
 N-(2-(3-acetilfenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)benzammide (Composto Q);
 N-(2-(3-acetilfenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)benzammide (Composto R);
 N-fenil-4-(4-vinilfenil)tiazol-2-ammina (Composto S);
 2-(6-metossi-4-metilchinazolina-2-il-amino)-5,6-dimetilpirimidin-4(1H)-one.
- 15 (Composto T) per l'uso nel il trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo scheletrico selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT)
- 20 In un aspetto essenziale, l'invenzione utilizza un correttore del CFTR selezionato tra:
 N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide (Composto A);
 4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina
- 25 (Composto B);
 2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina (Composto C);
 1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);
- 30 N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide (Composto E);
 7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto F);

P127272.IT.01

nella preparazione di un medicinale da usare nel trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

5

In un ulteriore aspetto essenziale, l'invenzione fornisce un metodo di trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT) comprendenti la somministrazione di una dose sicura ed efficace di N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide (Composto A);
 4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina (Composto B);
 2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina (Composto C);
 1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);
 N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide (Composto E);
 7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto F); ad un paziente che ne ha necessità.

Composizione

I correttori del CFTR possono essere formulati in una composizione farmaceutica prima di essere somministrati ad un paziente.

Di conseguenza, da un lato l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente un correttore del CFTR e uno o più eccipienti farmacologicamente appropriati da usare nel trattamento delle malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT)

P127272.IT.01

Secondo un aspetto essenziale, l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente un correttore del CFTR e uno o più eccipienti farmacologicamente appropriati da usare nel trattamento delle malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT)

In un altro aspetto fondamentale, l'invenzione riguarda la composizione farmaceutica comprendente un correttore del CFTR selezionato tra:

N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide (Composto A);

4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina (Composto B);

2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina (Composto C);

1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);

N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide (Composto E);

7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto F);

6-(1H-Benzoimidazol-2-il-sulfanilmetil)-2-(6-metossi-4-metil-chinazolina-2-ilamino)-pirimidin-4-olo (Composto G);

4,5,7-trimetil-N-fenilchinolin-2-amina (Composto H);

N-(4-bromofenil)-4-metilchinolin-2-amina (Composto I);

2-(4-isopropossipicolinoil)-N-(4-pentilfenil)-1,2,3,4-tetrahydroisochinolina-3-carbossiammide (Composto L);

N-(2-fluorofenil)-2-(1H-indol-3-il)-2-ossoacetammide (Composto M);

7-cloro-4-(4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto N);

7-cloro-4-(4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto O);

N-(4-fluorofenil)-4-p-toliltiazol-2-ammina (Composto P);

P127272.IT.01

N-(2-(3-acetilfenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)benzammide (Composto Q);

N-(2-(3-acetilfenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)benzammide (Composto R);

N-fenil-4-(4-vinilfenil)tiazol-2-ammina (Composto S);

2-(6-metossi-4-metilchinazolina-2-il-amino)-5,6-dimetilpirimidin-4(1H)-one.

5 (Composto T) e uno o più eccipienti farmacologicamente adeguati da usare nel trattamento delle malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT)

10 Secondo un altro aspetto fondamentale, l'invenzione si riferisce ad una composizione farmaceutica comprendente un correttore del CFTR selezionato tra:

N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide

(Composto A);

4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina

15 (Composto B);

2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina

(Composto C);

1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);

20 N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide

(Composto E);

7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina

(Composto F);

25 ed uno o più eccipienti farmacologicamente adeguati da usare per il trattamento di malattie genetiche che colpiscono il muscolo scheletrico selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

30 I correttori del CFTR oggetto del brevetto e gli eccipiente/i farmacologicamente adeguato/i saranno preparati in forme di dosaggio adatte alla somministrazione al paziente mediante la via di somministrazione desiderata. Per esempio, le forme di dosaggio includono quelle adatte per la somministrazione orale come compresse capsule, pillole, compresse, polveri, sciroppi, elisir, sospensioni, soluzioni,

P127272.IT.01

emulsioni, bustine e cachets o formulazioni adatte per inalazione come aerosol, soluzioni o polveri.

5 Gli eccipienti farmacologicamente adeguati potranno variare a seconda della particolare forma di dosaggio scelta. Inoltre tali eccipienti possono essere scelti in base ad una particolare funzioni che devono svolgere nella composizione farmaceutica. Per esempio, certi eccipienti possono essere scelti per la loro capacità di facilitare la produzione di forme di dosaggio uniformi. Alcuni eccipienti farmaceutici possono essere scelti per la loro capacità di facilitare la produzione di
10 una forma di dosaggio stabile. Alcuni eccipienti farmaceutici possono essere scelti per la loro capacità di facilitare, una volta somministrato al paziente, il trasporto o trasferimento del correttore del CFTR da un organo o porzione del corpo ad un altro organo o porzione del corpo. Certi eccipienti farmaceutici possono essere scelti per la loro capacità di aumentare il gradimento del paziente

15 Gli eccipienti farmacologici più adatti includono i seguenti tipi di eccipienti: diluenti, riempitivi, leganti, disintegranti, lubrificanti, glidanti, agenti granulanti, agenti di rivestimento, agenti umidificanti, solventi, co-solventi, agenti per sospensione, emulsionanti, dolcificanti, aromatizzanti, agenti che mascherano i sapori, coloranti,
20 disgreganti, umettanti, agenti chelanti, plastificanti, viscosizzanti, antiossidanti, conservanti, stabilizzanti, surfattanti e tamponanti. Il professionista esperto sarà in grado di stabilire se determinati eccipienti farmaceutici possono servire a più di una funzione o possono servire a funzioni alternative in relazione a quanto un dato eccipiente è presente nella formulazione e quali altri eccipienti sono presenti nella
25 formulazione.

I professionisti esperti possiedono le conoscenze e competenze del settore che consentono loro di scegliere gli eccipienti farmacologici in quantità appropriate per l'uso dell'invenzione. Inoltre, ci sono numerose risorse disponibili al professionista
30 esperto che descrivono gli eccipienti farmacologici e possono essere utili nel selezionare gli eccipienti farmacologici più adatti all'uso nell'invenzione. Esempi sono le seguenti pubblicazioni: Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack

P127272.IT.01

Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), and The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press)

- 5 Le composizioni farmaceutiche da usare, in accordo con l'invenzione, sono preparate usando tecniche e metodi conosciuti ai professionisti del settore. Alcuni metodi comunemente usati nel settore sono descritti nella pubblicazione Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company).
- 10 Una composizione farmaceutica comprendente un correttore del CFTR può essere preparata, per esempio, mediante miscelatura a temperature ambiente e pressione atmosferica.

Secondo un certo aspetto, la composizione da usare in base all'invenzione è una
15 forma di dosaggio di tipo solido da usare per via orale come una compressa o una capsula contenente una dose sicura ed efficace di correttore del CFTR e un diluente o un riempitivo. Diluenti e riempitivi adatti comprendono lattosio, saccarosio, destrosio, mannitolo, sorbitolo, amido (per esempio amido di mais, amido di patata e amido pre-gelatinato), cellulosa e suoi derivati (per esempio cellulosa
20 microcristallina), solfato di calcio e fosfato bibasico di calcio. La forma di dosaggio orale solida può inoltre comprendere un legante. Leganti adatti includono amido (per esempio amido di mais, amido di patata e amido pre-gelatinato) gelatina, acacia, sodio alginato, acido alginico, gomma adragante, gomma di guar, polivinilpirrolidone, cellulosa e i suoi derivati (per esempio cellulosa
25 microcristallina). La forma di dosaggio orale solida può inoltre comprendere un disintegrante. Disintegranti adatti includono il crosprovidone sodio amido glicolato, croscarmellosa sodica, acido alginico, sodio carbossi-metil cellulosa. La forma di dosaggio orale solida può inoltre comprendere un lubrificante. Lubrificanti adatti possono essere acido stearico, magnesio stearato, calcio stearato e talco.

30 Quando necessario, la dose unitaria per la somministrazione orale può essere microincapsulata. La composizione può anche essere preparata per un rilascio

P127272.IT.01

prolungato o sostenuto come per esempio attraverso il rivestimento o l'inclusione in polimeri, cere o simili.

5 I correttori del CFTR possono inoltre essere associati a polimeri solubili quali carriers di farmaci diretti ad un distretto. Tali polimeri possono includere il polivinilpirrolidone, copolimeri a base di pirano, il poli-idrossipropil-
metacrilammide-fenolo, il poli-idrossietil-aspartamide-fenolo o il poli-etilen-ossido
10 poli-lisina sostituito con residui palmitoilici. Inoltre, il composto di formula (I) o il sale di questo farmaceuticamente accettabile può essere associato a una classe di polimeri biodegradabili utili nell'ottenere il rilascio controllato del farmaco, per
esempio, l'acido polilattico, il poli- ϵ -caprolattone, l'acido poli-idrossibutirrico, i poli-
ortoesteri, i poliacetali, i poli-diidropirani, i policianoacrilati, e un blocco di
copolimeri amfipatici di idrogels coniugati.

15 I correttori del CFTR conformemente all'invenzione possono essere formulati per somministrazione parenterale attraverso compresse, iniezioni o infusione continua. Le formulazioni per iniezione possono essere presentate in forma di dosaggio unitario per esempio in fiala o contenitori multi-dose con aggiunta del conservante. La composizione può prevedere queste forme in sospensione, soluzione o
20 emulsione in mezzo oleoso o acquoso, e può contenere agenti di formulazione quali agenti di sospensione, stabilizzanti e/o di diffusione. In alternativa, l'ingrediente attivo può essere in forma di polvere da ricostituire con un veicolo appropriato, ad esempio acqua sterile apirogena, prima dell'uso.

25 In altra forma, la composizione d'uso, in accordo con l'invenzione, è in forma liquida dosabile oralmente. I liquidi orali come soluzioni, sciroppi ed elisir possono essere preparati in forma di unità di dosaggio così che una data quantità contiene una predeterminata quantità del correttore del CFTR. Gli sciroppi possono essere preparati sciogliendo un composto di formula (I) o un sale di questo
30 farmaceuticamente compatibile in una adatta soluzione acquosa aromatizzata, mentre gli elisir sono preparati mediante l'uso di sostanza veicolante alcolica non tossica. Le sospensioni possono essere formulate mediante dispersione di un

P127272.IT.01

composto di formula (I) o un sale di questo farmaceuticamente compatibile in una sostanza veicolante non tossica. Possono essere aggiunti i solubilizzanti e gli emulsionanti come gli alcoli isostearil etossilati e gli eteri e poliossi etilene sorbitolo, i conservanti, gli additivi aromatici come l'olio di menta o dolcificanti naturali o la saccarina o altri dolcificanti artificiali, e simili. Il composto di formula (I) o i suoi sali farmaceuticamente compatibili possono essere formulati per la somministrazione parenterale mediante somministrazione attraverso compresse iniezioni o infusioni prolungate. Le formulazioni per iniezione possono essere presentate in forma di dosaggio unitario ad esempio in fiale o in contenitori multi-dose, con l'aggiunta di un conservante. Le preparazioni possono prendere la forma di sospensioni, soluzioni o emulsioni in mezzi oleosi o acquosi, e possono contenere agenti di formulazione come agenti di sospensione, stabilizzanti a/o di diffusione. In alternativa, l'ingrediente attivo può essere in forma di polvere da ricostituire prima dell'uso con un veicolante adatto ad esempio acqua sterile apirogena.

15 In altro modo, l'invenzione è indirizzata ad una forma di dosaggio adattata alla somministrazione al paziente per inalazione, per esempio come polvere secca, aerosol, una sospensione o un composto in soluzione. Nella realizzazione, la presente invenzione è diretta ad una forma di dosaggio adattata alla somministrazione al paziente mediante inalazione in forma di polvere secca. In una

20 realizzazione ulteriore l'invenzione è diretta ad una forma di dosaggio adattata alla somministrazione al paziente mediante inalazione attraverso un nebulizzatore.

In alternativa, la polvere secca può essere presentata in capsule (ad esempio gelatina o plastica) cartucce, confezioni blister per l'uso nell'inalatore a polvere secca multi-dose (MDPI). Gli MDPI sono inalatori nei quali il medicamento è contenuto entro (o in alternativa portante) un confezionamento multi-dose contenente dosi multiple definite (o parti di esse) del farmaco. Quando la polvere è presentata in confezione blister, questa consta di blister multipli per il contenimento del farmaco in forma di polvere secca. I blister sono tipicamente conformati in modo semplice per il facile rilascio del farmaco contenuto. Ad

30 esempio, i blister possono essere conformati in forma circolare, o i blister possono essere di forma allungata per esempio consistenti in una striscia o nastro. Ciascuna

P127272.IT.01

capsula, cartuccia o blister possono, per esempio, contenere tra 20µg-10mg del composto con formula (I) o del sale di questo farmaceuticamente accettabile.

5 Secondo l'invenzione, un correttore del CFTR può essere usato in combinazione con uno o più altri agenti terapeutici, nel trattamento delle malattie genetiche che colpiscono il muscolo striato tra il quale le sarcoglicanopatie, la malattia di Brodi (BD) e le forme recessive della Tachicardia ventricolare polimorfica catecolaminergica (CPVT).

10 **DATI BIOLOGICI**

Risultati *in vitro*

I seguenti esempi illustrano l'invenzione senza limitarne lo scopo della stessa

Esempio uno:

15 Cellule HEK293 esprimenti diversi mutanti di α -SG sono state trattate con i Composti A, B, C, D, E F secondo i protocolli messi a punto negli studi riguardanti la CF [Tip and David 2011; Becche et al 2011]. La concentrazione e il recupero nel tempo dei mutanti trattati sono state valutate mediante Western blotting. L'inibitore del proteasoma MG132, alla concentrazione di 10 μ M, o il DMSO in concentrazione dell'1 ‰, sono stati usati come controllo positivo e negativo, 20 rispettivamente.

In figura 1 sono riportati i risultati ottenuti dal trattamento per 24 ore delle cellule che esprimono il mutante R98H dell' α -SG con il Composto C 5 μ M, il Composto B 10 μ M, il Composto E 10 μ M, il Composto F 10 μ M, il Composto A 2 μ M, il Composto D 10 μ M. Al termine del trattamento, le cellule venivano lisate e le proteine totali 25 separate mediante SDS-PAGE. E' stato eseguito un Western blotting utilizzando un anticorpo specifico per α -SG e un anticorpo specifico per la β -actina, usata per normalizzare le proteine caricate (in Fig. 1, pannello superiore, è mostrato un esperimento rappresentativo). L'espressione dell' α -SG nei diversi campioni è stata determinata mediante analisi densitometrica degli esperimenti di Western blotting ed è stata indicata come percentuale della proteina presente nelle cellule che 30 esprimono il mutante R98H trattato con DMSO (controllo negativo). Il grafico nella

P127272.IT.01

parte inferiore della Fig.1 mostra i valori medi (+/- l'errore standard) di tre esperimenti indipendenti. Tutti I composti testati inducono il recupero del mutante fino ad un livello comparabile a quello ottenuto con dell'inibizione del proteasoma (cellule esprimenti il mutante D98H trattate con MG132).

5

Esempio 2:

La localizzazione cellulare del mutante V247M, dopo trattamento con il correttore, è stata verificata mediante immunofluorescenza al microscopio confocale. Nell'esperimento riportato in Fig. 2, cellule HEK 293 che esprimono il mutante V247M sono state trattate per 24 ore con il Composto E (10 μ M) con il Composto D (10 μ M), con MG132 (controllo positivo) con DMSO (controllo negativo). Al termine del trattamento, cellule non permeabilizzate sono state incubate con anticorpi monoclonali specifici per un epitopo extracellulare dell' α -sarcoglicano allo scopo di marcare esclusivamente l' α -sarcoglicano residente in membrana. Per confronto, sono state anche usate cellule esprimenti la forma non mutata (*wild type*) dell' α -sarcoglicano. Le analisi di microscopia a scansione laser mostrano che, in assenza del trattamento farmacologico (DMSO) la forma wild type dell' α -sarcoglicano si localizza correttamente sulla membrana plasmatica, mentre soltanto tracce della proteina mutata sono visibili sulla superficie cellulare. Come precedentemente dimostrato, l'inibizione del proteasoma (MG132), mediante la riduzione della degradazione della proteina mutata, aiuta la localizzazione in membrana del mutante V247M (Gastaldello et al 2008). I trattamenti con i composti E e D promuovono alla stessa maniera la corretta localizzazione della proteina mutata.

10

15

Esempio 3:

Recentemente, è stata descritta nei bovini di razza Chianina una malattia muscolare definita pseudomiopia congenita (PMT). Negli animali affetti, la PMT è dovuta ad una mutazione missenso nel gene *ATP2A1* (R164H) che causa una drastica riduzione della proteina SERCA1 [Sacchetto et al. 2009]. I dati genetici e biochimici hanno indicato che la PMT Chianina è il vero corrispettivo della malattia di Brody umana BD e che potrebbe rappresentare un appropriato modello animale, non-convenzionale, per lo studio della patogenesi della BD. Cellule HEK esprimenti il

25

30

P127272.IT.01

mutante R164H della SERCA1 sono state trattate per 24 ore con il Composto C 5 μ M, Composto B 10 μ M, Composto E 10 μ M, Composto F 10 μ M, Composto A 2 μ M, Composto D 10 μ M, MG132 (inibitore del proteasoma) 10 μ M, usato come controllo positivo, con l'agente veicolante DMSO in concentrazione 1 ‰, usato come controllo
5 negativo. Alla fine del trattamento, le cellule sono state lisate e le proteine totali separate mediante SDS-PAGE. L'analisi mediante Western blotting è stata eseguita usando anticorpi specifici anti SERCA1 e anticorpi specifici anti β -actina per normalizzare le proteine caricate. L'espressione della SERCA1 nei diversi campioni è stata determinata mediante analisi densitometrica e indicata come percentuale del
10 contenuto di SERCA 1 presente nelle cellule che esprimevano la forma wild type, trattate con DMSO.

Le analisi mediante Western blotting (Fig. 3 pannello superiore) e densitometria (Fig. 3 pannello inferiore) mostrano che i Composti testati erano in grado di promuovere il recupero del mutante R164H fino ad un livello paragonabile a quello
15 della forma wild type di SERCA1.

Studi preclinici

L'effetto preclinico dei correttori di CFTR sulle sarcoglicanopatie, secondo l'invenzione, possono essere valutati, per esempio, in uno o più animali modello delle patologie come descritto qui di seguito.

20 Quale animale modello di LGMD2D è disponibili un topo KO di α -SG (Liu and Engvall 1999), per LGMD2E il topo KO di β -SG (Araishi et al. 1999), per LGMD2C il topo KO di γ -SG mice (Hack et al. 2000) e per LGMD2F il topo KO di δ -SG (Hack et al. 2000). Questi animali modello, comunque, non sono adatti per studiare gli effetti preclinici dell'invenzione, poichè essi non esprimono i sarcoglicani. Per questi studi sarebbe
25 necessario avere a disposizione i topi Knock In (KI), esprimenti le forme mutate di ciascun sarcoglicano. Per superare i problemi legati al lungo tempo necessario per la preparazione ed le difficoltà operative connesse alla produzione dei topi transgenici, nonché, molto importante, per ottenere facilmente molti animali esprimenti tante diverse mutazioni dei sarcoglicani quante quelle necessarie allo studio, noi
30 intendiamo trasdurre topi KO per i diversi sarcoglicani con Virus Adeno Associati (AAVs) esprimenti o la forma wild type o le forme mutate di α -SG, β -SG γ -SG e δ -SG.

P127272.IT.01

La procedura per la produzione degli AAV è descritta in [McClure et al 2011; Shin et al 2012], e la produzione dei virus viene affidata ad una ditta specializzata, mentre la trasduzione degli animali viene eseguita come descritto in [Cordier et al 2000; Vitiello et al 2009 Roux-Buisson et al. 2012]

5

Di conseguenza, per esempio:

Gli esperimenti *ex vivo* sono effettuati sui muscoli *gastrocnemious* espianati dagli animali modello di sarcoglicanopatie descritti sopra. Come descritto in Assereto et al. 2005, i muscoli espianati sono rapidamente puliti dal grasso, dal tessuto
10 connettivo e dal sangue; vengono divisi in fascetti di circa 5-10 fibre e incubati con una quantità adatta di un correttore del CFTR secondo l'invenzione o di inibitore del proteasoma bortezomib (Velcade) (Gastaldello et al 2008, Bonucelli et al 2007) usato come controllo positivo o di agenti veicolanti i composti usati come controllo negativo. Dopo il trattamento che va dalle 24 fino a 48 ore, gli espianati vengono
15 rapidamente omogeneizzati e l'espressione dei sarcoglicani viene testata mediante analisi di Western blotting.

Gli esperimenti *in vivo* sono effettuati mediante iniezione localizzata nel muscolo *gastrocnemious* degli animali modello di sarcoglicanopatie di un correttore del CFTR o di Velcade, usato come controllo positivo, mentre il muscolo contro-laterale viene
20 invece iniettato con le sostanze veicolanti i farmaci, usati come controllo negativo. Dopo i trattamenti, gli animali vengono sacrificati ed i muscoli rapidamente congelati per le successive analisi di immunofluorescenza che serviranno per verificare la cito-localizzazione dei sarcoglicani, oppure omogenizzati e analizzati mediante western blotting per verificare l'espressione delle proteine mutate.

25

Gli esperimenti *in vivo* vengono anche effettuati mediante la somministrazione sistemica dei farmaci negli animali modello di sarcoglicanopatie, grazie all'uso di una minipompa ALZET impiantata sottocute, come descritto in [Bonucelli et al. 2007]. In questo caso, animali di identica età e sesso, vengono trattati con i
30 correttori del CFTR, l'inibitore del proteasoma Velcade (controllo positivo) o gli agenti veicolanti i farmaci (controllo negativo). Dopo i trattamenti, gli animali vengono sacrificati, e i muscoli delle zampe vengono rapidamente congelati oppure omogenati: l'espressione dei sarcoglicani viene determinata mediante Western

P127272.IT.01

blotting mentre la loro localizzazione viene verificata mediante analisi di immunofluorescenza. Animali wild type vengono sempre usati per comparazione.

5 Gli effetti preclinici di un correttore del CFTR sulla malattia di Brody, secondo l'invenzione, possono essere studiati, per esempio, sul bovino di razza Chianina affetto da PMT che rappresenta l'animale modello della malattia (stabulata all'Ospedale Veterinario dell'Università di Padova) [Sacchetto et al. 2009].

In questo caso, per esempio:

10 Gli esperimenti *ex vivo*, vengono effettuati su una biopsia fresca isolata dal muscolo *semimembranosus* del bovino affetto da PMT. Come descritto in Assereto et al. 2005, fascetti di circa 5-10 fibre muscolari vengono incubate con dosi scelte di correttori del CFTR, secondo l'invenzione, l'inibitore del proteasoma bortezomib (Velcade) usato come controllo positivo o le sostanze veicolanti i farmaci usati come controllo negativo. Alla fine dei trattamenti, gli espianti vengono rapidamente omogenati e l'espressione delle diverse proteine viene determinata mediante western blotting, 15 mentre il recupero funzionale della proteina SERCA1 viene misurato secondo quanto descritto in (Sacchetto et al 2009).

20 Gli effetti preclinici dei correttori del CFTR sulle forme autosomiche recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT), secondo l'invenzione, possono essere studiati, per esempio, sugli animali modello di CPVT come il topo Knock In CASQ^{R33Q/R33Q} [Rizzi et al. 2008] e i topi triadina -/- trasdotti con AAV esprimenti la forma wild type o mutata della triadina cardiaca [Roux-Buisson et al. 2012].

25 Quindi per esempio:

Gli esperimenti *ex vivo* vengono effettuati su cuori espiantati da animali modello di CPVT, perfusi con dosi opportune di correttori del CFTR, secondo l'invenzione, l'inibitore del proteasoma bortezomib (Velcade) usato come controllo positivo o le sostanze veicolanti i farmaci usati come controllo negativo. Alla fine dei trattamenti,

P127272.IT.01

i cuori vengono rapidamente omogenati e l'espressione di CASQ2, triadina, giuntina e RyR2 viene analizzata mediante western blotting.

5 Gli esperimenti *in vivo* vengono eseguiti mediante la somministrazione sistemica dei farmaci agli animali modello di CPVT grazie ad una minipompa Alzet impiantata sottocute come descritto in [Bonucelli et al. 2007]. In questo caso, animali di
10 identica età e sesso vengono trattati con i correttori del CFTR, l'inibitore del proteasoma Velcade (controllo positivo) o con gli agenti veicolanti i farmaci (controllo negativo). Alla fine dei trattamenti, gli animali sono sacrificati e i cuori rapidamente congelati vengono omogenizzati: l'espressione delle diverse proteine
15 viene analizzata mediante western blotting, mentre la loro localizzazione viene verificata mediante analisi di immunofluorescenza. Animali wild type sono sempre usati per comparazione.

Gli animali wild type di ciascun modello di patologia, come descritto, sono sempre usati per comparazione.

15

Propedeutici alla pianificazione di trials clinici, gli effetti dei correttori di CFTR, secondo l'invenzione, possono essere studiati su colture primarie di mioblasti ottenuti da pazienti affetti da sarcoglicanopatie e BD. Questa possibilità si basa sulle
20 collaborazione che abbiamo sancito con il Prof. G.P. Comi, responsabile di una collezione di biopsie ottenute da pazienti affetti da sarcoglicanopatie, conservate presso il Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università di Milano e con il Dr. G. Vattemi del Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, sezione di Clinica Neurologica dell'Università di Verona. I mioblasti ottenuti dalle biopsie di
25 soggetti sani sono già disponibili nel nostro laboratorio. I mioblasti isolati da soggetti sani e affetti saranno incubati con i correttori del CFTR, l'inibitore del proteasoma Velcade, usato come controllo positivo, o gli agenti veicolanti i farmaci usati come controllo negativo. Il recupero quantitativo, topologico e funzionale dei sarcoglicani e della SERCA1 saranno determinati mediante western blotting, analisi di immunofluorescenza e saggi funzionali.

30

Studi clinici

1. **Trattamenti locali:** i pazienti affetti da sarcoglicanopatie, BD e CPVT dovuta a difetti della triadina, selezionati secondo il fenotipo clinico e il tipo di mutazione missenso di cui sono portatori, saranno monitorati per 30 giorni prima di iniziare il trattamento. Le condizioni del muscolo tibiale anteriore che riceverà il trattamento, saranno stabilite mediante elettromiografia, risonanza magnetica e una biopsia muscolare programmata immediatamente prima di iniziare il trattamento. I pazienti subiranno un'iniezione locale nel muscolo tibiale anteriore con una dose scelta di correttori di CFTR in accordo con l'invenzione. Alla fine del trattamento, sarà effettuata nuovamente una biopsia e i campioni di muscolo saranno usati per determinare il recupero quantitativo e la localizzazione delle proteine sarcoglicano, SERCA1, CASQ2, triadina, giuntina o RyR2.
2. **Trattamenti sistemici:** ai pazienti affetti da sarcoglicanopatie BD e CPVT, selezionati e monitorati come descritto sopra, saranno somministrate dosi opportune di correttori del CFTR, secondo l'invenzione. Il tipo di formulazione della dose e la lunghezza dei trattamenti sarà stabilita in base ai risultati ottenuti con i trattamenti locali e le informazioni presenti nella letteratura riguardanti i trattamenti per la fibrosi cistica. Il miglioramento delle condizioni del paziente saranno valutate mediante analisi cliniche (MRI, EMG, ECG dosaggi enzimatici).

Referenze

- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 1999, 8:1589-98.
- Assereto S, Stringara S, Sotgia F, Bonuccelli G, Broccolini A, Pedemonte M, Traverso M, Biancheri R, Zara F, Bruno C, Lisanti MP, Minetti C. Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005, 1290:C577-82.

P127272.IT.01

Becq F, Mall MA, Sheppard DN, Conese M, Zegarra-Moran O. Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J Cyst Fibros* 2011, 10 Suppl: S129-145. Review.

- 5 Bonuccelli G, Sotgia F, Capozza F, Gazzero E, Minetti C, Lisanti MP. Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. *Cell Cycle*. 2007, 6:1242-8.
- 10 Cordier L, Hack AA, Scott MO, Barton-Davis ER, Gao G, Wilson JM, McNally EM, Sweeney HL. Rescue of skeletal muscles of gamma-sarcoglycan-deficient mice with adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Mol Ther*. 2000, 1:119-29.
- 15 Gastaldello S, D'Angelo S, Franzoso S, Fanin M, Angelini C, Betto R, Sandonà D. Inhibition of proteasome activity promotes the correct localization of disease-causing α -sarcoglycan mutants in HEK-293 cells constitutively expressing β , γ -, and δ -sarcoglycan. *Am J Pathol* 2008, 173:170-81.
- 20 Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadhazy MR, Sweeney HL, McNally EM. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci*. 2000, 113 (Pt 14):2535-44.
- 25 Liu LA, Engvall E. Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1999, 274:38171-6.
- McClure C, Cole KL, Wulff P, Klugmann M, Murray AJ. Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors. *J Vis Exp*. 2011, 57:e3348.
- 30 Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Nori A, Turcato F, Colombi B, Bicciato S, Arcelli D, Spedito A, Scelsi M, Villani L, Esposito G, Boncompagni S, Protasi F, Volpe P, Priori

P127272.IT.01

SG. Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calsequestrin: A complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res* 2008, 103:298–306.

5 Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvain A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I, Durand P, Guicheney P, Kyndt F, Leenhardt A, Le Marec H, Lucet V, Mabo P, Probst V, Monnier N, Ray PF, Santoni E, Trémeaux P, Lacampagne A, Fauré J, Lunardi J, Marty I. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 2012, 21:2759-67.

10

Sacchetto R, Testoni S, Gentile A, Damiani E, Rossi M, Liguori R, Drögemüller C, Mascarello F. A defective SERCA1 protein is responsible for congenital pseudomyotonia in Chianina cattle. *Am J Pathol* 2009, 174:565-73.

15 Shin JH, Yue Y, Duan D. Recombinant adeno-associated viral vector production and purification. *Methods Mol Biol.* 2012, 798:267-84.

Tip WL and David MC. Repair of CFTR Folding Defects with Correctors that Function as Pharmacological Chaperones *Methods Mol Biol* 2011, 741:23-37.

20

Vitiello C, Faraso S, Sorrentino NC, Di Salvo G, Nusco E, Nigro G, Cutillo L, Calabrò R, Auricchio A, Nigro V. Disease rescue and increased lifespan in a model of cardiomyopathy and muscular dystrophy by combined AAV treatments. *PLoS One.* 2009, 4:e5051.

25

RIVENDICAZIONI

1. Un correttore del CFTR per l'uso nel trattamento di malattie genetiche a carico del muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).
2. Uso di un correttore del CFTR nella fabbricazione di un medicinale per il trattamento di malattie genetiche a carico del muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).
3. L'uso in accordo con le Rivendicazioni 1 o 2, dove per malattie genetiche a carico del muscolo striato si intende sarcoglicanopatie.
4. L'uso in accordo con le Rivendicazioni 1 o 2, dove per malattie genetiche a carico del muscolo striato si intende malattia di Brody (BD).
5. L'uso in accordo con le Rivendicazioni 1 o 2, dove per malattie genetiche a carico del muscolo striato si intende Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).
6. L'uso per ciascuna delle Rivendicazioni tra 1 a 5, di un correttore del CFTR scelto tra:
 - N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide (Composto A);
 - 4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina (Composto B);
 - 2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina (Composto C);
 - 1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil))((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);
 - N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide (Composto E);

7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina
(Composto F).

7. Un metodo di trattamento di malattie genetiche a carico del muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT) che consiste nella somministrazione di quantità efficaci del correttore del CFTR a un paziente che necessita di questo.
8. Un metodo di trattamento come rivendicato nella Rivendicazione 7, dove il correttore del CFTR è scelto tra:
 - N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide (Composto A);
 - 4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina (Composto B);
 - 2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonil)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina (Composto C);
 - 1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil)((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);
 - N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide (Composto E);
 - 7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonil)piperazin-1-il)chinolina (Composto F).
9. Un metodo di trattamento come rivendicato nelle Rivendicazioni 7 o 8, dove le malattie genetiche a carico del muscolo striato sono le sarcoglicanopatie.
10. Un metodo di trattamento come rivendicato nelle Rivendicazioni 7 o 8, dove le malattie genetiche a carico del muscolo striato è la malattia di Brody (BD).
11. Un metodo di trattamento come rivendicato nelle Rivendicazioni 7 o 8, dove le malattie genetiche a carico del muscolo striato sono le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).

12. Un composizione farmaceutica che include un correttore del CFTR e uno o più eccipienti farmaceuticamente compatibili per l'uso nel trattamento di malattie genetiche a carico del muscolo striato selezionate tra le sarcoglicanopatie, la malattia di Brody (BD) e le forme recessive della Tachicardia Ventricolare Polimorfica Catecolaminergica (CPVT).
13. Un composizione farmaceutica in accordo con la Rivendicazione 12, dove il correttore del CFTR è scelto tra :
- N-(2-(5-cloro-2-metossifenilamino)-4'-metil-4,5'-bitiazol-2'-il)pivalammide (Composto A);
- 4-Cicloesilossi-2-{1-[4-(4-metossi-benzensulfonyl)-piperazin-1-il]-etil}-chinazolina (Composto B);
- 2-{1-[4-(4-Cloro-benzensulfonyl)-piperazin-1-il]-etil}-4-piperidin-1-il-chinazolina (Composto C);
- 1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-N-(5-((S)-(2-clorofenil))((R)-3-idrossipirrolidin-1-il)metil)tiazol-2-il)cyclopropanocarbossamide (Composto D);
- N-[2-(5-Cloro-2-metossi-fenilamino)-4'-metil-[4,5']bitiazolil-2'-il]-benzammide (Composto E);
- 7-cloro-4-(4-(4-clorofenilsulfonyl)piperazin-1-il)chinolina (Composto F).

P127272.IT.01

CLAIMS

1. A CFTR corrector for use in the treatment of genetic disorders affecting striated muscle selected from sarcoglycanopathies, Brody's disease (BD) and the recessive forms of Cathecolaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT).
5
2. Use of a CFTR corrector in the manufacture of a medicament for the treatment of genetic disorders affecting striated muscle selected from sarcoglycanopathies, Brody's disease (BD) and the recessive forms of Cathecolaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT).
10
3. Use according to Claim 1 or 2, wherein the genetic disorders affecting striated muscle are sarcoglycanopathies.
- 15 4. Use according to Claim 1 or 2, wherein the genetic disorder affecting striated muscle is Brody's disease (BD).
5. Use according to Claim 1 or 2, wherein the genetic disorders affecting striated muscle are recessive forms of Cathecolaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT).
20
6. Use of any one of Claims 1 to 5, wherein the CFTR corrector is selected from:
25
N-(2-(5-chloro-2-methoxyphenylamino)-4'-methyl-4,5'-bithiazol-2'-yl)pivalamide (Compound A);
4-Cyclohexyloxy-2-{1-[4-(4-methoxy-benzensulfonyl)-piperazin-1-yl]-ethyl}-quinazoline (Compound B);
2-{1-[4-(4-Chloro-benzensulfonyl)-piperazin-1-yl]-ethyl}-4-piperidin-1-yl-quinazoline(Compound C);
30 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(5-((S)-(2-chlorophenyl)((R)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl)methyl)thiazol-2-yl)cyclopropanecarboxamide (Compound D);

P127272.IT.01

N-[2-(5-Chloro-2-methoxy-phenylamino)-4'-methyl-[4,5']bithiazolyl-2'-yl]-benzamide (Compound E) and 7-chloro-4-(4-(4-chlorophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline (Compound F).

- 5 7. A method of treating of genetic disorders affecting striated muscle selected from sarcoglycanopathies, Brody's disease (BD) and the recessive forms of Cathecolaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) which comprises administering an effective amount of a CFTR corrector to a patient in need thereof.
- 10
8. A method of treatment as claimed in claim 7, wherein the CFTR corrector is selected from:
- N-(2-(5-chloro-2-methoxyphenylamino)-4'-methyl-4,5'-bithiazol-2'-yl)pivalamide (Compound A);
- 15 4-Cyclohexyloxy-2-{1-[4-(4-methoxy-benzensulfonyl)-piperazin-1-yl]-ethyl}-quinazoline (Compound B);
- 2-{1-[4-(4-Chloro-benzensulfonyl)-piperazin-1-yl]-ethyl}-4-piperidin-1-yl-quinazoline(Compound C);
- 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(5-((S)-(2-chlorophenyl))((R)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl)methyl)thiazol-2-yl)cyclopropanecarboxamide
- 20 (Compound D);
- N-[2-(5-Chloro-2-methoxy-phenylamino)-4'-methyl-[4,5']bithiazolyl-2'-yl]-benzamide (Compound E) and 7-chloro-4-(4-(4-chlorophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline (Compound F).
- 25
9. A method of treatment as claimed in claims 7 or 8, wherein the the genetic disorders affecting striated muscle are sarcoglycanopathies.
10. A method of treatment as claimed in claims 7 or 8, wherein the genetic disorder affecting striated muscle is Brody's disease (BD).
- 30

P127272.IT.01

11. A method of treatment as claimed in claims 7 or 8, wherein the genetic disorders affecting striated muscle are recessive forms of Cathecolaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT).

5 12. A pharmaceutical composition comprising a CFTR corrector and one or more pharmaceutically acceptable excipients for use in the treatment of genetic disorders affecting striated muscle selected from sarcoglycanopathies, Brody's disease (BD) and the recessive forms of Cathecolaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT).

10 13. A pharmaceutical composition according to claim 12 , wherein the CFTR corrector is selected from:

N-(2-(5-chloro-2-methoxyphenylamino)-4'-methyl-4,5'-bithiazol-2'-yl)pivalamide (Compound A);

15 4-Cyclohexyloxy-2-{1-[4-(4-methoxy-benzensulfonyl)-piperazin-1-yl]-ethyl}-quinazoline(Compound B);

2-{1-[4-(4-Chloro-benzensulfonyl)-piperazin-1-yl]-ethyl}-4-piperidin-1-yl-quinazoline(Compound C);

20 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(5-((S)-(2-chlorophenyl)((R)-3-hydroxypyrrolidin-1-yl)methyl)thiazol-2-yl)cyclopropanecarboxamide (Compound D);

N-[2-(5-Chloro-2-methoxy-phenylamino)-4'-methyl-[4,5']bithiazolyl-2'-yl]-benzamide (Compound E);

25 7-chloro-4-(4-(4-chlorophenylsulfonyl)piperazin-1-yl)quinoline (Compound F).

Figura 1

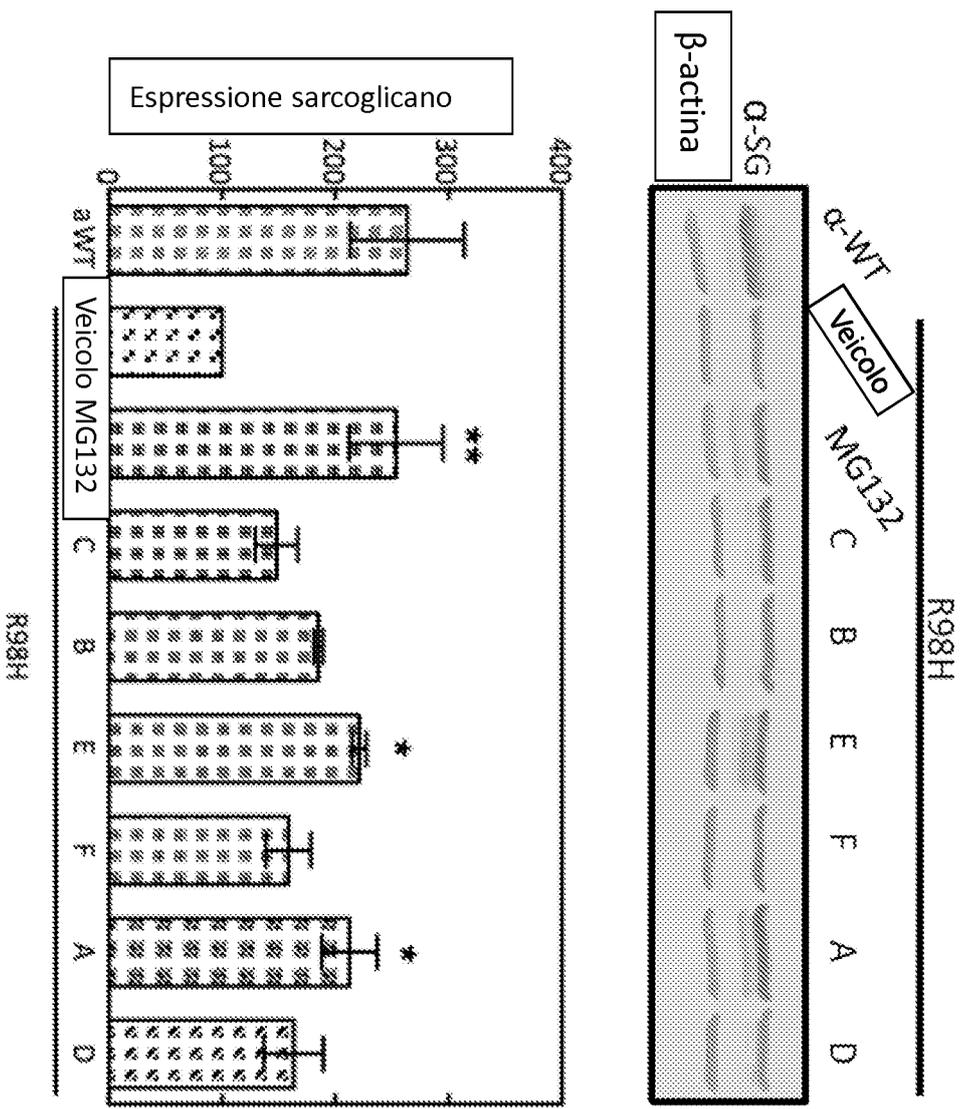


Figura 2

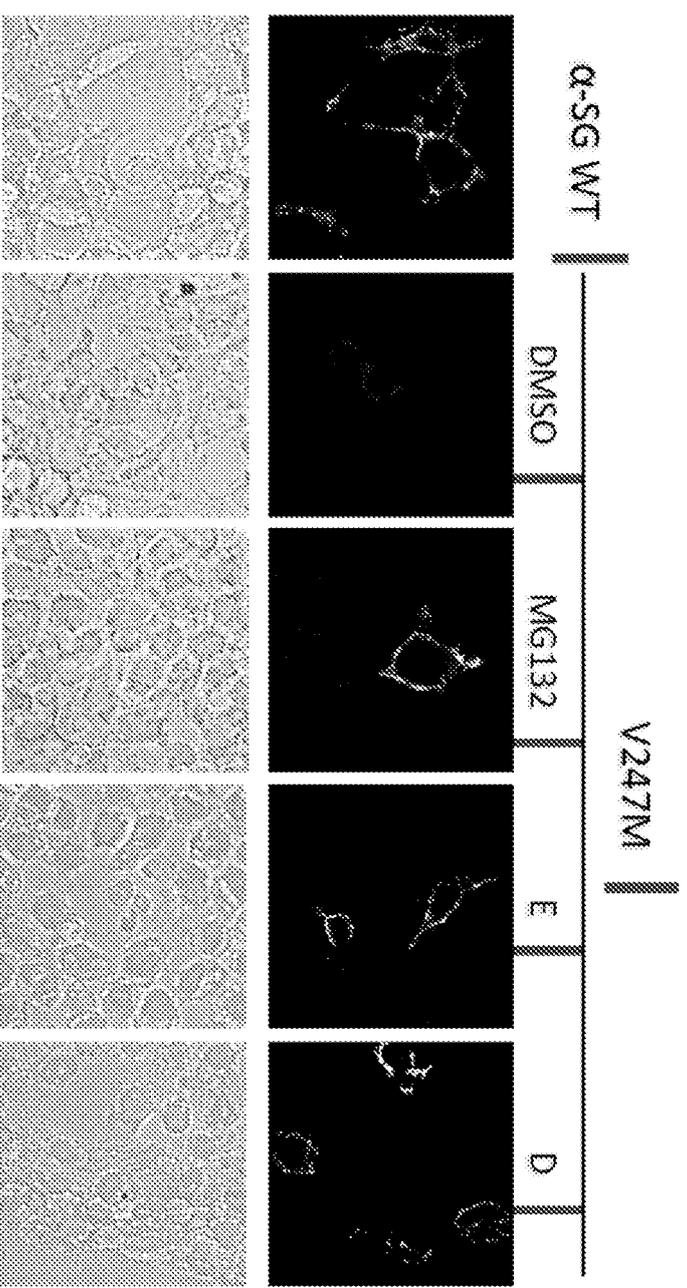


Figura 3

