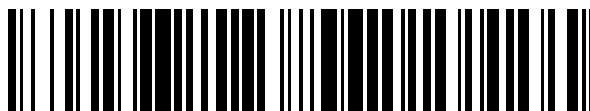


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 829**

51 Int. Cl.:

A61K 31/55

(2006.01)

A61P 11/12

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05809765 .0**

96 Fecha de presentación: **14.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1799225**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Uso de derivados de paulonas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis y de enfermedades ligadas a un defecto de direccionamiento de las proteínas en las células**

30 Prioridad:
15.10.2004 FR 0410961

45 Fecha de publicación de la mención BOPÍ:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, RUE MICHEL-ANGE
75794 PARIS CEDEX 16, FR y
UNIVERSITE DE POITIERS**

72 Inventor/es:
**BECQ, Frédéric;
MEIJER, Laurent y
KUNICK, Conrad**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

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

ES 2 378 829 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de paulonas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis y de enfermedades ligadas a un defecto de direccionamiento de las proteínas en las células

5 **[0001]** La invención se refiere al uso de kenpaulona y de derivados de la kenpaulona para fabricar unos medicamentos capaces de restaurar el direccionamiento de proteínas del retículo endoplasmático hacia las membranas plasmáticas. Se refiere en particular al tratamiento de la mucoviscidosis.

10 **[0002]** La mucoviscidosis (CF: *Cystic Fibrosis*) es la enfermedad genética recesiva, autosómica, letal más extendida entre la población europea y norteamericana. El gen CF (locus 7q31) codifica para la proteína transmembranaria denominada CFTR (por *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Unas mutaciones del gen CF provocan un transporte anormal de agua y de electrolitos a través de las membranas celulares de diferentes órganos como los pulmones, las glándulas sudoríparas, el intestino y el páncreas exocrino. Aunque existen más de 1.000 mutaciones de la proteína CFTR, la mutación más frecuente (el 70 % de los pacientes) es la delección de una fenilalanina en el dominio NBF1 en la posición 508 (delta F508). La principal causa de mortalidad de los pacientes de CF está ligada a esta delección y conduce a infecciones o a una insuficiencia pulmonar, provocadas por un aumento de la viscosidad del moco. Esta viscosidad causa la oclusión de las vías respiratorias y favorece las infecciones bacterianas oportunistas. Además, se ha constatado un empeoramiento a nivel digestivo y, en particular, pancreático (paciente con insuficiencia pancreática). La proteína CFTR es una glicoproteína de 1.480 ácidos aminados, que pertenecen a la superfamilia de los transportadores membranarios ABC. La CFTR es un canal de cloro localizado dentro de la membrana plasmática apical de las células epiteliales pulmonares en los individuos sanos.

25 **[0003]** La CFTR es responsable del transporte transepitelial de agua y de electrolitos, y permite en un individuo sano la hidratación de las vías aéreas pulmonares.

30 **[0004]** En los pacientes de CF, homocigotas para la mutación delta F508, y de manera más general para los mutantes de clase II (mutaciones que producen una proteína ausente de la membrana plasmática), esta proteína está ausente de las membranas plasmáticas debido a un mal direccionamiento de la proteína que queda retenida en el retículo endoplasmático (RE). La hidratación de las vías aéreas, de los pulmones ya no es funcional en este caso. La delección delta F508 perturba el plegamiento del dominio NBF1 e impide la maduración completa de la proteína que, por lo tanto, se degrada muy pronto durante su biosíntesis. Sin embargo, si la proteína delta F508 alcanza la membrana, esta funciona como un canal de cloro.

35 **[0005]** Una de las claves del tratamiento de esta enfermedad consiste, por lo tanto, en un re-direccionamiento de delta F508 hacia la membrana plasmática de las células al nivel de la cual se puede estimular la actividad de transporte de delta F508 mediante unos agonistas fisiológicos.

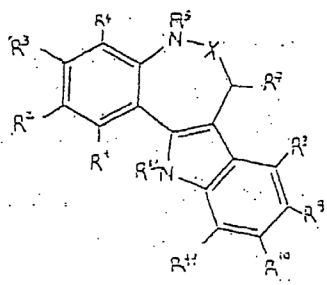
40 **[0006]** De manera sorprendente, los inventores han demostrado que los derivados de paulonas conocidos en particular por su efecto anti-proliferante eran capaces de activar la CFTR salvaje y unas formas mutadas y de provocar una relocalización membranaria de la proteína delta F508-CFTR restaurando de este modo su capacidad de transporte transmembranario. De manera general, estos derivados son capaces de restaurar un fallo de direccionamiento de las proteínas dentro de las células. Además, estos compuestos presentan la ventaja de una gran inocuidad.

50 **[0007]** El documento WO 0024391 describe un método de tratamiento de enfermedades, entre las que se encuentra la Fibrosis Quística o mucoviscidosis, que consiste en administrar un agente que permite la liberación de proteínas del retículo endoplasmático. Este describe como agente unas moléculas de estructuras muy diversas, como la tapsigargina, el ácido clopiazónico, el DBHQ (diterc-butil-hidroquinona), el halotano o unos oligonucleótidos antisentido de UGGT, calnexina o Ca^{2+} -ATPasa así como los derivados de estos.

55 **[0008]** D1 describe que los derivados de paulona inhiben la enzima GSK-3 β y se pueden utilizar para el tratamiento de la diabetes. Ahora bien, la inhibición de la enzima GSK-3 β no tienen ninguna relación con el tratamiento de la mucoviscidosis. La glicógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) es una proteína quinasa importante implicada en la regulación del metabolismo de la glucosa dentro de las células. De este modo, esta enzima, aunque es un blanco terapéutico importante para las enfermedades citadas, no está asociada a la fisiopatología de la mucoviscidosis ni a los mecanismos de regulación de las funciones respiratorias en el hombre.

60 **[0009]** La invención tiene, por lo tanto, como objetivo proporcionar un nuevo uso de los derivados de paulonas para fabricar medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis y de enfermedades ligadas a un fallo en el direccionamiento de las proteínas dentro de las células.

65 **[0010]** Estos derivados responden en particular a la fórmula general (II):



en la que

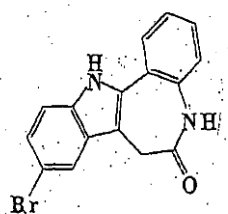
- X representa un grupo C = O, C-S-CH₃, C-S-, -C-NHOH;
- R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo en C₁ a C₅;
- R¹² representa un átomo de hidrógeno, o un grupo -C-CO₂-(CH₃)₃;
- R¹ a R⁴, R⁷ a R¹¹ idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, de halógeno (F, Cl, Br, I), un grupo hidroxilo, alquilenohidroxilo, alcinoalquilenohidroxilo, alquilo, alcoxi, alquilenalcoxi, alquilenociano, estos radicales siendo de cadena recta o ramificada, en C₁ a C₁₈, el grupo alquilo siendo saturado o insaturado; dicha cadena sustituyéndose, en caso de que fuera necesario, por uno o varios grupos hidroxilo o amino; un grupo trifluorometilo; un grupo -COM; -COOM; o -CH₂COOM (con M representando un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo en C₁ a C₁₈, de cadena recta o ramificada, sustituida, en caso de que fuera necesario, por uno o varios grupos hidroxilo y/o amino); un grupo nitroso; o un grupo ciano;

y las sales fisiológicamente aceptables de estos derivados.

[0011] En un grupo de derivados de paulonas de estas diferentes familias, X representa C = O.

[0012] La invención se refiere de manera más especial a un nuevo uso de la kenpaulona para fabricar medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis.

[0013] La kenpaulona utilizada de acuerdo con la invención responde a la fórmula (V):



[0014] Tal y como se ilustra en los ejemplos, la kenpaulona es, en particular, eficaz para provocar la re-localización membranaria de la proteína delta F508-CFTR en la mucoviscidosis donde esta proteína queda retenida dentro del retículo endoplasmático, y restaurar de este modo su capacidad de transporte trans-membranario.

[0015] Durante la elaboración de los medicamentos, los principios activos, utilizados en cantidades terapéuticamente eficaces se mezclan con los vehículos farmacéuticamente aceptables para el modo de administración seleccionado.

[0016] De este modo, para una administración por vía oral, los medicamentos se preparan en forma de cápsulas duras, comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, gotas, jarabes y análogos. Estos medicamentos pueden contener de 1 a 100 mg de principio activo por unidad.

[0017] Para la administración por vía inyectable (intravenosa, subcutánea, intramuscular), los medicamentos se presentan en forma de soluciones estériles o esterilizables.

[0018] También pueden estar en forma de suspensiones o de emulsiones.

[0019] Los medicamentos de la invención se administran de manera más particular en forma de aerosoles.

[0020] Las dosis por unidad de toma pueden variar de 1 a 50 mg de principio activo. La posología diaria se selecciona de tal modo que se obtenga una concentración final de como máximo 100 µM de derivados de paulonas en la sangre del paciente tratado.

[0021] Se mostrarán otras características y ventajas de la invención en los resultados que se exponen a continuación con la finalidad de ilustrar la invención:

[0022] En estos ejemplos, se hace referencia a las figuras 1 a 5 que representan, respectivamente:

- la figura 1: un diagrama de barras que muestra el porcentaje de activación de la CFTR después del tratamiento de células CF15 en diferentes condiciones;
- la figura 2A: el porcentaje de activación de la CFTR en función de la distribución logarítmica entre [kenpaulona] M y la figura 2B: el efecto de inhibidores habituales de CFTR sobre la actividad delta F508 después del tratamiento con la kenpaulona;
- la figura 3A: una foto que muestra la localización de delta F508 en los compartimentos intra-celulares y la figura 3B: una foto que muestra la re-dirección de la proteína hacia la membrana, después del tratamiento con la kenpaulona;
- las figuras 4A a 4C: la inmunolocalización de delta F508-CFTR, después de 2 h de tratamiento o en ausencia de tratamiento;
- las figuras 5A y 5B: la activación de delta F508-CFTR en unas células CF15 después del tratamiento con la kenpaulona.

Material y métodos

M1. Cultivo celular

[0023] Células CHO-WT: Las células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) son unos fibroblastos que se han transfectado con el gen de la CFTR salvaje (CFTR-WT). Estas células van, por lo tanto, a sobreexpresar la proteína CFTR.

[0024] Medio de cultivo: Medio MEM alfa (GIBCO) + 7 % de suero de ternero fetal + 0,5 % de penicilina/estreptomycin + 100 µM de metotrexato (ametopterina, Sigma).

[0025] Células CF15: Las células CF15 son unas células epiteliales humanas de origen nasal que expresan el gen ΔF508-CFTR.

[0026] Medio de cultivo: Medio DMEM + HAM F12 + 10 % de FCS + 0,6 % de penicilina/estreptomycin + factor de crecimiento (insulina 5 µg/ml, transferrina 5 µg/ml, epinefrina 5,5 µM, adenina 0,18 mM, EGF 10 ng/ml, T3 2 nM, hidrocortisona 1,1 µM).

[0027] Células Calu-3: Las células Calu-3 son unas células epiteliales humanas de origen pulmonar que expresan el gen de la CFTR salvaje.

[0028] Medio de cultivo: Medio DMEM/F12 con glutamax + 7 % de suero de ternero fetal + 1 % de penicilina/estreptomycin.

M2. Inmunomarcaje

[0029] El inmunomarcaje permite visualizar la localización celular de la proteína CFTR por medio de un anticuerpo (Ac) primario anti-CFR, a continuación un anticuerpo secundario al anticuerpo primario marcado con fluoróforo Cy3.

[0030] Las células se siembran previamente sobre unas laminillas en un medio de cultivo adecuado. Se realizan 3 lavados con TBS (NaCl: 157 mM, Tris base: 20 µM, pH 7,4) de 5 min cada uno. Las células se fijan entonces, mediante adición de TBS-paraformaldehído (3 %) durante 20 min. Después de 3 lavados con TBS (5 min), las células se incuban con TBS-Triton 0,1 % (10 min) que permite la formación de agujeros en la membrana celular, a continuación se realizan de nuevo 3 lavados con TBS antes de que se junten las células con el TBS-BSA 0,5 %-saponina 0,05 % durante 1 h. A continuación las células se incuban con el anticuerpo primario anti-C terminal CFTR (2 µg/ml) durante 1 h. Se realizan 3 lavados con TBS-BSA-saponina de 5 min cada uno antes de la incubación con el anticuerpo secundario GAM-cy3 (1/400) durante 1 h. Después de 2 lavados con TBS de 5 min, los núcleos se marcan mediante incubación con Topro3 (1/1.000) durante 5 min. Por último, las laminillas se pueden montar sobre una lámina después de 3 últimos lavados con TBS de 5 min. Las láminas se observan en el microscopio confocal

(Bio-Rad) por medio de una excitación con láser en las longitudes de onda apropiadas. Con el fin de diferenciar el marcaje entre Cy3 y Topro3 el color de la fluorescencia de Topro3 se ha cambiado al azul (color de los núcleos).

M3. Flujo de salida de radiotrazadores

[0031] Las mediciones de transporte de iones cloruro dentro de las células se han realizado por medio de la técnica de los flujos de salida de yoduro radioactivo (Becq y otros, 1999; Dormer y otros, 2001). El trazador (^{125}I) se incorpora al medio intracelular. A continuación, se mide la cantidad de radiotrazador que sale de la célula después de la adición de diferentes agentes farmacológicos. El yoduro se utiliza como un trazador del transporte de iones cloruro. ^{125}I presenta, además, la ventaja de tener una vida útil corta comparada con la de otros marcadores como ^{35}Cl (1/2 vida respectivamente 30 días y 300.000 años).

[0032] Las células se ponen en cultivo sobre unas placas de 24 pocillos en un medio adecuado. Se realizan 2 aclarados con el medio de flujo de salida (NaCl: 136,6 mM, KCl: 5,4 mM, KH_2PO_4 : 0,3 mM, NaH_2PO_4 : 0,3 mM, NaHCO_3 : 4,2 mM, CaCl_2 : 1,3 mM, MgCl_2 : 0,5 mM, MgSO_4 : 0,4 mM, HERPES: 10 mM, D-glucosa: 5,6 mM) con el fin de eliminar las células muertas que siguen liberando la radioactividad de forma anárquica. A continuación, se ponen a las células a incubar con 500 μl de carga (1 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{125}I Na) durante 30 min en el caso de las CHO-WT o 1 h en el caso de las CF15 y Calu-3. El yoduro se equilibra a ambos lados de la membrana celular. El robot (MultiPROBE, Packard) realiza las etapas siguientes: el medio de carga se lava con el medio de flujo de salida para eliminar la radioactividad extracelular. El sobrenadante se recoge cada minuto en unos tubos de hemodiálisis y el medio se sustituye por un volumen equivalente (500 μl). Las extracciones de los 3 primeros minutos no experimentan la adición de droga, estas permiten obtener una línea de base estable, que determina la salida pasiva de los iones I^- . Las 7 extracciones siguientes se obtienen en presencia de la molécula que hay que probar. Al término del experimento, las células se lisan mediante la adición de 500 μl de NaOH (0,1 N / 0,1 % SDS (30 min), de este modo, se puede determinar la radioactividad que queda en el interior de la célula. La radioactividad presente en los tubos de hemodiálisis se mide en cuentas por minuto (cpm) por medio de un contador gamma (Cobra II, Packard). Los resultados en cpm se expresan en forma de velocidad de salida de yoduro radioactivo (R) según la siguiente fórmula: $R \text{ (min}^{-1}) = [\ln(^{125}\text{I } t_1) - \ln(^{125}\text{I } t_2)] / (t_1 - t_2)$, siendo $^{125}\text{I } t_1$: cpm en el tiempo t_1 ; $^{125}\text{I } t_2$: cpm en el tiempo t_2 . Este flujo de yoduro se representa en forma de curva. Con el fin de cuantificar la salida de yoduro causada por la administración de la molécula probada, se calcula el flujo relativo siguiente que permite liberarse del flujo de base: Velocidad relativa (min^{-1}) = $R_{\text{pico}} - R_{\text{basal}}$. Por último, estos resultados se generalizan para poder comparar el efecto de las diferentes drogas entre sí. Los resultados se presentan en forma de media $\pm$ SEM. La prueba estadística de Student se utiliza para comparar el efecto de las drogas en los controles (los valores correspondientes a $P < 0,01$ se consideran como estadísticamente significativos).

M4. Prueba de citotoxicidad

[0033] La prueba de citotoxicidad con MTT es una prueba colorimétrica que reside en la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales para metabolizar el MTT (sal de tetrazolio amarillo) en formazán (púrpura). La absorbancia, proporcional a la concentración de colorante convertido, se puede medir entonces mediante espectrofotometría. Las células se ponen a incubar sobre unas placas de 96 pocillos en presencia del agente que hay que probar durante 2 h. Se realizan 3 controles: 100 % de células vivas: células sin agente; 0 % de células vivas: células dejadas al aire libre; blanco: medio sin célula. Las células se aclaran con el medio RPMI sin rojo de fenol para que el color del medio no interfiera en las mediciones de la absorbancia. A continuación, estas se incuban durante 4 h con 100 μl de solución de RPMI suplementada con MTT (0,5 mg/ml). Se elimina entonces el medio, la adición de 100 μl de DMSO permite solubilizar el colorante convertido (formazán). La absorbancia se mide mediante espectrofotometría a 570 nm (púrpura); 630 nm (ruido de fondo). Con la finalidad de liberarse del ruido de fondo, se realiza el siguiente cálculo: $\text{DO}_{\text{real}} = \text{DO}_{570\text{nm}} - \text{DO}_{630\text{nm}}$. A continuación, se generalizan los resultados con respecto a los controles (100 % y 0 % de células vivas) y se presentan en forma de media $\pm$ SEM.

Resultados

R1. Efecto de la kenpaulona sobre el direccionamiento de delta F508 en las células CF15

[0034] El estudio del direccionamiento de la proteína delta F508-CFTR se realiza en el laboratorio combinando enfoques de farmacología, de tratamiento de imágenes celulares, de pruebas bioquímicas y electrofisiológicas sobre unas células CF15 epiteliales humanas pulmonares homocigotas para la delección delta F508.

[0035] En cada experimento, la adición de un cóctel (Forskolina 10 μM + Genisteína 30 μM) permite la activación de la CFTR cuando esta se localiza en la membrana. De este modo, se podrá observar un flujo de salida de yoduro si el direccionamiento de delta F508 se ha restaurado. Los resultados, que se presentan en forma de diagrama de barras, se han generalizado con respecto a un tratamiento de referencia (tratamiento de las células con MPB-91 250 μM durante 2 h) para el cual se considera que se tiene un 100 % de actividad CFTR. La figura 1 muestra que un tratamiento de 2 h con 100 μM de kenpaulona restaura la actividad delta F508-CFTR a un nivel superior del que se obtiene con el MPB-91. Por el contrario, la alsterpaulona (100 μM) en las mismas condiciones experimentales que la kenpaulona no tiene ningún efecto (figura 1). Estos resultados muestran que el tratamiento con la kenpaulona, pero

no con la alsterpaulona, de las células CF15 durante 2 h a 37 °C restaura el direccionamiento de la proteína delta F508 y permite que esta funcione en calidad de transportador iónico (figura 1).

[0036] En ausencia de tratamiento de las células, la proteína delta F508 no es membranaria y no hay flujo de salida de yoduro estimulado por el cóctel (Forskolina 10 µM, Genisteína 30 µM). La EC₅₀ (concentración de la molécula que da el 50 % de la eficacia máxima) de la kenpaulona se ha determinado en 22 ± 1,7 µM (figura 2A, n = 4, para cada condición). Para precisar el efecto observado, se han probado unos inhibidores habituales de CFTR sobre la actividad de delta F508 después del tratamiento con la kenpaulona. Los resultados que se presentan en la figura 2B muestran que este transporte se bloquea con la glibenclamida y el DPC, pero es insensible al DIDS y al calixareno. Este perfil farmacológico corresponde al de la CFTR.

[0037] En los pacientes de CF, la proteína delta F508 está ausente de las membranas plasmáticas debido a un mal direccionamiento de la proteínas que queda retenida dentro del retículo endoplasmático (RE). Mediante el tratamiento de imágenes celulares en las células CF15, se localiza efectivamente delta F508 en unos compartimentos intracelulares (figura 3A). Por el contrario, el tratamiento con 100 µM de kenpaulona permite redirigir la proteína delta F508 hacia la membrana tal y como se representa en la figura 3B.

[0038] Las figuras 4A a 4C también ilustran la inmunolocalización de delta F508-CFTR después de 2 h de tratamiento con la kenpaulona o en ausencia de tratamiento. Se trata de una visualización confocal de CFTR-delta F508 dentro de las células CF15 con un anticuerpo monoclonal anti-CFTR de ratón. Las células CF15 tratadas 24 h a 27 °C se han utilizado como control positivo.

[0039] Las figuras 5A y 5B representan la activación de delta F508-CFTR dentro de las células CF-15 después del tratamiento con la kenpaulona y a título comparativo con la alsterpaulona.

[0040] Los flujos de salida de yoduro se han observado después de 2 h de incubación con 100 µM de estos compuestos o en ausencia de tratamiento.

[0041] Las células CF15 que han experimentado un tratamiento de 24 h a 27 °C se han utilizado como control positivo y las células CF15 como control negativo (37 °C).

[0042] La siguiente tabla ofrece un resumen de experimentos de competición realizados mediante la técnica de flujo de salida de yoduro entre la kenpaulona y la maquinaria de la chaperona del RE.

	BFA 20µM	Tunicamicina 10µM	Suinsonina 100µM	Castanospermina 100µg/l	Tapsigargina 10µM	MG132 20µM	Geldanamicina 2,5µg/ml
Potencialización del efecto de la kenpaulona		**	**	*	*	ne	ne
		Inhibidores de glicosilación		Inhibidores de calnexina		vía de degradación de los inhibidores	

- inhibición, ** P < 0,01, * P < 0,1, ne P > 0,1 (prueba t de Student)

[0043] Se observa una inhibición de la kenpaulona con la Brefeldina A (BFA), inhibidor del tráfico vesicular ERGIC, lo que demuestra que la kenpaulona induce un redireccionamiento de la proteína delta F508-CFTR. No se observa ninguna modulación del efecto de la kenpaulona en presencia de MG132, un inhibidor del proteasoma, lo que demuestra una competición entre la kenpaulona y MG132.

R2. Efecto de la kenpaulona sobre la actividad de CFTR en las células Calu-3

[0044] Con la finalidad de demostrar que el efecto de la kenpaulona es específico del direccionamiento de delta F508 y no altera los demás canales de cloro, se prueba la kenpaulona en calidad de activador potencial sobre unas células Calu-3. Estos resultados se han obtenido en flujo de salida de yoduro sobre células Calu-3. Nuestros

controles son la forskolina (5 μ M, n = 8) y el MPB-91 (250 μ M, n = 8), la kenpaulona (n = 8) no es un activador de la CFTR salvaje ni de otros transportes aniónicos de estas células (no hay una diferencia significativa).

R3. Efecto de la kenpaulona sobre el direccionamiento de CFTR en las células Calu-3

[0045] Con la finalidad de demostrar que el efecto de la kenpaulona es específico del direccionamiento de delta F508, se ha probado la kenpaulona en calidad de modulador del direccionamiento de la CFTR salvaje sobre unas células Calu-3. Estos resultados se han obtenido en flujo de salida de yoduro sobre células Calu-3 tratadas 2 h con la kenpaulona (100 μ M). La actividad CFTR en esta condición experimental no resulta significativamente diferente con respecto a los controles. Estos resultados demuestran que la kenpaulona no afecta a la vía de direccionamiento de la CFTR salvaje o de otros canales de cloro, ni altera la actividad de CFTR en las células epiteliales humanas pulmonares no-CF.

R4. Citotoxicidad de la kenpaulona

[0046] Con la finalidad de probar la citotoxicidad de la kenpaulona, se han incubado unas células CHO-WT durante 2 h con diferentes concentraciones de inhibidores antes de realizar la prueba de viabilidad celular con MTT. Los resultados muestran que las células son viables para todas las concentraciones de la kenpaulona. Esta molécula no presenta, por lo tanto, citotoxicidad celular.

CONCLUSIONES

[0047] Las pruebas de flujo de salida han mostrado que la kenpaulona permite una relocalización membranaria de la proteína delta F508-CFTR que restaura de este modo su capacidad de transporte trans-membranario, inhibe la vía de degradación y parece que modula la interacción entre CFTR y la calnexina (mecanismo calcio-dependiente). Un tratamiento con kenpaulona de células CF parece interferir de este modo con la capacidad que tiene la maquinaria de control para interactuar y para retener la proteína delta F508-CFTR dentro del retículo endoplasmático por medio de una inhibición de la calnexina y de unas moléculas chaperonas que intervienen en la vía de degradación.

[0048] Esta molécula no es tóxica en las pruebas utilizadas. Además, los estudios de toxicidad de la kenpaulona, realizadas en animales, han demostrado una muy baja toxicidad. Se puede alcanzar una elevada concentración plasmática mediante acoplamiento con PEG. La kenpaulona se considera muy selectiva de la inhibición de GSK-3.

Ejemplo de formulación

[0049] Se prepara una solución para inhalación con una ampolla nebulizadora a partir de cloruro de sodio, de cloruro de calcio deshidratado y de agua para preparaciones inyectables.

[0050] La kenpaulona se añade como ingrediente activo.

[0051] La solución se formula en unas ampollas de 2,5 ml.

[0052] Se preparan de este modo unas ampollas que contienen 5 mg, 10 mg o 20 mg de kenpaulona.

BIBLIOGRAFÍA

[0053]

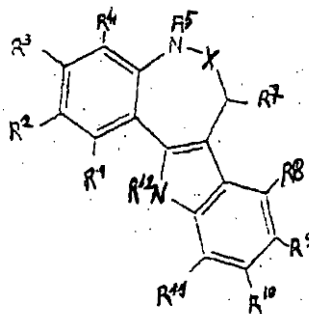
BECQ y otros (1999), Journal of Biological Chemistry, 274, págs. 27.415-27.425.

DORMER y otros (2001), Journal of Cell Science, 114, págs. 4.073-4.081.

REIVINDICACIONES

1. Uso de derivados de paulonas para fabricar medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis, estos derivados respondiendo a la fórmula general (II):

- X representa un grupo C = O, C-S-CH₃, C-S-, -C-NHOH;
- R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo en C₁ a C₅;
- R¹² representa un átomo de hidrógeno, o un grupo -C-CO₂-(CH₃)₃;

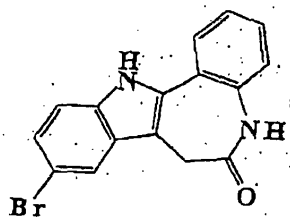


- R¹ a R⁴, R⁷ a R¹¹ idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, de halógeno (F, Cl, Br, I), un grupo hidroxilo, alquilenohidroxilo, alcinoalquilenohidroxilo, alcinohidroxociclohexilo, alquilo, alcoxi, alquilenalcoxi, alquilenociano, estos radicales siendo de cadena recta o ramificada, en C₁ a C₁₈, el grupo alquilenos siendo saturado o insaturado; dicha cadena sustituyéndose, en caso de que fuera necesario, por uno o varios grupos hidroxilo o amino; un grupo trifluorometilo; un grupo -COM; -COOM; o -CH₂COOM (con M representando un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo en C₁ a C₁₈, de cadena recta o ramificada, sustituida, en caso de que fuera necesario, por uno o varios grupos hidroxilo y/o amino); un grupo nitroso; o un grupo ciano;

y las sales fisiológicamente aceptables de estos derivados.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza por que** X representa C = O.

3. Uso para fabricar medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis de la kenpaulona que responde a la fórmula (V):



4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **que se caracteriza por que** los medicamentos están preparados para una administración en forma de cápsulas duras, comprimidos, grageas o cápsulas.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **que se caracteriza por que** los medicamentos están preparados para una administración por vía inyectable, en forma de solución.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **que se caracteriza por que** los medicamentos están preparados para una administración en forma de aerosol.

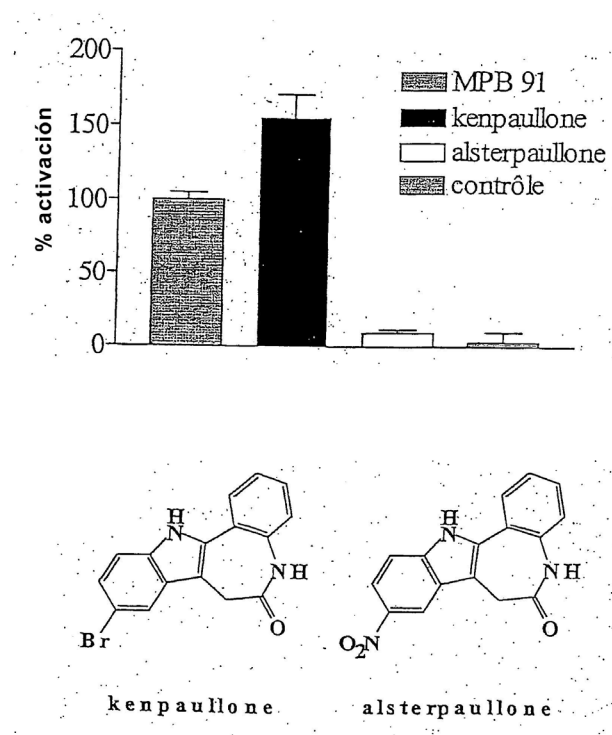


FIG. 1

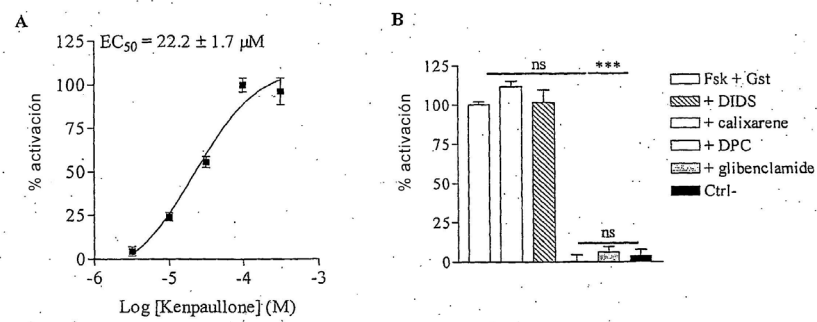


FIG. 2

A. Cos7/GFP/CFTR-DF508

**B. Cos7/GFP/CFTR-DF508
+ kenpaullone 100 μ M 2h**

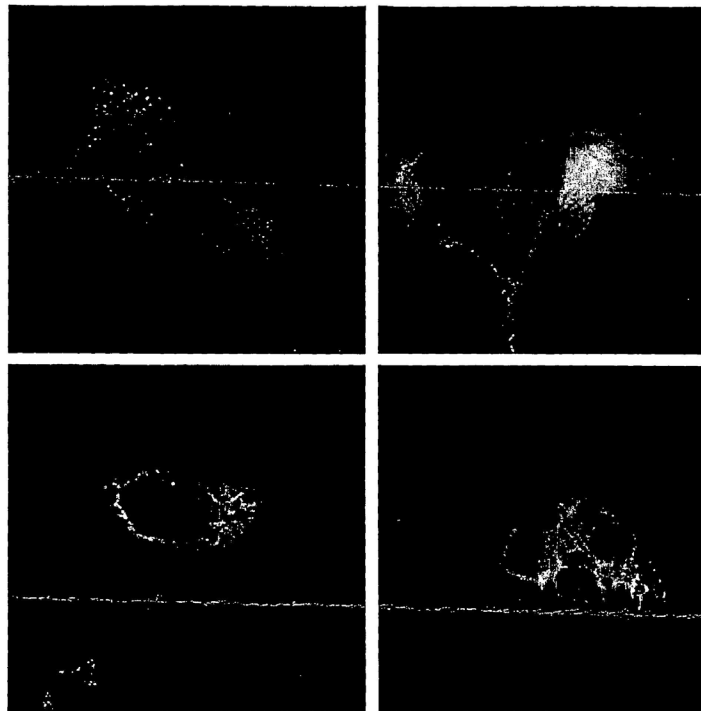


FIG. 3

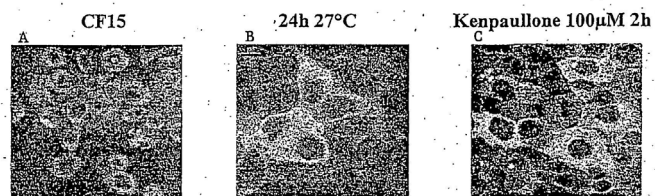


FIG. 4

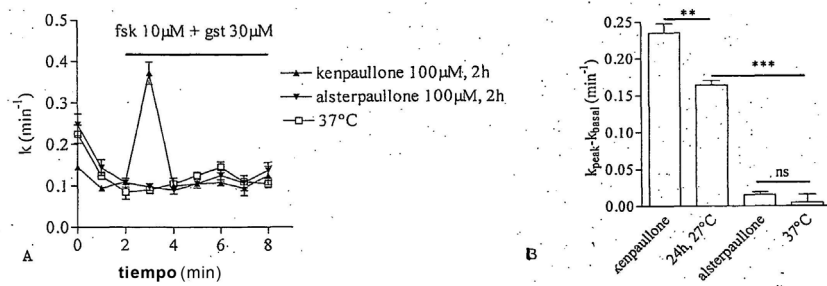


FIG. 5