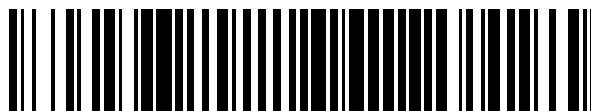


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 907**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2007 E 07852872 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2076268**

54 Título: **Roscovitina para el tratamiento de ciertas enfermedades quísticas**

30 Prioridad:

19.10.2006 US 852760 P

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

10.05.2013

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
153 SECOND AVENUE
WALTHAM, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**BUKANOV, NIKOLAY O. y
BESKROVNAYA, OXANA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 907 T3

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

DESCRIPCIÓN

Roscovitina para el tratamiento de ciertas enfermedades quísticas.

Se proporciona en este documento la 6-bencilamino-2-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina para uso en métodos para el tratamiento de uno o más síntomas de ciertas enfermedades quísticas.

- 5 Los quistes renales aparecen en un tercio de la población de más de 50 años de edad. Si bien la mayoría son quistes simples, la enfermedad quística renal tiene numerosas etiologías. Las categorías principales de la enfermedad quística incluyen las siguientes:

Congénitas - Displasia quística congénita;

- 10 Genéticas - Poliquistosis renal autosómica recesiva (ARPKD, por sus siglas en inglés), Poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD, por sus siglas en inglés), complejo de nefronoftisis-enfermedad quística medular (NMCD, por sus siglas en inglés);

Adquiridas - Quistes simples, enfermedad quística adquirida;

Quistes asociados con enfermedades sistémicas - Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHLS, por sus siglas en inglés), esclerosis tuberosa (TS, por sus siglas en inglés) y

- 15 Malignas - Carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés).

Los quistes de mayor tamaño más frecuentes son los quistes adquiridos, los quistes simples y los quistes con ADPKD. Los quistes de menor tamaño están asociados con ARPKD, NMCD, y riñón medular en esponja (MSK por sus siglas en inglés). En adultos, los angiomiolipomas renales y el RCC también pueden demostrar lesiones quísticas.

- 20 Poliquistosis renal (PKD)

La poliquistosis renal (PKD por sus siglas en inglés) describe varias condiciones que dan lugar a la formación de quistes rellenos de líquido en los riñones. Los quistes generalmente se desarrollan en los segmentos débiles de los túbulos que transportan la orina desde los glomérulos. El crecimiento de los quistes desplaza el tejido sano del riñón. Los riñones se expanden para acomodar el quiste, que puede pesar tanto como 20 libras. Hay muchas formas de PKD, ambas formas heredadas y no heredadas.

- 25 La PKD dominante autosómica (ADPKD) es la más corriente, forma heredada. Los síntomas de ADPKD usualmente se desarrollan entre las edades de 30 y 40, pero pueden comenzar más temprano, incluso en la infancia. Alrededor del 90 por ciento de todos los casos de PKD son PKD autosómica dominante. ADPKD se origina por la mutación en el gen PKD1 que codifica la policistina-1 (85% de los casos) o el gen PKD2 que codifica la policistina-1 (15% de los casos).

- 30 La PKD autosómica recesiva (ARPKD) es una forma rara, heredada. Los síntomas de PKD recesiva autosómica comienzan en los meses más tempranos de la vida, incluso en el vientre de la madre.

- 35 La enfermedad del riñón quístico adquirido (ACKD) se desarrolla en asociación con problemas de riñón de largo plazo, especialmente en pacientes que tienen fallo renal y que han estado en diálisis durante un largo tiempo. Por tanto tiende a ocurrir en los años últimos de la vida. No es una forma heredada de PKD.

- 40 Las enfermedades quística renales incluyen, pero no están limitadas a enfermedades quísticas renales tales como enfermedad quística renal adquirida (ARCD por sus siglas en inglés), enfermedad quística asociada con la diálisis, poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD), poliquistosis renal autosómica recesiva (ARPKD), riñón multiquistico congénico (CMK), riñón displásico multiquistico, enfermedad renal en estado terminal (ESRD), riñón medular en esponja, MSK, complejo de nefronoftisis-enfermedad quística medular (NMCD), complejo de nefronoftisis- enfermedad quística medular urémica, nefronoftisis juvenil, enfermedad quística medular, carcinoma de célula renal (RCC), esclerosis tuberosa (TS), síndrome de von Hippel-Lindau (VHLS).

- 45 Cuando PKD causa que los riñones fallen, lo que usualmente ocurre después de muchos años, el paciente requiere diálisis o transplante de riñón. Alrededor de la mitad de la gente con el tipo principal de PKD progresa hacia el fallo renal. PKD puede causar quistes en el hígado y problemas en otros órganos, tal como el corazón y vasos sanguíneos del cerebro. Estas complicaciones distingue la PKD de los quistes "simples" normalmente inofensivos que a menudo se forman en los riñones en los últimos años de la vida.

- 50 En los Estados Unidos, alrededor de 600.000 personas, y en todo mundo alrededor de 12,5 millones de personas tienen PKD, y es la causa principal del fallo renal. Tres factores determinan la clasificación del quiste: su causa (adquirido, heredado), sus características (complicado, simple, múltiple, único), y su localización en el tejido del riñón (externo (cortical) o interno (medular)).

En este momento, PKD no tiene cura. Los tratamientos para PKD incluyen la medicina y la cirugía para reducir el dolor, los antibióticos para resolver las infecciones, la diálisis para reemplazar las funciones de los riñones fallidos y el trasplante de riñón. Por tanto, hay una necesidad de desarrollar tratamientos más eficiente para el tratamiento de PKD.

5 El documento de patente de los Estados Unidos US 6.316.456 B1 se refiere a derivados de purina sustituida específicos 2-, 6- y 9- que se dice que tienen propiedades antiproliferativas. El documento de patente internacional WO 2006/042949 A1 describe derivados de purina sustituidos específicos 2-, 6- y 9- para el tratamiento de mucoviscidosis. El documento de patente internacional WO 2005/117941A2 describe ciertos métodos y composiciones para el tratamiento de las enfermedades poliquísticas. El documento de patente internacional WO 10 2006/012310 A2 se refiere a derivados de carbazol específicos para tratar la enfermedad del riñón poliquístico. Bukanov et al., Nature 444: 949-952 (2006) en la publicación titulada "Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine". Kuehn et al., Nephrol. Dial. Transplant. 22: 2133-2135 (2007) en la publicación titulada "Prime time for polycystic kidney disease: does one shot of roscovitine bring the cure?". Ibragimov-Beskrovnaya et al., Cell. Mol. Life Sci: 1-15 (2007) en la publicación titulada "Polycystic kidney disease: 15 *From molecular discoveries to targeted therapeutic strategies*".

En una realización, se proporciona en este documento la 6-bencilamino-2-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina para usar en métodos para tratar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad quística seleccionada de la enfermedad quística renal adquirida (ARCD), enfermedad quística asociada con diálisis, poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD), poliquistosis renal autosómica recesiva (ARPKD), riñón 20 multiquístico congénito (CMK), riñón multiquístico displásico, enfermedad del riñón en estado terminal (ESRD), riñón medular en esponja (MSK), complejo nefronofitosis-enfermedad quística medular (NMCD), complejo nefronofitosis-enfermedad quística medular urémica, nefronofitosis juvenil, enfermedad quística medular, esclerosis tuberosa (TS) y síndrome de von Hippel-Lindau (VHLS). En una realización, se proporciona en este documento la 6-bencilamino-2-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina para uso en métodos para el tratamiento mejora o prevención de la 25 enfermedad del riñón poliquístico.

Los métodos se realizan administrando 6-bencilamino-2-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina o una sal, solvato o hidrato de la misma, farmacéuticamente aceptables.

A. Definiciones

30 A menos que se defina de otra manera, todas las expresiones técnicas y científicas usadas en este documento tienen los mismos significados como se entiende comúnmente por una persona de habilidad común en la técnica. En el caso de que haya un conjunto de definiciones para un término en este documento, aquellas en esta sección prevalecerán a menos que se especifique de otra manera.

Como se usa en este documento, "enfermedad quística" se refiere a una enfermedad seleccionada de enfermedad quística renal adquirida ARCD, enfermedad cística asociada a la diálisis, poliquistosis renal autosómica dominante ADPKD, poliquistosis renal autosómica recesiva ARPKD, riñón multiquístico congénico CMK, riñón displásico 35 multiquístico, enfermedad renal en estado terminal ESRD, riñón medular en esponja, MSK, complejo de nefronofitosis-enfermedad quística medular NMCD, complejo nefronofitosis-enfermedad quística medular urémica, nefronofitosis juvenil, enfermedad quística medular, esclerosis tuberosa TS, y síndrome de von Hippel-Lindau VHLS.

40 Como se usa en esta documento, "poliquistosis renal" o "PKD" se refiere a un trastorno caracterizado por el crecimiento de numerosos quistes en los riñones. Los quistes están llenos de fluido. Los quistes en PKD pueden lentamente reemplazar mucha de la masa de los riñones, reduciendo la función renal y conduciendo al fracaso renal. Los signos y síntomas de PKD incluyen, pero no se limitan al dolor de espalda y de costado, expulsión frecuente de orina, dolor de cabeza, infecciones del tracto urinario, sangre en la orina, y quistes en los riñones y otros órganos.

45 Como se usa en este documento, "roscovitina" se refiere a la 6-bencilamino-2-(R)-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina. La estructura química de la roscovitina se describe en otro lugar en esta solicitud.

50 Como se usa en este documento, "dosificación por pulsos" se refiere a la dosificación de un fármaco que produce concentraciones del fármaco en aumento pronto en el intervalo de dosificación seguido de un periodo prolongado sin fármaco. Por ejemplo, los regímenes de dosificación por pulsos pueden incluir un intervalo de dosificación de 4 semanas seguido de un periodo de 4 semanas sin fármaco, un intervalo de dosificación de 3 semanas seguido de un periodo de 3 semanas sin fármaco, un intervalo de dosificación de 2 semanas seguido de un periodo de 2 55 semanas sin fármaco, un intervalo de dosificación de 1 semana seguido de un periodo de 1 semana sin fármaco, y un intervalo de dosificación de 5 días seguido de un periodo de 3 días sin fármaco. Este tipo de administración del fármaco es terapéuticamente ventajoso en ciertas realizaciones puesto que requiere una frecuencia de dosificación reducida y proporciona un mayor cumplimiento del paciente. En ciertas realizaciones, la dosificación por pulsos proporciona una ventana terapéutica mayor.

Como se usa en este documento "un periodo sin fármaco" se refiere a un intervalo en el régimen de dosificación por pulsos que no incluye administrar un compuesto proporcionado en este documento. El intervalo sin fármaco sigue a

un periodo durante el cual se administra el compuesto.

Como se usa en este documento, derivados farmacéuticamente aceptables de un compuesto incluyen sales, ésteres, éteres enólicos, ésteres enólicos, acetales, cetales, ortoésteres, hemiacetales, hemicetales, ácidos, bases, solvatos o hidratos del mismo. Dichos derivados pueden ser fácilmente preparados por aquellos con habilidad en la técnica usando métodos conocidos para dichas derivatizaciones. Los compuestos producidos pueden administrarse a animales o seres humanos sin sustancialmente efectos tóxicos y son farmacéuticamente activos. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, amoniaco, dietanolamina y otras hidroxialquilaminas, etilendiamina, N-metilglucamina, procaína, N-bencilfenetilamina, 1-para-clorobencil-2-pirrolidin-1'-ilmetilbenzimidazol, dietilamina y otras alquilaminas, piperazina y tris(hidroximetil)aminometano; sales de metales alcalinos, tales como litio, potasio y sodio; sales de metales alcalinotérreos, tales como bario, calcio y magnesio; sales de metales de transición, tales como el zinc; y sales inorgánicas, tales como el fosfato ácido de sodio y el fosfato disódico; y también incluyen sales de ácidos minerales, tales como hidroclouros y sulfatos; y sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, lactatos, malatos, tartratos, citratos, ascorbatos, succinatos, butiratos, valeratos, mesilatos, y fumaratos. Ésteres farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres de grupos ácidos de alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo y cicloalquilo, incluyendo ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos, ácidos fosfínicos, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos y ácidos borónicos. Éteres enólicos farmacéuticamente aceptables incluyen derivados de fórmula $C=C(OR)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, y cicloalquilo. Ésteres enólicos farmacéuticamente aceptables incluyen derivados de fórmula $C=C(OC(O)R)$ donde R es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, aralquilo, y cicloalquilo. Solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables son complejos de un compuesto con una o más moléculas de agua o disolvente, o 1 a aproximadamente 100, o 1 a aproximadamente 10, o uno a aproximadamente 2, 3 o 4, moléculas de agua o disolvente.

Como se usa en esta solicitud, EC_{50} se refiere a una dosis, concentración o cantidad de un compuesto específico de prueba que produce una respuesta dependiente de la dosis al 50% de la expresión máxima de una respuesta específica que se induce, provoca o potencia por el compuesto específico de prueba.

Debe entenderse que los compuestos proporcionados en esta solicitud pueden contener centros quirales. Dichos centros quirales pueden ser de la configuración (R) o (S), o pueden ser una mezcla de las mismas. Así, los compuestos proporcionados en esta solicitud pueden ser enantioméricamente puros, o ser mezclas estereoisómeras o diastereómeras. Como tales, una persona con habilidad en la técnica reconocerá que la administración de un compuesto en su forma (R) es equivalente, para los compuestos que sufren epimerización *in vivo*, a la administración del compuesto en su forma (S).

Como se usa en este documento, sustancialmente puro significa lo suficientemente homogéneo para estar libre de impurezas fácilmente detectables como se determina por métodos ordinarios analíticos, tales como la cromatografía en capa fina (CCF), electroforesis con geles, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS), usados por aquellos con conocimientos de las técnicas para evaluar dicha pureza, o suficientemente puros de manera que una purificación adicional no alteraría detectablemente las propiedades químicas y físicas, tales como las actividades enzimáticas y biológicas, de la sustancia. Los métodos para la purificación de los compuestos a fin de producir compuestos sustancialmente químicamente puros son conocidos por aquellos con habilidad en la técnica. Un compuesto sustancialmente químicamente puro puede, sin embargo, ser una mezcla de estereoisómeros. En tales casos, la purificación posterior puede aumentar la actividad específica del compuesto. La solicitud actual significa que incluye todos los isómeros posibles, así como, sus formas racémicas y formas ópticamente puras. Los isómeros ópticamente activos (+) y (-), (R)- y (S)-, o (D)- y (L)- pueden prepararse utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales, tales como HPLC en fase reversa.

Como se utiliza en este documento "sujeto" es un animal, tal como un mamífero, que incluye el hombre, tal como un paciente.

Como se utiliza en este documento, y a menos que se especifique de otro modo, los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" contemplan una acción que ocurre mientras que un paciente sufre de la enfermedad o alteración especificada, que reduce la severidad de la enfermedad o alteración, o retarda o enlentece la progresión de la enfermedad o alteración. El tratamiento también comprende cualquier uso farmacéutico de la composición de este documento, tal como su uso para tratar PKD.

Como se utiliza en este documento, mejora de los síntomas de una alteración particular mediante la administración de una composición farmacéutica particular se refiere a cualquier disminución de los síntomas, bien sea permanente o temporal, con duración o transitoria, que pueda atribuirse o asociarse con la administración de la composición.

Como se usa en este documento, a menos que se especifique de otra forma, los términos "prevenir," "previniendo" y "prevención" contemplan una acción que ocurre antes de que el paciente comience a sufrir de la enfermedad o alteración especificada, lo que inhibe o reduce la severidad de la enfermedad o alteración.

Como se utiliza en este documento, y a menos que se especifique de otro modo, los términos "manejar,"

"manejando" y "manejo" comprende prevenir la recurrencia de la enfermedad o alteración especificada en un paciente que ha sufrido ya de la enfermedad o alteración, y/o retardar el tiempo que un paciente que ha sufrido por la enfermedad o alteración permanece en remisión. Los términos incluye modular el umbral, desarrollo y/o duración de la enfermedad o alteración, o cambiar la forma en que un paciente responde a la enfermedad o alteración.

5 Como se utiliza en este documento y a menos que se especifique de otro modo, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" de un compuesto significan una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención y/o manejo de una enfermedad, y para retardar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o alteración que se trata. Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" pueden incluir una cantidad que mejora la terapia total, reduce o evita los síntomas o
10 causas de la enfermedad o alteración o aumenta la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

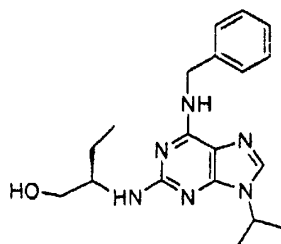
Como se usa en este documento, y a menos que se especifique de otra forma el término "cantidad profilácticamente eficaz" de un compuesto significa una cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o alteración, o uno o más síntomas asociados con la enfermedad o alteración, o prevenir su recurrencia. El término "cantidad profilácticamente eficaz" puede incluir una cantidad que mejora la profilaxis en su conjunto o aumenta la eficacia profiláctica de otro agente profiláctico.
15

Los términos "co-administración" y "en combinación con" incluye la administración de dos agentes terapéuticos bien simultáneamente, concurrentemente o secuencialmente sin límites específicos de tiempo. En una realización, ambos agentes están presentes en la célula o en el cuerpo del paciente al mismo tiempo o ejercen su efecto biológico o terapéutico al mismo tiempo. En una realización, los dos agentes terapéuticos están en composiciones separadas o en formas de dosificación unitarias separadas. En otra realización, los dos agentes terapéuticos están en composiciones separadas o formas de dosificación unitaria separadas.
20

B. Métodos de tratamiento

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas.

25 El compuesto para uso en los métodos proporcionados en este documento es la roscovitina. En otras realizaciones, el compuesto para uso en los métodos proporcionados en este documento es la R-roscovitina.



R-Roscovitina

La enfermedad quística se selecciona de la enfermedad quística renal adquirida (ARCD), enfermedad quística asociada con la diálisis, enfermedad de la poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD), enfermedad de la poliquistosis renal autosómica recesiva (ARPKD), riñón multiquístico congénico (CMK), riñón displásico multiquístico, enfermedad renal en estado terminal (ESRD), riñón medular en esponja, MSK, complejo nefronofitosis-enfermedad quística medular, (NMCD), complejo nefronofitosis-enfermedad quística medular urémica, nefronofitosis juvenil, enfermedad quística medular, esclerosis tuberosa (TS), y síndrome de von Hippel-Lindau (VHLS).
30

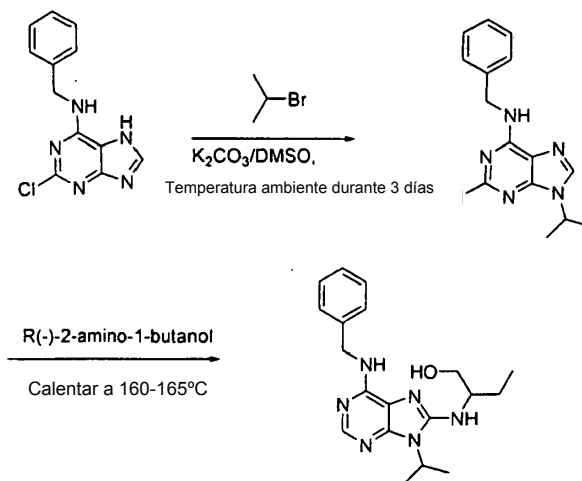
En una realización, la enfermedad quística es una enfermedad de poliquistosis renal (PKD). En ciertas realizaciones, los signos y síntomas de la enfermedad de poliquistosis renal incluyen, pero no se limitan al dolor de espalda y de costado, expulsión frecuente de orina, dolor de cabeza, infecciones del tracto urinario, sangre en la orina, y quistes en el riñón y otros órganos. La diagnosis de PKD se realiza por métodos conocidos por las personas con habilidad en la técnica e incluyen, pero no se limitan a la imagen por ultrasonido de los quistes de riñón, imagen por ultrasonido de quistes en otros órganos y la historia clínica familiar (prueba genética).
35

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la administración de roscovitina en dosificación por pulsos. El régimen para la dosificación por pulsos puede determinarse empíricamente. En ciertas realizaciones, el régimen de dosificación por pulsos es tal que el fármaco se administra durante un periodo de tres semanas consecutivas seguido de un intervalo sin fármaco de tres semanas. En otra realización, el método incluye la administración del fármaco durante un periodo de dos semanas consecutivas seguido de un intervalo sin fármaco de dos semanas, o administración del fármaco durante un periodo de una semana seguido de un intervalo sin fármaco de una semana.
40

45 C. Métodos de preparación

Los compuestos descritos en este documento pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo,

véase el documento de patente de Estados Unidos N° 6.316.456. Un esquema de reacción ejemplarizante para la preparación de roscovitina a partir de 6-bencilamino-2-cloropurina se describe a continuación. La 6-bencilamino-2-cloropurina puede prepararse como se describe por Hocart en *Phytochemistry* 1991, 30, 2477-2486.



- 5 El producto puede purificarse por cromatografía de columna con MeOH/ $CHCl_3$ y cristalizarse en acetato de etilo.

D. Composiciones farmacéuticas y formas de dosificación

Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación para uso en los métodos proporcionados en este documento contienen un compuesto proporcionado en este documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable y en cantidades que son útiles en los métodos de tratamiento, mejora o prevención de las enfermedades quísticas.
 10 En una realización, tales métodos incluyen tratamiento, prevención o mejora de la enfermedad del riñón poliquístico.

Los compuestos proporcionados para uso en este documento se formulan en preparaciones farmacéuticas adecuadas tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para la administración oral, o en soluciones estériles o suspensiones para administración parenteral, así como preparaciones de parches transdérmicos e inhaladores de polvos secos.
 15 En una realización, las formulaciones se preparan usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, séptima edición 1999).

En las composiciones, concentraciones eficaces de un compuesto proporcionado en este documento se mezcla(n) con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. La concentración del compuesto proporcionado en este documento en las composiciones es eficaz para la administración de una cantidad, que cuando se administra, trata,
 20 previene, o mejora uno o más de los síntomas o condiciones asociados con una enfermedad quística.

En algunas realizaciones, las composiciones se formulan para una administración única. Para formular una composición, la fracción de peso de un compuesto proporcionado en este documento se disuelve, suspende, dispersa o de otra forma se mezcla con un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de manera que la condición tratada se alivia o mejora. Los portadores o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de
 25 los compuestos proporcionados en este documento incluyen cualquiera de tales vehículos conocidos a los expertos en la técnica como que son adecuados para la forma específica de administración.

Además, un compuesto proporcionado en este documento puede formularse como un único ingrediente farmacéuticamente activo en la composición o puede combinarse con otros ingredientes activos. Las suspensiones de liposomas, que incluye los liposomas dirigidos al tejido, pueden también ser adecuadas como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse según los métodos conocidos por aquellos con conocimientos de la técnica, por ejemplo, las formulaciones de liposomas pueden prepararse como se describe en los documentos de patente de los Estados Unidos 4.522.811; y 5.571.534. Brevemente, los liposomas tal como las vesículas multilamelares (MLV's) pueden formarse mediante secado de la fosfatidilcolina del huevo y la fosfatidilserina del cerebro (7:3 relación molar) en el interior de un matraz. Se añade una solución de un compuesto
 30 proporcionado en este documento en solución salina tamponada de fosfatos que carece de cationes divalentes (PBS) y el matraz se agita hasta que la película de lípidos se dispersa. Las vesículas resultantes se lavan para eliminar el compuesto no encapsulado, se forman las bolitas por centrifugación, y se resuspenden en PBS.

Un compuesto proporcionado en este documento se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer el efecto deseado en el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz
 40 puede ser determinada empíricamente probando un compuesto proporcionado en este documento en sistemas *in vitro* e *in vivo* conocidos para uno con conocimientos de la técnica y después extrapolado desde el mismo para dosis en seres humanos.

La concentración de un compuesto proporcionado en este documento en la composición farmacéutica dependerá de la velocidad de absorción, inactivación y excreción de un compuesto proporcionado en este documento, el régimen de dosificación, y la cantidad administrada así como de otros factores conocidos para aquellos con conocimientos de la técnica.

5 La composición, forma, y tipos de formas de dosificación proporcionados en este documento variarán dependiendo de su uso. Por ejemplo, una forma de dosificación usada en el tratamiento agudo de una enfermedad puede contener cantidades mayores de uno o más de los ingredientes activos que contiene una forma de dosificación usada para el tratamiento crónico de la misma enfermedad. Similarmente, una forma de dosificación parenteral puede contener cantidades más pequeñas de uno o más de los ingredientes activos que contiene que una forma de
10 dosificación oral usada para tratar la misma enfermedad. Estas y otras maneras en las que las formas de dosificación específicas proporcionadas en este documento variarán de una a otra serán fácilmente aparentes para aquellos con conocimientos de la técnica. Véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Mack Publishing, Easton PA (2000).

15 El ingrediente activo puede administrarse de una vez, o puede ser dividido en un número de dosis más pequeñas para ser administrado en intervalos de tiempo. Se comprenderá que la dosificación precisa y la duración del tratamiento están en función de la enfermedad que se trata y pueden ser determinados empíricamente usando protocolos de tratamiento conocidos o por extrapolación desde los datos de pruebas *in vivo* o *in vitro*. Se apreciará que las concentraciones y los valores de dosificación pueden también variar con la severidad de la alteración que se va a aliviar. Además se comprenderá que para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específica
20 debería ser ajustados con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración establecidos en este documento son como ejemplarización solamente y no se intenta que limiten el alcance o práctica de la composición proporcionados en este documento.

25 Así, las concentraciones eficaces o la cantidad de un compuesto proporcionado en este documento se mezclan con un vehículo o transportador farmacéuticamente adecuado para la administración sistémica, tópica o administración local a fin de formar la composición farmacéutica. Un compuesto proporcionado en este documento está incluido en una cantidad eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad quística.

30 Las composiciones se pretende que sean administradas por una ruta adecuada, que incluye la vía oral, parenteral, rectal, tópica y local. Un compuesto proporcionado en este documento se formula y administra en formas de dosificación unitaria tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones parenterales estériles o suspensiones estériles, soluciones orales o suspensiones orales, y emulsiones aceite-agua que contienen cantidades adecuadas de ingrediente activo, o formas de dosificación múltiples. Las formas de dosificación unitarias como se usan en este documento se refieren a unidades discretas físicamente adecuadas para sujetos humanos y animales y empaquetadas individualmente como es conocido en la técnica. Cada unidad de dosificación contiene
35 una cantidad predeterminada del compuesto terapéuticamente activo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo, transportador o diluyente farmacéuticamente requerido. Ejemplos de formas de dosificación unitaria incluyen ampollas y jeringas y comprimidos enpaquetados individualmente o cápsulas. Las formas de dosificación unitaria puede ser administradas en fracciones o múltiples de las mismas. Una forma de dosificación múltiple es un conjunto de formas de dosificación unitaria idénticas empaquetadas en un recipiente
40 único para administrarse en formas de dosificación unitaria segregadas. Ejemplos de formas de dosificación múltiple incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por tanto, la forma de dosificación múltiple es una dosis unitaria o múltiple que no está segregada en el empaquetamiento.

45 Las composiciones libres de lactosa proporcionadas en este documento pueden contener excipientes que son bien conocidos en la técnica y están listados, por ejemplo, en la U.S. Pharmacopeia (USP) 25-NF20 (2002). En general, las composiciones libres de lactosa contienen ingredientes activos, un aglutinante/relleno, y un lubricante en cantidades farmacéuticamente aceptables y farmacéuticamente compatibles. En particular las formas de dosificación libres de lactosa, contienen ingredientes activos, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, y estearato de magnesio.

50 Se proporcionan además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras que comprenden el ingrediente activo, puesto que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) está ampliamente aceptada en la técnica farmacéutica como un medio de simular almacenaje a largo plazo a fin de determinar características como la vida de almacenamiento o la estabilidad de las formulaciones con el tiempo. Véase, *por ejemplo*, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 2ª edición, Marcel Dekker, NY, NY, 1995, páginas 379-80. De hecho, el agua y el calor aceleran la descomposición de
55 algunos compuestos. Así, el efecto del agua en una formulación puede ser de gran importancia puesto que el agua y/o la humedad se encuentran frecuentemente durante la fabricación, manejo, empaquetamiento, almacenaje, envío y uso de las formulaciones.

60 Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras proporcionadas en este documento pueden prepararse usando ingredientes anhidros o que contienen poca humedad y condiciones de poca agua o de baja humedad.

Una composición *farmacéutica* anhidra se debería preparar y almacenar en una manera que mantenga su naturaleza anhidra. Según esto, las composiciones anhidras se empaquetan preferiblemente usando materiales que se sabe que previenen la exposición al agua de manera que puedan ser incluidos en kits de formulario adecuados. Ejemplos de empaquetamientos adecuados incluyen, pero no están limitados a, láminas metálicas herméticamente cerradas, plásticos, recipientes de dosis unitarias (por ejemplo, viales), empaquetamientos blíster, y empaquetamientos en tira.

a. Composiciones para la administración oral

Las formas de dosificación oral son sólidos, geles o líquidos. Las formas de dosificación sólida son los comprimidos, cápsulas, gránulos y polvos a granel. Tipos de comprimidos orales incluyen los comprimidos, pastillas masticables y comprimidos que pueden ser recubiertos entéricamente, recubiertos con azúcar o recubiertos de película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina duras o blandas, mientras que los gránulos y polvos pueden proporcionarse de forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por aquellos versados en la técnica. Dichas formas de dosificación contienen cantidades predeterminadas de ingredientes activos, y pueden prepararse por métodos de farmacia bien conocidos por aquellos versados en la técnica. Véase *generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª edición, Mack Publishing, Easton PA (2000).

En ciertas realizaciones, las formulaciones son formas de dosificación sólidas, preferiblemente cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares, pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante, un relleno, un diluyente, un agente desintegrante, un lubricante, un deslizante, un agente edulcorante, y un agente saborizante. Ejemplos de excipientes que pueden usarse en las formas de dosificación oral proporcionadas en este documento incluyen, pero no están limitados a, aglutinantes, rellenos, desintegrantes y lubricantes. Aglutinantes adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero no están limitados a, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como la acacia, alginato sódico, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma de guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etil celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa cálcica, carboximetil celulosa sódica), polivinilpirrolidona, metil celulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (por ejemplo, los N° 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.

Formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen los materiales comercializados como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103, AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponibles de FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), y mezclas de los mismos. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetil celulosa sódica comercializada como AVICEL RC-581. Excipientes o aditivos anhidros o de baja humedad adecuados incluyen AVICEL-PH-103 y Starch 1500 LM.

Ejemplos de rellenos adecuados para uso en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación divulgadas en este documento incluyen, pero no están limitados al talco, carbonato cálcico (por ejemplo, como gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas en este documento está presente de aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma de dosificación.

Los desintegrantes se usan en las composiciones proporcionadas en este documento para proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se les expone a un entorno acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado desintegrante pueden desintegrarse durante el almacenamiento, mientras que aquellos que contienen demasiado poco pueden no desintegrarse a una velocidad deseada o en las condiciones deseadas. De esta forma, debería usarse una cantidad suficiente de desintegrante que es ni demasiado ni demasiado poco para cambiar de forma detrimento la liberación de los ingredientes activos para formar las formas de dosificación sólida proporcionadas en esta solicitud. La cantidad de desintegrante usado varía basado en el tipo de formulación, y es fácilmente calculable para los que tenga una habilidad ordinaria en la técnica. En alguna realización, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de desintegrante, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de desintegrante.

Desintegrantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación proporcionadas en este documento incluyen el agar-agar, ácido algínico, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilin potásico, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y mezclas de los mismos.

Lubricantes que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación proporcionadas en este documento incluyen el estearato cálcico, estearato magnésico, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato sódico, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Lubricantes adicionales incluyen, for ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL®200, fabricado por W.R. Grace Co.

de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Plano, TX), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicio pirogénico comercializado por Cabot Co. de Boston, MA), y mezclas de los mismos. Si se usan, los lubricantes se usan en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en los que se incorporan.

5 Si se desea una administración oral, un compuesto proporcionado en este documento podría proporcionarse en una formulación que se formula como comprimidos con recubrimiento entérico, comprimidos recubiertos de azúcar, comprimidos recubiertos de película o comprimidos de compresión múltiple. Los comprimidos con recubrimiento entérico protegen el ingrediente activo del entorno ácido del estómago. Los comprimidos recubiertos de azúcar son comprimidos por compresión a los que se aplican diferentes capas de sustancias farmacéuticamente aceptables.
10 Los comprimidos recubiertos de película son comprimidos por compresión que han sido recubiertos con un polímero u otro recubrimiento adecuado. Los comprimidos de compresión múltiple son comprimidos de compresión hechos con más de un ciclo de compresión utilizando las sustancias farmacéuticamente aceptables mencionadas anteriormente. Agentes colorantes pueden también usarse en las formas de dosificación anteriores. Agentes saborizantes y edulcorantes se usan en comprimidos de compresión, recubiertos de azúcar, de compresión múltiple y masticables. Los agentes saborizantes y edulcorantes son especialmente útiles en la formación de comprimidos masticables y pastillas. La composición puede también formularse en combinación con un antiácido u otros tales ingredientes.
15

20 Cuando la forma de unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso. En una cápsula de gelatina, la solución o suspensión que contiene un compuesto proporcionado en este documento, en por ejemplo carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, está preferiblemente encapsulada en la cápsula. Dichas soluciones, y la preparación y encapsulación de las mismas, se divulgan en los documentos de patente de Estados Unidos Nos. 4.328.245; 4.409.239; y 4.410.545.

25 El ingrediente activo puede también mezclarse con otros materiales activos que no disminuyen la acción deseada, o con materiales que suplementan la acción deseada, tales como antiácidos, bloqueantes de H₂, y diuréticos. Pueden incluirse concentraciones más altas, hasta aproximadamente 98% en peso del ingrediente activo.

30 Formas de dosificación oral líquidas incluyen soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones y/o suspensiones reconstituidas de gránulos no-efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Soluciones acuosas incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Los elixires son preparaciones hidroalcohólicas transparentes, endulzadas. Vehículos farmacéuticamente aceptables usados en los elixires incluyen disolventes. Los jarabes son soluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante.

35 Una emulsión es un sistema de dos fases en la que un líquido se dispersa en forma de glóbulos pequeños a través de otro líquido. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en las emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulsionantes y conservantes. Las suspensiones usan agentes suspensores farmacéuticamente aceptables y conservantes. Sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos no efervescentes, que se van a reconstituir como una forma de dosificación líquida oral, incluyen agentes diluyentes, edulcorantes y humectantes. Sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos efervescentes, que se van a reconstituir como una forma de dosificación líquida oral, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Agentes colorantes y saborizantes se usan en todas las formas de dosificación anteriores.
40

45 Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Ejemplos de conservantes incluyen la glicerina metil y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato sódico y alcohol. Ejemplos de líquidos no acuosos utilizados en las emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Ejemplos de agentes emulsionantes incluyen la gelatina, acacia, tragacanto, bentonita y tensioactivos tales como monooleato de polioxietileno de sorbitano. Agentes de suspensión incluyen carboximetilcelulosa sódica, pectina, tragacanto, Veegum y acacia.

50 los diluyentes incluyen lactosa y sacarosa. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, siropes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales tales como la sacarina. Los agentes humectantes incluyen propileno, monoestearato de glicerol, monooleato de sorbitano, monolaurato de dietilenglicol y polioxietileno lauril éter. Los ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico y ácido tartárico. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen bicarbonato sódico y carbonato sódico. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los tintes FD y C solubles en agua certificados aprobados, y mezclas de los mismos. Agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutos, y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación de sabor agradable.

55 Las composiciones farmacéuticas que contienen ingredientes activos en forma de micelas pueden prepararse como se describe en el documento de patente de los Estados Unidos N° 6.350.458. Tales composiciones farmacéuticas son particularmente efectivas en aplicaciones orales, nasales y bucales.

En ciertas realizaciones, las formulaciones incluyen, pero no están limitadas a, aquellas que contienen un compuesto proporcionado en este documento, un mono o polialquilglicol dialquilado, incluyendo 1,2-dimetoximetano, diglima, triglima, tetraglima, polietilenglicol-350-dimetiléter, polietilenglicol-550-dimetiléter, y

polietilenglicol-750-dimetiléter en donde 350, 550 y 750 se refieren al peso molecular medio aproximado del polietilenglicol, y uno o más antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, vitamina E, hidroquinona, hidroxicumarinas, etanolamina, lecitina, cefalina, ácido ascórbico, ácido málico, sorbitol, ácido fosfórico, ácido tiodipropiónico y sus ésteres, y ditiocarbamatos.

- 5 Otras formulaciones incluyen, pero no están limitadas a, soluciones hidroalcohólicas que incluyen un acetal farmacéuticamente aceptable. Los alcoholes usados en estas formulaciones son cualquier disolvente miscible en agua farmacéuticamente aceptable que tiene uno o más grupos hidroxilo, incluyendo propilenglicol y etanol. Los acetales incluyen acetales de di(alquilo inferior) de alquilaldehydos más inferiores tales como dietilacetal de acetaldehído.

10 b. Formas de dosificación de liberación retardada

Los ingredientes activos proporcionados en este documento pueden administrarse por medios de liberación retardada o mediante dispositivos de administración que son bien conocidos para aquellos con conocimientos de la técnica. Los ejemplos incluyen aquellos descritos en los documentos de patente de los Estados Unidos N°: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719, 5.674.533, 5.059.595, 5.591.767, 5.120.548, 5.073.543, 5.63 9.476, 5.354.556, y 5.733.566. Tales formas de dosificación pueden usarse para proporcionar liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos de multicapa, micropárculas, liposomas, microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones diferentes. Formulaciones de liberación retardadas adecuadas conocidas para aquellos con conocimiento ordinario de la técnica, incluyendo aquellas descritas en este documento, pueden seleccionarse fácilmente para usar con los ingredientes activos proporcionados en este documento.

25 Todos los productos farmacéuticos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia del fármaco sobre aquella alcanzada por sus correspondientes agentes de liberación no controlada. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada óptimamente diseñada en un tratamiento médico se caracteriza por una cantidad mínima del fármaco que se emplea para curar o controlar la alteración, en una cantidad mínima de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen actividad extendida del fármaco, frecuencia de dosificación reducida, y cumplimiento del paciente aumentado. Además las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para afectar el tiempo de comienzo u otras características, tales como los niveles en sangre del fármaco, y así poder afectar la aparición de efectos secundarios (por ejemplo adversos).

30 La mayor parte de las formulaciones de liberación controladas están diseñadas para liberar inicialmente una cantidad de fármaco (ingrediente activo) que rápidamente produce el efecto terapéutico deseado, y gradualmente y continuamente liberar otras cantidades de fármaco para mantener este nivel terapéutico o profiláctico durante un periodo extendido de tiempo. Para mantener este nivel constante del fármaco en el cuerpo, el fármaco tiene que ser liberado de la forma de dosificación a una velocidad que reemplazará la cantidad de fármaco que se metaboliza y excreta del cuerpo. La liberación controlada de un ingrediente activo puede estimularse por varias condiciones que incluyen el pH, temperatura, enzimas, agua, u otras condiciones fisiológicas o compuestos.

35 En ciertas realizaciones, el agente puede administrarse usando una infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En una realización, se puede utilizar una bomba (véase, Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J Med.* 321:574 (1989). En otra realización se pueden usar materiales poliméricos. En todavía otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse en la proximidad de la diana terapéutica, por ejemplo, requiriendo así solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, páginas 115-138 (1984).

45 Preferiblemente, un dispositivo de liberación controlada se introduce en un sujeto en la proximidad del lugar de la activación inmune inapropiada o en un tumor. Otros sistemas de liberación controlada se exponen en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)). El ingrediente activo puede dispersarse en una matriz interna sólida, por ejemplo, polimetilmetacrilato, polibutylmetacrilato, cloruro de polivinilo plastificado o no plastificado, nilón plastificado, polietilentereftalato plastificado, goma natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etilenvinilacetato, gomas de siliconas, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrófilos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, alcohol polivinílico entrecruzado o acetato de polivinilo hidrolizado parcialmente entrecruzado, que está rodeada de una membrana polímera exterior, por ejemplo, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, gomas de silicona, polidimetilsiloxanos, goma de neopreno, polietileno clorado, cloruro de polivinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, ionómero de tereftalato de polietileno, gomas de epiclorhidrina de goma de butilo, copolímero de etileno/alcohol vinílico, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol vinílico, y copolímero de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en los fluidos del cuerpo. El ingrediente activo después se difunde a través de la membrana polímera exterior en una etapa de control de la velocidad de liberación. El porcentaje del ingrediente activo contenido en dichas composiciones parenterales es muy dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de las necesidades del sujeto.

c. Administración parenteral

La administración parenteral, generalmente caracterizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa se contempla también en este documento. Los inyectables pueden prepararse de forma convencional, o como soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, el agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden también contener cantidades pequeñas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampones del pH, estabilizantes, mejoradores de la solubilidad, y otros tales agentes, tales como por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

- 5 La inyección, o como emulsiones. Excipientes adecuados son, por ejemplo, el agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas que se van a administrar pueden también contener cantidades pequeñas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampones del pH, estabilizantes, mejoradores de la solubilidad, y otros tales agentes, tales como por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.
- 10 La administración parenteral de las composiciones incluye las administraciones intravenosa, subcutánea e intramuscular. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles secos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un disolvente justo antes del uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para la inyección, productos insolubles secos estériles listos para ser combinados con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las
- 15 soluciones pueden ser o acuosas o no acuosas.

Si se administra por vía intravenosa, vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contengan agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

- 20 Vehículos farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersión, agentes emulsionantes, agentes de secuestro o de quelación y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

- 25 Ejemplos de vehículos acuosos incluyen la inyección de cloruro sódico, inyección de Ringers, inyección isotónica de dextrosa, inyección de agua estéril, inyección de Ringers lactada y de dextrosa. Vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas deben añadirse a las preparaciones parenterales empaquetadas en recipientes de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres del ácido metil and propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Agentes isotónicos incluyen el cloruro sódico y la dextrosa. Tampones
- 30 incluyen el fosfato y citrato. Antioxidantes incluyen el bisulfato sódico. Anestésicos locales incluyen el hidrocloreuro de procaina. Agentes de suspensión y dispersión incluyen la carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Agentes emulsionantes incluyen el Polysorbate 80 (TWEEN® 80). Un agente de secuestro o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Vehículos farmacéuticos también incluyen el alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol en caso de vehículos miscibles con agua y el hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste del pH.
- 35

La concentración de un compuesto proporcionado en este documento se ajusta de manera que una inyección proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y condición del paciente o animal como se conoce en la técnica.

- 40 Las preparaciones parenterales de dosis unitaria se empaquetan en una ampolla, un vial o una jeringa con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles, como se conoce y practica en la técnica.

- 45 De forma ejemplarizante, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución estéril acuosa que contiene un ingrediente activo es una forma eficaz de administración. Otra realización es una solución o suspensión acuosa o aceitosa estéril que contiene un material activo inyectado como sea necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

- 50 Los inyectables se diseñan para la administración local y sistémica. En una realización, una dosis terapéuticamente eficaz se formula para contener una concentración de al menos aproximadamente 0,1% p/p hasta aproximadamente 90% p/p o más, preferiblemente más de 1% p/p de un compuesto proporcionado en esta solicitud a los tejidos tratados. El ingrediente activo puede administrarse de una vez, o puede ser dividido en un número de dosis más pequeñas para ser administradas en intervalos de tiempo. Se comprenderá que la dosificación precisa y la duración del tratamiento están en función del tejido que se trata y pueden ser determinadas empíricamente usando protocolos de tratamiento conocidos o por extrapolación desde los datos de pruebas in vivo o in vitro. Se apreciará que las concentraciones y los valores de dosificación pueden también variar con la edad del individuo tratado. Además se comprenderá que para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ser ajustados con
- 55 el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las formulaciones, y que los intervalos de concentración establecidos en este documento son como ejemplarización y no se intenta que limiten el alcance o práctica de las formulaciones reivindicadas.

Un compuesto proporcionado en esta solicitud puede ser suspendido o micronizado o en otras formas adecuadas o puede ser derivatizado para producir un producto activo más soluble o para producir un profármaco. La forma de la mezcla obtenida depende de un número de factores, incluyendo la forma de administración deseada y la solubilidad del compuesto proporcionado en esta solicitud en el portador o vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la condición y puede determinarse empíricamente.

d. Polvos liofilizados

De interés en este documento son también los polvos liofilizados, que pueden reconstituirse para la administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. Pueden también reconstituirse y formularse como sólidos o geles.

El polvo estéril, liofilizado se prepara disolviendo el ingrediente activo, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, la dextrosa, sorbitano, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente puede también contener un tampón, tal como citrato, fosfato sódico o potásico u otros de dichos tampones conocidos a los que están versados en la técnica a aproximadamente un pH neutro. La filtración estéril subsecuente de la solución seguida de la liofilización en condiciones estándar conocidas a los versados en la técnica proporciona la formulación deseada. Generalmente, la solución obtenida se repartirá en viales para su liofilización. Cada vial contendrá una dosis única (10-500 mg, preferiblemente 100-300 mg) o dosis múltiples de un compuesto proporcionado en este documento. El polvo liofilizado puede ser almacenado en condiciones apropiadas, tales como de aproximadamente 4° C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyectables proporciona una formulación para uso en la administración parenteral. Para la reconstitución, se añade aproximadamente de 1-50 mg, preferiblemente de 5-35 mg, más preferiblemente aproximadamente de 9-30 mg de polvo liofilizado, por ml de agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Dicha cantidad puede ser empíricamente determinada.

e. Administración tópica

Las mezclas tópicas se preparan como se describe en la administración local y sistémica. La mezcla obtenida puede ser una solución, suspensión, emulsión o similar y se formulan como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para la administración tópica.

Los compuestos proporcionados en este documento pueden formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y membranas mucosas, en la forma de geles, cremas, y lociones. La administración tópica se contempla para la administración transdérmica y también para la administración a las mucosas, o para las terapias de inhalación.

f. Composiciones para otras rutas de administración

Otras rutas de administración, tales como la aplicación tópica, parches transdérmicos, y la administración rectal también se contemplan en esta solicitud. Por ejemplo, formas de dosificación farmacéuticas para la administración rectal son los supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales como se utilizan en este documento significan cuerpos sólidos para la inserción dentro del recto que se funden o reblandecen a la temperatura del cuerpo liberando uno o más ingredientes terapéuticamente o farmacológicamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables utilizadas en los supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Los ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbowax (polietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Pueden usarse las combinaciones de varias bases. Los agentes para elevar el punto de fusión incluyen espermaceti y cera. Los supositorios rectales pueden prepararse o por métodos de compresión o por moldeo. En ciertas realizaciones, el peso del supositorio rectal es de alrededor de 2 a 3 gramos.

Los comprimidos y las cápsulas para la administración rectal se manufacturan usando las mismas sustancias farmacéuticamente aceptables y los mismos métodos que en las formulaciones para uso oral.

g. Artículos de envasado

Los compuestos proporcionados en este documento pueden ser envasados como artículos de fabricación que contienen material de envasado y una etiqueta que indica que el compuesto se usa para tratar, mejorar o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad quística. Los artículos de fabricación proporcionados en este documento contienen materiales de empaquetamiento. Los materiales de envasado para usar en el envasado de los productos farmacéuticos son bien conocidos para el experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de los Estados Unidos números 5.323.907, 5.052.558 y 5.033.352. Ejemplos de materiales de envasado farmacéuticos incluyen paquetes de blíster, botellas, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, recipientes, jeringas, botellas y

cualquier otro material de embalaje adecuado para la formulación seleccionada y el modo en que se intenta la administración del tratamiento. Un rango amplio de formulaciones de los compuestos proporcionados en este documento se contemplan en este documento.

G. Evaluación de la actividad de los compuestos

- 5 Los procedimientos estándar fisiológicos, farmacológicos y bioquímicos están disponibles y son conocidos para uno con conocimiento de la técnica para probar la eficacia de los compuestos por los métodos proporcionados en este documento. Estos procedimientos incluyen pero no están limitados a ensayos cistogénicos *in vitro* y estudios de eficacia *in vivo* utilizando dos modelos diferentes de PKD en ratón: jck (lentamente progresivo) y cpk (agresivo). R ratones jck desarrollan quistes focales a los 3 días de vida, alrededor de los 26 días la enfermedad quística se establece y alrededor de los 50 días la mayoría de los hígados están envueltos en la cistogénesis. Una pauta de tratamiento como ejemplo para los ratones jck incluye inyecciones diarias intraperitoneales (IP) de un compuesto proporcionado en este documento desde el día 26 al día 50 o al día 64. Al final del estudio los ratones son sacrificados y se toman los siguientes puntos finales :
- 10
1. Relación peso del riñón a peso corporal
 - 15 2. Histología: El porcentaje de quistes se mide cuantitativamente con Metamorph® como la relación del área cística al área de la sección total y se usa para los cálculos de los volúmenes císticos (porcentaje del peso del cuerpo).
 3. Función renal: nitrógeno de la urea del suero sanguíneo (BUN) y creatinina.

Métodos para determinar estos puntos finales son conocidos para uno con conocimientos de la técnica. Métodos como ejemplo se describen en este documento.

20

La eficacia de un compuesto en el tratamiento de PKD está indicada por la reducción en la relación de peso riñón/ peso corporal, reducción del volumen cístico y/o reducción en BUN y creatinina.

Ejemplos

25 Los modelos jck y cpk en ratón de PKD (C57BL/6J jck/+ ratones y C57BL/6J cpk/+ ratones) se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y se usaron para establecer una colonia de cría mantenida en Biological Research Models (B.R.M., Worcester, MA, USA) y Genzyme (Framingham, MA, USA). R-Roscovitina, (6-bencilamino-2-[R-1-etil-2-hidroxiethylamino]-9-isopropilpurina) se obtuvo de A.G. Scientific (San Diego, CA). Los ratones císticos jck/jck se identificaron mediante un ensayo del genotipo a medida, se dividieron en grupos control y tratado y se inyectaron intraperitonealmente (IP) con vehículo o fármaco a concentraciones específicas. En los ejemplos a continuación, la roscovitina se refiere a la R-roscovitina.

30

Ejemplo 1

Comenzando en el día 26 postnatal los ratones jck/jck recibieron o roscovitina (50 o 150 mg/kg) o vehículo (etanol al 5%, cremofor al 5% en solución salina tamponada, pH 7,2) durante 3 o 5 semanas. Se llevó a cabo terapia por pulsos con 150 mg/kg por inyección IP diariamente comenzando el día 26 durante 3 semanas seguidas por 2 semanas sin tratamiento o alternativamente una semana de tratamiento con una semana sin tratamiento durante un total de 5 semanas.

35

Animales Cpk (camadas completas de cpk/+ criadores heterocigóticos) fueron inyectados diariamente IP empezando en el día 7 después del nacimiento, o con roscovitina (100 mg/kg) o vehículo durante 2 semanas.

40 A los ratones se les realizó la eutanasia por asfixia por CO₂ y los riñones fueron procesados para la extracción de proteínas (congelación instantánea) y para el examen histológico (fijado en solución tamponada al 4% de PFA, pH 7,2). La sangre se recolectó por punción cardiaca y el nitrógeno de la urea del suero y los niveles de creatinina se midieron utilizando un analizador VetACE de (Alfa Wasserman, West Caldwell, NJ).

Análisis morfométrico de la cistogénesis

45 Los riñones embebidos en parafina fueron cortados para obtener secciones transversales y longitudinales de cuatro micrómetros. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) con un procesador Tissue Tek® 2000 de (Sakura-Finetek, Torrance, CA). Las transparencias se digitalizaron con un sistema ACIS® (Clariant, San Juan Capistrano, CA) y procesadas con el software MetaMorph Imaging Series® (Molecular Devices Corp, Downingtown, PA). Para verificar los datos generados por MetaMorph, las secciones del riñón fueron también evaluadas con el software Scion Image (Scion Corp, Frederick, MD). Los datos generados con MetaMorph y el software de Scion fueron casi idénticos con menos del 0,5% de variación. El grado de cistogénesis fue cuantificado desde las secciones tanto longitudinales como transversales para cada ratón. Las dilataciones con un diámetro mayor de 5x el diámetro del túbulo normal se contaron como quistes. El porcentaje cístico se midió como se ha descrito previamente como una relación del área cística al área de la sección total y se usó en los cálculos de los volúmenes

50

císticos (porcentaje del peso corporal) como se ha descrito previamente por Torres *et al.*, Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease *Nat. Med.* (2004).

5 Como se ve de los datos presentados en la Tabla 2 y la Tabla 2a (para el modelo en ratones de jck), la roscovitina fue bien tolerada con ninguna pérdida de peso, mortalidad o toxicidad. El grupo tratado con roscovitina mostró reducción de la relación de peso del riñón a peso corporal y volúmenes císticos en forma dependiente de la dosis. BUN (nitrógeno de la urea en sangre) se redujo en el grupo tratado con 50 mg/kg de roscovitina y se normalizó con 150 mg/kg de roscovitina. La roscovitina también inhibió PKD en hembras jck/jck, donde la enfermedad es menos severa que en los machos.

10 En un estudio de tratamiento por pulsos donde 150 mg/kg de roscovitina se administró diariamente a machos de jck/jck durante 3 semanas, seguido por 2 semanas sin tratamiento, se detectó un efecto anticístico de larga duración con niveles normalizados de BUN. En un régimen diferente donde el fármaco se administró diariamente durante una semana seguido por una semana sin tratamiento durante un total de 5 semanas, se detectó reducción de la citogénesis. Por tanto, en ciertas realizaciones, la roscovitina muestra un efecto de larga duración del tratamiento después de quitar el fármaco y es también eficaz con dosificación intermitente.

15 La Tabla 3 proporciona los datos para el modelo de cpk. Como se puede ver de los datos, el tratamiento diario de ratones de cpk con 100 mg/kg de roscovitina del día 7 hasta el día 21 originó la reducción de PKD.

Tabla 2. Efecto anticístico de roscovitine en el modelo de PKD con ratones de jck.

Nº	Sexo		Dosis (mg/kg)	Tratamiento (semanas)	Nº de animales	Peso corporal(g)	relación peso R / Peso C (%)	BUN (mg/dl)	Volumen cístico (% PC)
	Tratamiento continuo								
1	Vehículo	H	-	5 semanas	10	20,09 ± 0,86	5,71 ± 0,58	52,67 ± 12,30	1,66 ± 0,54
2	Roscovitina	H	150	5 semanas	12	19,79 ± 0,80	3,49 ± 0,42*	31,09 ± 6,12*	0,74 ± 0,24*
3	Vehículo	M	-	5 semanas	17	20,75 ± 1,56	9,07 ± 0,69	79,00 ± 14,47	3,63 ± 0,53
4	Roscovitina	M	150	5 semanas	9	21,52 ± 1,78	4,17 ± 0,26*	26,78 ± 3,31*	0,98 ± 0,15*
5	Roscovitina	M	50	5 semanas	8	20,54 ± 1,66	6,55 ± 1,06*	51,25 ± 10,19*	2,25 ± 0,66
	Tratamiento por pulsos								
7	Vehículo	M	-	5 semanas (1/1**)	6	23,21 ± 0,90	7,59 ± 0,96	63,67 ± 10,33	2,79 ± 0,72
8	Roscovitina	M	150	5 semanas (3/2**)	5	22,77 ± 0,39	4,71 ± 0,69*	27,60 ± 4,32*	1,29 ± 0,40*
9	Roscovitina	M	150	5 semanas (1/1**)	9	22,14 ± 1,10	4,56 ± 0,62*	43,90 ± 13,08	1,28 ± 0,22*
10	Tipo silvestre (50 d)	H	-	-	6	18,66 ± 1,09	1,36 ± 0,10	22,83 ± 2,50	N/A
11	Tipo silvestre (50 d)	M	-	-	7	25,07 ± 0,78	1,40 ± 0,10	25,57 ± 2,33	N/A

* indica P<0,05 entre los animales tratados con roscovitina frente a animales tratados con el vehículo

N/A - no aplicable

** indica tratamiento por pulsos, por ejemplo 5 semanas (1/1) indica 1 semana con roscovitina seguida de 1 semana sin roscovitina durante 5 semanas.

Tabla 2a. Efecto de roscovitina (dosificación diaria durante 5 semanas) sobre la progresión de PKD en ratones jck (macho)

Nº		Dosis (mg/kg)	Nº de animales	Peso corporal(g)	Relación peso R / C (%)	BUN (mg/dl)	Volumen cístico (%PC)
1	Vehículo	-	10	20,95 ± 1,56	8,76 ± 0,56	77,30 ± 13,10	4,06 ± 0,44
2	Roscovitina	150	9	22,33 ± 1,05	4,23 ± 0,53*	28,89 ± 7,51*	1,10 ± 0,41*

* indica P<0,05 entre los animales tratados con roscovitina frente a los animales tratados con vehículo

Tabla 3. Efecto anticístico de roscovitina en Anti-cystic effect of Roscovitine in el modelo de PKD de *cpk*

Nº		Noº de animales	Peso corporal(g)	Relación peso R / C (%)	Creatinina (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Volumen cístico (%PC)
1	Vehículo	23	9,21 ± 0,73	25,31 ± 2,13	0,46 ± 0,10	70,39 ± 16,50	19,21 ± 1,62
2	Roscovitina	20	9,75 ± 1,00	19,25 ± 3,17*	0,29 ± 0,07*	54,58 ± 9,60*	14,62 ± 2,16*

* indica P<0,05 entre los animales tratados con roscovitina frente a los animales tratados con vehículo

5

Examen Immunohistoquímico e inmunofluorescente

Muestras de riñones de ADPKD y normal embebidos en parafina fijados con formalina se obtuvieron de Cytomix LLC (Lexington, MA). Secciones de riñón de cuatro micrómetros se trataron con proteinasa K o se hirvieron en Citra Antigen Retrieval Solution (Biogenex, San Ramon, CA) en una olla a presión para desenmascarar los antígenos. El teñido de PCNA se llevó a cabo como se describe en el protocolo del productor para el kit M.O.M. (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El teñido en TUNEL se llevó a cabo según el protocolo del productor para ApopTag Apoptosis Detection Kit (Chemicon, Temecula, CA). Lectin Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) se usó a la dilución 1:50. Los anticuerpos anticalbindina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y anti-Tamm-Horsfall glicoproteína (US Biological, Swampscott, MA), se usaron como estaba recomendado por los productores. Los anticuerpos secundarios (Sigma-Aldrich) conjugados con Cy3 o FITC se usaron a la dilución 1:100. El teñido fue visualizado en un microscopio Olympus IX70 con objetivo 20x (Olympus-America, Melville, NY). Las imágenes se capturaron con cámara QED sistema de imagen Plug-In (QED imaging, Pittsburgh, PA).

Se confirmaron altas velocidades de proliferación para la ADPKD humana de los quistes que recubrían los epitelios usando inmuno manchas de PCNA. De igual forma, se observaron un gran número de células PCNA positivas en los quistes jck. En el riñón de jck tratado con roscovitina, se observó una reducción cuantitativa de las células PCNA-positivas. El tratamiento con roscovitina redujo también el número de células TUNEL -positivas.

Purificación de las proteína y análisis por Western blot

Se homogeneizaron los riñones en tampón RIPA (10 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato sódico, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na3VO4) con cocktail de Complete™ inhibidor de proteasa (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania). Muestras de proteína de 30 µg se separaron en 4-12% de geles de SDS/acrilamida (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los geles se empaparon con tampón de transferencia (192 mM glicina, 25 mM Tris, 10% metanol, pH 8,3) y se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA). Las membranas se rehidrataron con metanol y se incubaron con tampón de bloqueo (5% leche en polvo o 3% BSA en PBS) durante 30 minutos. Las membranas se incubaron durante la noche a 4° C con anticuerpos primarios contra RNApoll-p, p35/p25 (Abcam, Cambridge, MA); Rb-p, cycD1, cycD1-p, ERK2, ERK1/2-p (Cell Signaling, Danvers, MA); Rb2, RBBP, cycD3, caspasa-2, caspasa-3, ApaF1, Bcl-2, Bcl-XL, BAD (BD Biosciences, San José, CA); CDK7, CDK9, PCNA, GAPDH (US Biologicals, Swampscott, MA); cycD2 (BioSource International, Camarillo, CA), se lavaron con TBST y se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con HRP como se recomienda por el fabricante. Las proteínas inmunoreactivas se detectaron usando quimio-luminiscencia mejorada (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Buckinghamshire, Inglaterra).

Los datos obtenidos indicaron que la forma Rb-p estaba aumentada en los riñones quísticos. El tratamiento con roscovitina produjo la desfosforilización de Rb3 sugiriendo un bloqueo eficaz del ciclo celular G1/S. Además, el tratamiento con roscovitina normalizó las concentraciones de las proteínas asociadas con Rb, Rb2 y RBB2. Aunque la concentración de ciclina D1 no aumentó sustancialmente en los riñones quísticos, su fosforilización (Thr-286) disminuyó. La roscovitina normalizó el nivel de fosforilización de la ciclina D1. Los niveles de expresión de la ciclina D2 y D3 aumentaron en el riñón quístico y fueron regulados hacia abajo por la roscovitina. La roscovitina también afectó a la señalización de Ras-Raf a MEK-ERKs, que se sabe regula la ciclina D1 disminuyendo el nivel de activación de ERK 1/2. La roscovitina también inhibe CDK7 y CDK9 que regulan la transcripción por medio de la fosforilización del dominio del C-terminal de la RNA polimerasa II (RNA pol II). Concentraciones moderadamente

aumentadas de CDK7 y CDK9 detectadas en riñones quísticos produjeron una fosforilización grandemente aumentada de RNA pol II. Por el contrario, muestras tratadas con roscovitina fueron casi no distinguibles de los controles WT mostrando niveles reducidos de fosforilización de RNA pol II. Así, la roscovitina atenúa la cistogénesis por medio de la interrupción del ciclo celular e inhibición de la transcripción.

5 Ejemplo 2: Inhibición In vitro de la cistogénesis

Se usó un ensayo estándar de cistogénesis in vitro como se describió anteriormente. (Véase, Bukanov, N. O. *et al.* Functional polycystin-1 expression is developmentally regulated during epithelial morphogenesis in vitro: downregulation and loss of membrane localization during cystogenesis. *Hum. Molec. Genetics* 11, 923-936 (2002) y Li, H., *et al.* The relationship between cell proliferation, Cl⁻ secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. *Kidney Int* 66, 1926-38 (2004)). Brevemente, células epiteliales de riñón MDCK (ATCC, Rockville, Maryland) se cultivaron en MEM/10%FBS. Se cultivaron los quistes MDCK en 3D colágeno I gel (BD Biosciences, Bedford, MA) en placas de 96 pocillos durante cuatro días hasta que los lúmenes de los quistes estuvieron totalmente formados. Se añadieron concentraciones en aumento de R-roscovitina, S-roscovitina y N6-metil-(R)-roscovitina a los cultivos de quistes y se incubaron durante 96 horas. Cada concentración se ensayó en 15 cuadruplicado. Las imágenes de los quistes se tomaron con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 25 con un objetivo de 20x. La inhibición del crecimiento quístico se cuantificó usando el ensayo Alamar Blue (BioSource, Camarillo, CA). La fluorescencia se midió con un lector de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max Gemini, Sunnyvale, CA).

La R-roscovitina (R-Rosc) y la S-roscovitina (S-Rosc) específicamente inhibieron el crecimiento quístico con IC₅₀ de 20 aproximadamente 20 μM y aproximadamente 30 μM respectivamente, mientras que N6-metil-(R)-roscovitina (N6-met-R-Rosc) no mostró ninguna inhibición sustancial (CI₅₀ de 190 μM).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método para tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad quística seleccionada de la enfermedad quística renal adquirida, enfermedad quística asociada con la diálisis, poliquistosis renal autosómica dominante, poliquistosis renal autosómica recesiva, riñón multiquistico congénito, riñón displásico multiquistico, enfermedad renal de estado final, riñón medular en esponja, complejo de nefronoftisis-enfermedad quística medular, complejo de nefronoftisis-enfermedad quística medular urémica, nefronoftisis juvenil, enfermedad quística medular, esclerosis tuberosa y síndrome de von Hippel-Lindau, en donde el compuesto es la 6-bencilamino-2-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina.
- 5
2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto es la 6-bencilamino-2-(R)-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina.
- 10
3. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto es la 6-bencilamino-2-(S)-[(1-etil-2-hidroxi)etilamino]-9-isopropilpurina.
4. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto se va a administrar en una forma de dosificación única.
- 15
5. El compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto se va a administrar en un régimen de dosificación por pulsos, o en donde el compuesto se va a administrar en un régimen de dosificación por pulsos que comprende administrar el compuesto a un sujeto durante tres semanas consecutivas seguido de un periodo de tres semanas sin fármaco; durante dos semanas consecutivas seguido de un periodo de dos semanas sin fármaco; durante 10 días consecutivos seguido de un periodo de 10 días sin fármaco; o durante una semana seguido de un periodo de una semana sin fármaco.
- 20
6. El compuesto para uso en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la enfermedad quística es la enfermedad renal poliquística.
7. El compuesto para uso en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto se va a administrar por vía oral.
- 25