

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 790**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/557** (2006.01)

**A61K 31/5585** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2010 E 10739941 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2461812**

54 Título: **Composición para el tratamiento de la fibrosis quística**

30 Prioridad:

**07.08.2009 EP 09167491**

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

**28.03.2014**

73 Titular/es:

**SciPharm SàRL (100.0%)  
26-28, rue Edward Steichen  
2540 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**FREISSMUTH, MICHAEL;  
KOENIG, XAVER y  
GLOECKEL, CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 451 790 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

Composición para el tratamiento de la fibrosis quística

La presente invención proporciona composiciones que comprenden una prostaciclina o un análogo de las prostaciclinas o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en la prevención o en el tratamiento de la fibrosis quística.

La fibrosis quística (CF) es una enfermedad genética que procede de mutaciones en el gen de 230 kb del cromosoma 7 que codifica un polipéptido de 1480 aminoácidos conocido como el regulador de la conductancia transmembránica de la fibrosis quística (CFTR), el cual sirve como un canal del ion cloruro en las membranas epiteliales. Hasta la fecha se han identificado más de 1000 mutantes alelos. La mutación más común,  $\Delta F508$ , es la supresión de un residuo de fenilalanina en el codón 508 en la proteína reguladora de la conductancia transmembránica de la fibrosis quística (CFTR). Esta mutación da lugar a una grave reducción de la función de CFTR, y conduce al fenotipo clásico de la fibrosis quística caracterizado por anomalía en las funciones de las glándulas exocrinas como concentración elevada de cloruros en el sudor, infección respiratoria recurrente con bronquiectasis e inicio temprano de insuficiencia pancreática.

Clínicamente, se sospecha de CF cuando están presentes en un sujeto uno o más rasgos fenotípicos típicos de la CF. Esto podría ser una enfermedad pulmonar crónica sola o muy a menudo asociada con anomalías gastrointestinales y nutricionales (por ej., insuficiencia pancreática y pancreatitis recurrente), síndromes de pérdida de sales y anomalías urogenitales masculinas (es decir, azoospermia obstructiva). En el pulmón de ser humano, las secreciones tenaces obstruyen las vías respiratorias distales y las glándulas submucosales, las cuales expresan CFTR. La dilatación ductular de estas glándulas (asociada con el bloqueo mediante moco) y el recubrimiento de las superficies de las vías respiratorias por residuos mucopurulentos espesos, viscosos y dominados por los neutrófilos están entre los contrastes patológicos de la enfermedad. La inflamación pulmonar es otra de las causas principales de la disminución de la función respiratoria en sujetos con fibrosis quística y puede preceder el inicio de la infección crónica. El impacto mucinoso y las concreciones espesas dentro de los conductos pancreáticos conducen a fibrosis quística, reemplazamiento graso de la glándula, o ambos, en un gran subgrupo de sujetos con un diagnóstico previo de pancreatitis idiopática o alcohólica.

La fibrosis quística es la enfermedad hereditaria fatal más común en la población caucasiana, que afecta a aproximadamente 4 de cada 10.000 niños. En los Estados Unidos, la edad media de muerte ha aumentado de los 8,4 años de edad en 1969 a los 14,3 años de edad en 1998. La edad media de muerte ha aumentado de los 14 años en 1969 a los 32,4 años de edad en 2003 (Cystic Fibrosis Foundation). Se predice que para niños nacidos en los años 90 del siglo veinte la supervivencia media sea superior a 40 años. Un factor contribuyente principal al aumento significativo de la esperanza de vida es la mejora del tratamiento de las infecciones del tracto respiratorio crónico y la eliminación del moco en sujetos con CF así como la mejor nutrición y un diagnóstico más temprano.

La pérdida de la conductancia aniónica del regulador de la conductancia transmembránica de la fibrosis quística (CFTR) de las membranas apicales del epitelio de las vías respiratorias interrumpe la regulación de la capa líquida de la superficie de las vías respiratorias. Esto conduce a un aclaramiento mucociliar deteriorado, a la infección de las vías respiratorias, y a la característica inflamación de la fibrosis quística (CF). La mutación común  $\Delta F508$  de CFTR está presente en al menos un alelo en > 90% de los pacientes de CF, y > 50% de los pacientes son homocigotos para  $\Delta F508$ , siendo el resto heterocigotos compuestos. Un tema central en la enfermedad CF es la incapacidad de esta variante común de CFTR para lograr el estado nativo, plegado, que saldrá del retículo endoplasmático (ER) y circulará hacia la membrana apical de las células epiteliales.

Si se retarda la adquisición de la conformación nativa, se piensa que CFTR mantiene interacciones excesivas o prolongadas con proteínas chaperonas, las cuales entonces toman como diana a la proteína para su degradación mediante mecanismos que limpian el ER de proteínas malformadas o incompletamente complejadas. La degradación asociada al ER (ERAD) implica ubiquitinación de proteínas aberrantes y su entrega al proteasoma para su digestión. Si ERAD se retrasa detrás de la velocidad de la síntesis de proteínas, o durante el tratamiento con agentes inhibidores del proteasoma, se acumulan agregados de la proteína mutante. CFTR fue la primera proteína integral de la membrana de los mamíferos que se identificó como un sustrato para la degradación mediada por la ubiquitina-proteasoma, y ha servido como un modelo de la creciente lista de enfermedades de la conformación de las proteínas, las cuales justifican una serie diversa de etiologías patológicas. Esencialmente, la totalidad de CFTR  $\Delta F508$  producida mediante la célula es destruida por ERAD. Asimismo, debido a su patrón de plegamiento complejo, 60-70% de la proteína natural (wt) puede degradarse similarmente, aunque esto puede variar entre tipos de células. Los patrones de escisión proteolítica de las formas inmaduras de wt y CFTR  $\Delta F508$  son similares, mientras que el patrón de digestión de CFTR wt maduro es diferente. Este hallazgo apoya el concepto de que al menos una porción de CFTR mutante retenida en ER está presente en una conformación intermedia que se forma a lo largo de la ruta normal de plegamiento de CFTR, en oposición a la formación de una estructura variante de la proteína. Para CFTR  $\Delta F508$ , esta conformación intermedia no puede continuar más allá de una etapa crítica en el proceso de plegamiento, pero esto implica que CFTR  $\Delta F508$  podría ser rescatada si fuera posible para facilitar esta etapa. Una variedad de condiciones experimentales, tales como una menor temperatura, la incubación con proteínas chaperonas químicas, o correctores farmacológicos, puede promover el escape de CFTR  $\Delta F508$  del ER, dando lugar

a un canal de aniones funcional en la superficie celular. Además, los investigadores han informado acerca de la restauración de la función de CFTR  $\Delta F508$  mediante la coexpresión de varios constructos o subdominios parciales de CFTR de CFTR wt. Sin embargo, no es evidente un consenso en cuanto a qué subdominios de CFTR son efectivos en el rescate de la proteína mutante, y el mecanismo de este efecto permanece oscuro. Además, el rescate inducido por fragmentos de CFTR se ha observado principalmente en células que sobreexpresan exógenamente tanto el fragmento de CFTR como CFTR  $\Delta F508$  de longitud completa.

La prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina; epoprostenol, PGI<sub>2</sub>) es un metabolito oxigenado del ácido araquidónico formado enzimáticamente mediante las actividades secuenciales de las enzimas ciclooxigenasa y PGI sintasa. Es producida constitutivamente por las células endoteliales vasculares y las células del músculo liso y es inducida en condiciones inflamatorias en las células vasculares y macrófagos.

PGI<sub>2</sub> es un potente vasodilatador y agente antitrombótico cuyos efectos proceden del enlace al único receptor heptahelical acoplado a proteínas G denominado receptor (IP)<sub>4</sub> de los prostanooides I. Este receptor está acoplado a G<sub>s</sub>, y activa a la adenilato ciclasa, dando lugar a una irrupción aguda de cAMP intracelular. Puesto que la expresión de CFTR y CFTR mutada depende de cAMP, las sustancias las cuales potencian las concentraciones intracelulares de cAMP son de interés para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de CF. Sin embargo, la mayoría de estas sustancias, tales como la forskolina, inducen una elevación bastante no específica de cAMP, lo cual puede también tener efectos muy perjudiciales tales como inflamación. Así, existe una necesidad insatisfecha de potenciadores de cAMP en células epiteliales pulmonares.

La treprostinil es un potente agonista de los receptores IP, aunque su especificidad por este receptor es desconocida. Sprague R.S. et al., 2008, mostraron que los análogos de la prostaciclina (UT-15, remodulina) estimulan la síntesis de cAMP mediada por receptores y la liberación de ATP de eritrocitos de conejo y ser humano.

El documento WO 08/098196 describe el tratamiento de la fibrosis pulmonar usando treprostinil. Sin embargo, la fibrosis pulmonar es una enfermedad pulmonar intersticial que es causada por la acumulación de fibras de colágeno en el pulmón; esto restringe la capacidad del pulmón para inhalar aire: el pulmón pierde su distensibilidad y la resistencia de las vías respiratorias aumenta (distensibilidad = 1/resistencia). Cuando la enfermedad progresa también hay un aumento de la resistencia vascular. El sitio de acción de la treprostinil en la fibrosis pulmonar es la vasculatura y el espacio intersticial en los alveolos.

Tissieres et al., describen estudios usando iloprost para el tratamiento de un paciente con fibrosis quística e hipertensión pulmonar secundaria. Se describe que el iloprost nebulizado fue efectivo en la disminución de la presión arterial pulmonar (The annals of thoracic surgery, vol 78, n° 3, E48-E50).

El documento US2001/006979 A1 describe el uso de derivados de prostaciclina como iloprost o cicaprost para el tratamiento de enfermedades fibróticas.

La fibrosis quística está no relacionada con la fibrosis pulmonar porque es una enfermedad que se origina en el epitelio bronquial. Debido a la ausencia de CFTR, hay demasiado poca agua en el moco que cubre el epitelio bronquial; por consiguiente, los cilios no pueden mover el moco espeso y se interrumpe el aclaramiento mucociliar (el aclaramiento mucociliar trabaja como una cinta transportadora, en la que los cilios golpean rítmicamente de una manera concentrada para hacer retroceder el moco hacia la tráquea y la faringe donde puede ser eliminado tragando o tosiendo, etc.). Si se interrumpe el aclaramiento mucociliar, las bacterias no puede ser eliminadas de los bronquios, los bronquios son colonizados por bacterias y hay ataques repetidos de infecciones pulmonares que destruyen el pulmón. La situación puede remediarse restaurando los flujos de Cl<sup>-</sup> al epitelio bronquial. Así, en la fibrosis quística el sitio de acción es el epitelio de las vías respiratorias de los bronquios. El sitio de acción es anatómicamente distinto (intersticio pulmonar vs vía respiratoria bronquial), implica a una serie diferente de células (fibroblastos, células vasculares del músculo liso, células endoteliales frente a células epiteliales bronquiales absorbentes y secretantes) y presumiblemente también implica a diferentes receptores (receptor de la prostaciclina vs posiblemente receptor EP-2).

Actualmente, no está disponible ningún tratamiento contra la fibrosis quística que mejore significativamente la calidad de vida de los pacientes a lo largo de un periodo más largo. Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar composiciones para el tratamiento que puedan potenciar la expresión de CFTR  $\Delta F508$  y/o la función de los canales del ion cloruro en células epiteliales del pulmón.

### **Corta descripción de la invención**

El objeto de la invención se consigue proporcionando una composición que comprende una prostaciclina o uno de sus análogos, derivados o sales farmacéuticamente aceptables para usar en la prevención o en el tratamiento de la fibrosis quística.

Según una realización específica de la invención, el análogo de la prostaciclina se selecciona del grupo de treprostinil, iloprost, cicaprost o beraprost o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Más específicamente, el derivado de treprostínula puede seleccionarse del grupo de derivados ácidos, profármacos, formas de liberación sostenida, formas inhaladas, formas orales, polimorfos o isómeros de treprostínula.

La composición de la invención puede administrarse por administración intravenosa, inhalación o puede estar en una forma oralmente disponible seleccionada del grupo de comprimidos o cápsulas.

- 5 Específicamente, la composición comprende una cantidad efectiva de treprostínula o su derivado, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en una concentración de al menos 1,0 ng/kg de peso corporal/min.

Además, según la presente invención, también se proporciona el uso de un kit para tratar o prevenir una afección asociada con la fibrosis quística en un sujeto, que comprende: (i) una cantidad efectiva de una prostaciclina o de un análogo o un derivado de una prostaciclina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, específicamente  
10 una sal farmacéuticamente aceptable de treprostínula, (ii) uno o más vehículos y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, y (iii) instrucciones para usar en el tratamiento o prevención de la fibrosis quística.

### Figuras

Fig. 1: Acumulación de cAMP en células IB3-1 después de la incubación con treprostínula.

15 Fig. 2: Activación de una corriente de Cl<sup>-</sup> mediante treprostínula en el linaje celular IB3-1 epitelial bronquial de ser humano que transitoriamente expresa CFTR-wt.

### Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que la prostaciclina o sus análogos o derivados o una de sus sales farmacéuticamente aceptables pueden usarse para tratar la fibrosis quística. Los análogos sintéticos de la prostaciclina pueden ser, por ejemplo, pero limitarse a, treprostínula, iloprost, cisaprost o beraprost.

20 Los derivados adecuados de la prostaciclina incluyen, pero no se limitan a, derivados ácidos, profármacos, formas de liberación sostenida, formas inhaladas o formas orales de treprostínula, iloprost, cisaprost o beraprost.

Puede formarse una sal farmacéuticamente aceptable de una prostaciclina o de un análogo de una prostaciclina de esta invención entre un ácido y un grupo básico del compuesto, tal como un grupo amino funcional, o una base y un grupo ácido del compuesto, tal como un grupo carboxilo funcional. Según otra realización, el compuesto es una sal  
25 de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable.

Específicamente, la treprostínula o su derivado es útil según la invención. La treprostínula puede potenciar exitosamente la expresión de CFTR  $\Delta F508$  y/o la función de los canales del ion cloruro en células epiteliales del pulmón de pacientes con fibrosis quística.

30 Específicamente, las sales fisiológicamente aceptables de treprostínula incluyen sales derivadas de bases. Las sales de bases incluyen sales de amonio (tales como sales de amonio cuaternario), sales de metales alcalinos tales como las de sodio y potasio, sales de metales alcalino térreos tales como las de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como dicitclohexilamina y N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina y lisina.

Sorprendentemente, se ha mostrado que una prostaciclina o análogo o derivado de la misma conduce a la estimulación de la producción de cAMP en células broncoepiteliales. Este modo de acción podría ser vía la activación inducida del receptor IP. Interesantemente, el inhibidor de la fosfodiesterasa (inhibidor PDE3), anagrelida,  
35 no indujo ninguna acumulación de cAMP en experimentos.

Dada su capacidad para estimular la producción de cAMP por medio del receptor IP, y la limitada presencia de receptores IP a un pequeño número de tipos de célula (tales como las células epiteliales pulmonares), una prostaciclina o uno de sus análogos, por ejemplo la treprostínula o uno de sus derivados o sales podría inducir la expresión y activación periódica de CFTR y mutCFTR de una manera específica que puede usarse para el  
40 tratamiento de CF.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición que comprende una prostaciclina o un análogo de una prostaciclina, específicamente treprostínula o su derivado, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en el tratamiento de la fibrosis quística así como en terapias de fibrosis quística usando una  
45 prostaciclina o un análogo de una prostaciclina, específicamente treprostínula o su derivado, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La treprostínula es un análogo sintético de la prostaciclina. La treprostínula se comercializa como Remodulin<sup>TM</sup>. La treprostínula es una sal monosódica del ácido (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-hexahidro-2-hidroxi-1-[(3S)-3-hidroxiocetil]-1H-benz[f]inden-5-il]oxi]acético.

50 Según la invención, los derivados de treprostínula pueden ser, por ejemplo, derivados ácidos de treprostínula, profármacos de treprostínula, formas de liberación sostenida de treprostínula, formas inhaladas de treprostínula, formas orales de treprostínula, polimorfos de treprostínula o isómeros de treprostínula.

La composición de la invención puede estar presente en cualquier forma que pueda usarse para administrar.

La composición de la invención puede administrarse como líquido o polvo. Puede administrarse tópicamente, intravenosamente, subcutáneamente, por inhalación o usando un nebulizador o en una forma oralmente disponible como comprimidos o cápsulas. Debido a la alta estabilidad metabólica de algunos análogos de prostaciclina como treprostinila, o si se proporcionan como formas pegiladas o basadas en lípidos de las prostaciclina o de los análogos de las prostaciclina, las sustancias también pueden administrarse como medicamentos de depósito.

La administración en forma de aerosol del análogo de la prostaciclina puede dar lugar a una distribución más homogénea del agente en un pulmón para que se consiga la administración profunda en el pulmón. De este modo, la dosificación de la aplicación podría reducirse a la presencia sostenida del agente en el sitio de acción en el pulmón.

La composición puede administrarse con cualquier sustancia o vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable como se sabe en la técnica. Estas pueden ser, por ejemplo, pero no están restringidas a, agua, agentes neutralizantes como NaOH, KOH, estabilizantes, DMSO, disolución salina, betaína, taurina, etc.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" quiere decir aprobada por una agencia reguladora del Gobierno Federal o del Estado o listada en la U.S.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, compuestos auxiliar, excipiente o vehículo con el cual se administra la composición farmacéutica. Como vehículos líquidos también pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y semejantes. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. La formulación debe seleccionarse según el modo de administración.

La treprostinila es de alta estabilidad metabólica, lo cual permite específica treprostinilamente la administración por varias rutas.

La cantidad de la composición de la invención puede ser seleccionada por un experto, preferiblemente la cantidad de las prostaciclina o de los análogos de las prostaciclina o de sus sales farmacéuticamente aceptables, específicamente de treprostinila, es al menos 1,0 ng/kg de peso corporal/min.

Los ejemplos descritos en la presente memoria son ilustrativos de la presente invención y no se pretende que sean limitaciones de la misma.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Se extendieron células IB3-1 en placas de 6 pocillos ( $0,2 \times 10^6$  células/pocillo) en medio de crecimiento completo (LHC-8 + FCS al 5%). El día siguiente, el pozo de adenina nucleótido se marcó metabólicamente por incubación con [ $^3$ H]adenina (1  $\mu$ Ci/pocillo) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía adenosina desaminasa (1 unidad/mL) durante 4 h. La formación de AMP cíclico fue estimulada mediante 20  $\mu$ M de forskolina o el análogo PGI2 de treprostinila (Remodulin®). El ensayo se realizó por triplicado. La formación de [ $^3$ H]cAMP se determinó por cromatografía secuencial en columnas Dowex 50WX-4 y de alúmina neutra seguido por recuento por centelleo líquido del eluido.

La treprostinila provocó una acumulación dependiente de la concentración de cAMP en células IB3-1 (Fig. 1). La estimulación igual a la mitad de la máxima se vió en el intervalo de 0,3 a 1  $\mu$ M.

### Ejemplo 2

Las células IB3-1 sólo expresan endógenamente CFTR- $\Delta$ F508 mutada, que es retenida dentro de las células. Usando manipulaciones apropiadas (por ej., farmacochaperones o incubaciones a baja temperatura) es posible translocar el CFTR  $\Delta$ F508 mutante del retículo endoplasmático al ER; cuando se inserta en la superficie celular, elevando cAMP puede estimularse la conductancia de los iones Cl<sup>-</sup>. Sin embargo, la conductancia de los iones Cl<sup>-</sup> resultante es pequeña. Con el fin de probar inequívocamente que la acumulación de cAMP inducida por la treprostinila se tradujo en una activación de CFTR, los presentes inventores expresaron una versión de CFTR tipo natural etiquetada con GFP (la etiqueta de GFP permitía la identificación de células que expresaban la proteína en la superficie celular). Como puede verse en la Fig. 2, la treprostinila provocó una activación robusta de la corriente inducida mediante una despolarización desde un potencial de mantenimiento de -40 mV a +60 mV. El efecto máximo se retrasó, es decir sólo se observó varios días después del lavado del compuesto. Asimismo, también hubo histéresis en la reacción de apagado; la corriente disminuyó al nivel basal sólo ~ 100 s después del lavado. Estas respuestas retrasadas reflejan la (i) cascada de transmisión de señales que interviene (es decir, la activación dependiente del receptor de Gs, la activación dependiente de G $\alpha_s$  de la formación de cAMP y la consiguiente

fosforilación de CFTR dependiente de la proteína quinasa A), y (ii) la desactivación retrasada de cAMP acrecentada mediante fosfodiesterasas. También se vieron similares retrasos si las células se estimularon con forskolina, un activador directo de la adenil ciclasa, que se usó como testigo positivo. Estas observaciones prueban que la treprostínica puede activar a CFTR en células epiteliales bronquiales.

## 5 Métodos

### Electrofisiología

Se usó la técnica de pinza de parche y célula completa para los registros de corriente realizados a  $22 \pm 1,5^\circ\text{C}$  usando un amplificador de pinza de parche Axoclamp 200B (Axon Instrumentss). Las pipetas tuvieron resistencias entre 1 y 2  $\text{M}\Omega$  cuando se llenaron con la disolución de la pipeta de registro (composición: CsCl 110 mM, EGTA 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{K}_2\text{ATP}$  1 mM, Hepes 10 mM, pH ajustado a 7,2 con CsOH). Los protocolos voltaje-pinza y la adquisición de datos se realizaron con el paquete informático pclamp 6.0 (Axon Instruments). Los datos fueron filtrados por un filtro de paso bajo a 2 kHz (-3 dB) y se digitalizaron a 10-20 kHz. Las células se superfusionaron continuamente con una disolución externa (composición: NaCl 145 mM, KCl 4,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, glucosa 5 mM, Hepes 10 mM, pH ajustado a 7,4 con NaOH). Cuando estaba indicado, la disolución externa contenía treprostínica (10  $\mu\text{M}$ ) o forskolina (5  $\mu\text{M}$ ), el cambio entre disoluciones se logró mediante válvulas de presión controladas electrónicamente.

### Cultivo celular

Se hicieron crecer células I3B-1 en placas (Nunc, 3,5 cm de diámetro) cubiertas con fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), colágeno I de rata (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y BSA 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio LHC-8 (Gibco) que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 5%. Las células se transfectaron transitoriamente con un plásmido que dirigía la expresión de CFTR tipo natural etiquetada con GFP de ser humano usando Lipofectamina plus® (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Se registraron amplitudes de corriente representativas en la configuración de pinza de parche y célula completa a +60 mV. Se seleccionó bajo luz fluorescente una célula IB3-1 transitoriamente transfectada que expresaba CFTR tipo natural etiquetada con GFP y se pinzó a un potencial de mantenimiento de -40 mV. Se indujo la despolarización mediante una etapa de voltaje a +60 mV durante 50 ms y se registró la amplitud de la corriente. Se inició el lavado de treprostínica (concentración final 10  $\mu\text{M}$ , TP) en el momento 50 s y se terminó a 125 s. La forskolina se lavó a 275 s y se separó a 375 s. Los resultados se muestran en la figura 2.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende prostaciclina o un análogo o un derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para usar en la prevención o el tratamiento de la fibrosis quística, donde dicho análogo de la prostaciclina se selecciona del grupo de treprostínila, iloprost, cisaprost o beraprost o derivados o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
2. Composición para uso según la reivindicación 1, donde dicho derivado se selecciona del grupo de derivados ácidos de treprostínila, profármacos de treprostínila, formas de liberación sostenida de treprostínila, formas inhaladas de treprostínila, polimorfos de treprostínila o isómeros de treprostínila.
3. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para administración intravenosa.
- 10 4. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para inhalación.
5. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicha composición está en una forma oralmente disponible seleccionada del grupo de comprimidos o cápsulas.
- 15 6. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la cantidad efectiva de treprostínila o su derivado, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables es al menos 1,0 ng/kg de peso corporal/min.

Fig. 1

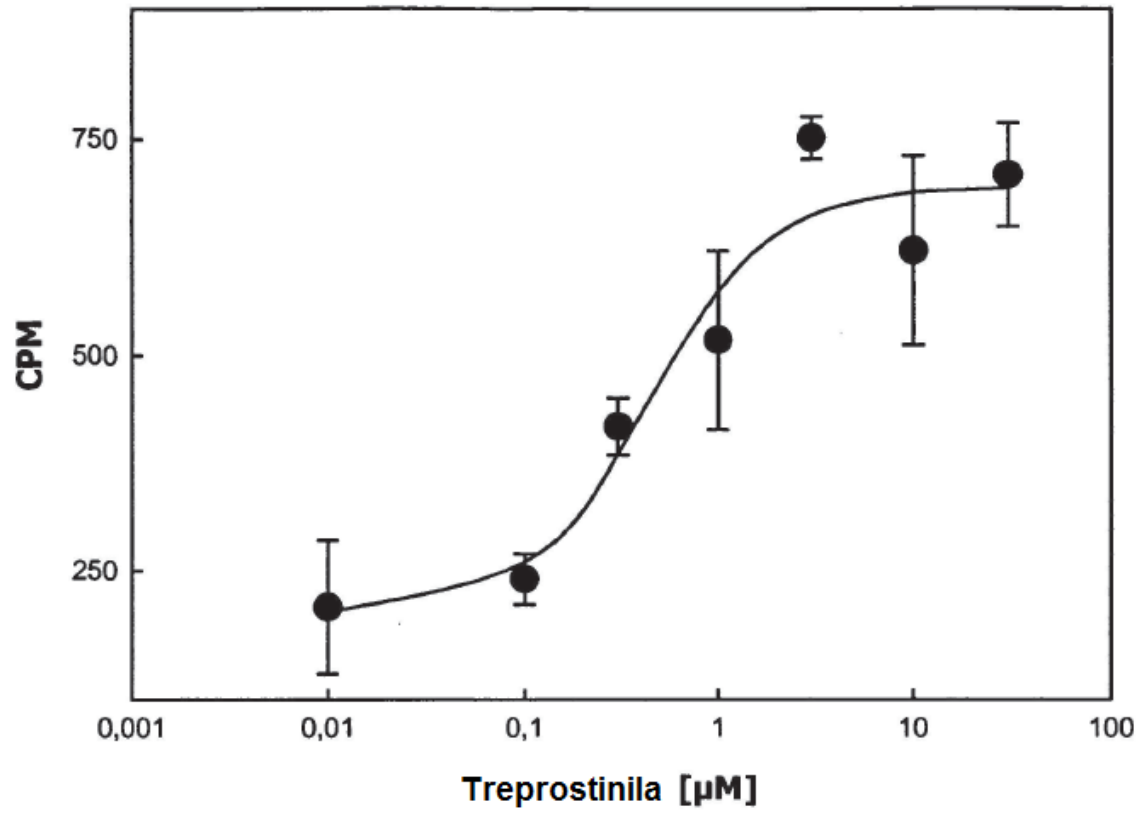




Fig. 2

