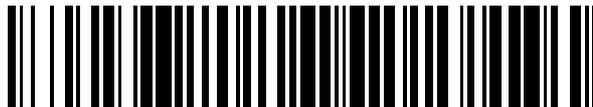


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 779**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2005 E 05804720 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 1802310**

54 Título: **Utilización de derivados de purinas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis y de enfermedades relacionadas con un defecto de direccionamiento de las proteínas en las células**

30 Prioridad:

15.10.2004 FR 0410958

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

31.03.2015

73 Titular/es:

**MANROS THERAPEUTICS (100.0%)
Lieudit Presqu'île de Perharidy
29680 Roscoff, FR**

72 Inventor/es:

**BECQ, FRÉDÉRIC y
MEIJER, LAURENT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 532 779 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

Utilización de derivados de purinas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis y de enfermedades relacionadas con un defecto de direccionamiento de las proteínas en las células.

5 La invención se refiere a la utilización de derivados de purinas para fabricar medicamentos capaces de restaurar el direccionamiento de proteínas desde el retículo endoplasmático hasta las membranas plasmáticas. Particularmente, la invención se refiere al tratamiento de la mucoviscidosis.

10 El artículo titulado "Pharmacological interventions for the correction of ion transport defect in cystic fibrosis", Expert Opinion on Therapeutic Patents 2004 United Kingdom, vol. 14, nº 10, 2004, páginas 1465-1483 de Becq *et al.* y el artículo titulado "Stimulation by alkylxanthines of chloride efflux in CFPAC-1 cells does not involve A1 adenosine receptors", Biochemistry, American Chemical Society, Easton, PA, US, vol. 34, nº 28, 18 de julio de 1995, páginas 9088-9094 de Jacobson K. A. *et al.*, divulgan unos derivados de xantina pero para una aplicación en el tratamiento de la mucoviscidosis pero no divulgan derivados de purinas según la presente invención.

15 La mucoviscidosis (CF: Fibrosis Cística) es la enfermedad genética recesiva, autosómica, letal, la más extendida en las poblaciones europeas y norteamericanas. El gen CF (locus 7q31) codifica para la proteína transmembrana denominada CFTR (por Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Unas mutaciones del gen CF provocan un transporte anormal de agua y de electrolitos a través de las membranas celulares de diversos órganos como los pulmones, las glándulas sudoríparas, el intestino y el páncreas exocrino. Aunque existen más de 1000 mutaciones de la proteína CFTR, la mutación más frecuente (70% de los pacientes) es la delección de una fenilalanina en el dominio NBF1 en posición 508 (delF508). La principal causa de mortalidad de los pacientes CF está ligada a esta delección y conduce a infecciones o a una insuficiencia pulmonar, provocadas por un aumento de la viscosidad del mucus. Esta viscosidad provoca la oclusión de las vías respiratorias y favorece las infecciones por parte de bacterias oportunistas. Se puede constatar además un empeoramiento a nivel digestivo y en particular pancreático (paciente con insuficiencia pancreática). La proteína CFTR es una glicoproteína de 1480 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de transportadores de membrana ABC. La CFTR es un canal cloruro localizado en la membrana plasmática apical de las células epiteliales pulmonares en individuos sanos.

20 La CFTR es responsable del transporte transepitelial de agua y de electrolitos y permite la hidratación de las vías aéreas pulmonares en un individuo sano.

25 En los pacientes CF, homocigotos para la mutación delF508, y de forma más general, para las mutaciones de clase II (mutaciones que producen una proteína ausente en la membrana celular), esta proteína está ausente en las membranas plasmáticas debido a un mal direccionamiento de dicha proteína, que es retenida en el retículo endoplasmático (RE). En este caso, la hidratación de las vías aéreas pulmonares ya no es funcional. La delección delF508 perturba el plegamiento del dominio NBF1 e impide la maduración completa de la proteína que por lo tanto se degrada muy pronto durante su biosíntesis. Sin embargo, si la proteína delF508 alcanza la membrana, dicha proteína funciona como un canal cloruro.

30 Una de las claves de un tratamiento de esta enfermedad consiste por lo tanto en un redireccionamiento de delF508 hacia la membrana plasmática de las células a nivel de la cual la actividad de transporte de delF508 puede ser estimulada mediante agonistas fisiológicos.

35 De forma sorprendente, los inventores han puesto en evidencia que unos derivados conocidos en particular por su efecto antiproliferativo, eran capaces de activar el CFTR salvaje y formas mutadas y de provocar una relocalización membranaria de la proteína delF508-CFTR restaurando de este modo su capacidad de transporte transmembranario. De manera general, estos derivados son capaces de restaurar un defecto de direccionamiento de las proteínas dentro de las células.

40 Además, estos compuestos presentan la ventaja de una gran inocuidad.

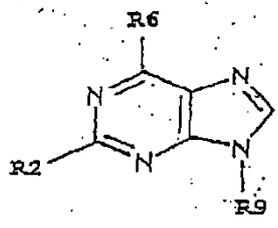
45 Se describe una nueva utilización de estos derivados para fabricar medicamentos para el tratamiento de la mucoviscidosis y de enfermedades relacionadas con un defecto de direccionamiento de las proteínas en las células.

50 Los derivados utilizados son purinas sustituidas en posiciones 2, 6 y 9.

55 Se han descrito derivados de este tipo en tanto que inhibidores de quinasas.

60 En particular, tales derivados están descritos en el documento de patente FR 2 741 881 y en los documentos de patente y las solicitudes de patente correspondientes a WO 97/20842, o en el artículo de Vesely *et al.*, 1994, Eur. J. Biochem., 224, 771-786 II, no entrando la 2-(2-hidroxietanolamino)-6-bencilamino-9-metilpurina, denominada comúnmente olomucina, dentro del campo de la invención,

65 En particular, se describen unos derivados que responden a la fórmula I



en la que

- 5
- R2, R6 y R9, idénticos o diferentes los unos de los otros, representan un átomo halógeno, un radical R-NH-, R-NH-NH-, NH₂-R'-NH- o R-NH-R'-NH-, en el que R representa un radical alquilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un radical arilo o cicloalquilo, o un heterociclo, y R' un grupo alcoileno de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, o un grupo arileno o cicloalcoileno, comprendiendo R y R' de 1 a 8 átomos de carbono cada uno, y siendo sustituidos, llegado el caso, por uno o varios grupos -OH, halógeno, amino o alquilo,
 - pudiendo R2 representar, entre otros, un heterociclo que lleva, llegado el caso, una radical alquilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un radical arilo o cicloarilo, o un heterociclo, eventualmente sustituido por uno o varios grupos -OH, halógeno, amino o alquilo,
 - pudiendo R9 representar, entre otros, un radical alquilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, un radical arilo o cicloalquilo,
 - pudiendo R2 y R9 representar, entre otros, un átomo de hidrógeno, con la excepción de la olomucina.

En particular, se describe la utilización de derivados de fórmula I arriba mencionada, en la que

25 R2 se selecciona de entre los radicales 3-hidroxiopropilamino, 1-etil-2-hidroxiethylamino, 5-hidroxiopentilamino, 1-D,L-hidroxiethylpropilamino, aminoethylamino, 2-bis(hidroxiethyl)amino, 2-hidroxiopropilamino, 2-hidroxiethylamino, cloro, R-hidroxiethyl-pirrolidinilo, bencilaminohidroxiethyl, R,S-aminohidroxiethyl, S-amino-2-fenilhidroxiethyl, R-amino-3-fenilhidroxiopropilo, R,S-aminohidroxiopentilo, R-aminohidroxiopropilo, S-aminohidroxiopropilo R(-)N-pirrolidina hidroxiethyl,

30 R9 se selecciona de entre metilo, isopropilo o ciclopentilo, y

R6 se selecciona de entre

- 35
- bencilamino, 3-iodo-bencilamino, o isopentenilamino, cuando R9 representa una radical isopropilo,
 - ciclohexilamino, ciclometilamino, o 3-hidroxiethylbencilamino, cuando R9 representa un radical metilo, y
 - bencilamino, cuando R9 representa un radical ciclopentilo.

Estos derivados corresponden a los isómeros ópticos y a las mezclas racémicas, llegado el caso a los isómeros geométricos.

40 En particular, la invención se refiere a la utilización de la 2-(R,S) (1-etil-2-hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina o de la 2-(R)-(1-etil-2-hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina, o aún de la 2-(S)-(1-etil-2-hidroxiethylamino)-6-bencilamino-9-isopropilpurina, en el tratamiento de la mucoviscidosis.

45 Dichos derivados de purinas son capaces de restaurar el direccionamiento de la proteína CFTR hacia las membranas plasmáticas de las células y constituyen por lo tanto unos compuestos de gran interés para el tratamiento de la mucoviscidosis.

50 Tal como se ilustra en los ejemplos, estos compuestos son particularmente eficaces para provocar la relocalización membranaria de la proteína del F508-CFTR en la mucoviscidosis, en la cual la proteína es retenida en el retículo endoplasmático, y para restaurar de este modo su capacidad de transporte transmembranario.

55 En la elaboración de los medicamentos, los principios activos, utilizados en cantidades terapéuticamente eficaces, se mezclan con los vehículos farmacéuticamente aceptables para el modo de administración elegido. Estos vehículos pueden ser sólidos o líquidos.

Así, para una administración por vía oral, los medicamentos se preparan en forma de pastillas, comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, gotas, jarabes y análogos. Tales medicamentos pueden contener de 1 a 100 mg de

principio activo por unidad.

Para la administración por vía inyectable (intravenosa, subcutánea, intramuscular), los medicamentos se presentan en forma de soluciones estériles o esterilizables. Pueden estar asimismo en forma de suspensiones o de emulsiones.

Los medicamentos de la invención se administran más particularmente en forma de aerosoles.

Las dosis por unidad de toma pueden variar de 1 a 50 mg de principio activo. La posología diaria se elige de modo que se obtenga una concentración final de como máximo 100 μM de derivado de purinas en la sangre del paciente tratado.

Otras características y ventajas de la invención se presentaran en los resultados mostrados a continuación con el fin de ilustrar la invención.

En estos ejemplos, se hace referencia a las figuras 1 a 6, que representan:

- la figura 1: el efecto de la roscovitina sobre el direccionamiento de ΔF508 en las células CF15 (1A); sobre la actividad de CFTR en las células Calu-3 (1B); sobre el direccionamiento de CFTR en las células Calu-3 (1C);
- la figura 2: los resultados de inmunoprecipitación y de análisis Western-Blot;
- las figuras 3A a 3C: la inmunolocalización de ΔF508 -CFTR después de 2h de tratamiento o sin tratamiento;
- las figuras 4A y 4B: la activación de ΔF508 en las células CF15 después de tratamiento con CFTR-T1 (designando CFTR-T1 la roscovitina) y la respuesta a la roscovitina en función del tiempo de incubación;
- las figuras 5A y 5B: el porcentaje de activación en función de la concentración de roscovitina y el perfil farmacológico de los canales CFTR en las células CF15 después de la incubación con roscovitina;
- la figura 6: la competencia entre CFTR-T1 y la maquinaria de la chaperona del RE sobre el direccionamiento de ΔF508 -CFTR.

Material y métodos

M1. Cultivo celular

Células CHO-WT: Las células CHO (Ovario de Hámster Chino) son unos fibroblastos que se han transfectado con el gen de la CFTR salvaje (CFTR-WT). Por lo tanto estas células van a sobreexpresar la proteína CFTR.

Medio de cultivo: Medio MEM alfa (GIBCO) + 7% de suero fetal bovino + 0,5% de penicilina/estreptomicina + 100 μM de metotrexato (ametofterina, Sigma).

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

Medio de cultivo: Medio DMEM + HAM F12 + 10% de FCS + 0,6% de penicilina/estreptomicina + factores de crecimiento (insulina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, transferrina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, epinefrina 5,5 μM , adenina 0,18 mM, EGF 10 ng/ml, T3 2 nM, hidrocortisona 1,1 μM).

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

Medio de cultivo: Medio DMEM/F12 con glutamax + 7% de suero fetal bovino + 1% de penicilina/estreptomicina.

M2. Inmunomarcaje

El inmunomarcaje permite visualizar la localización celular de la proteína CFTR gracias a un anticuerpo (Ac) primario anti-CFTR, y a continuación a un anticuerpo secundario al anticuerpo primario marcado con fluoróforo Cy3.

Las células se siembran previamente sobre unos cubreobjetos en un medio de cultivo adecuado. Se realizan 3 lavados con TBS (NaCl: 157 mM, Tris base: 20 μM , pH 7,4) de 5 min cada uno. Las células se fijan entonces, mediante adición de TBS-paraformaldehído (3%) durante 20 min. Después de 3 lavados con TBS (5 min), las células se incuban con TBS-Triton 0,1% (10 min) que permite la formación de agujeros en la membrana celular, a continuación se realizan de nuevo 3 lavados con TBS antes de poner en contacto las células con el TBS-BSA 0,5%-saponina 0,05% durante 1 h. A continuación las células se incuban con el anticuerpo primario anti-C terminal CFTR

(2 µg/ml) durante 1 h. Se realizan 3 lavados con TBS-BSA-saponina de 5 min cada uno antes de la incubación con el anticuerpo secundario GAM-cy3 (1/400) durante 1 h. Después de 2 lavados con TBS de 5 min, los núcleos se marcan mediante incubación con Topro3 (1/1000) durante 5 min. Por último, los cubreobjetos se pueden montar sobre un portaobjetos después de 3 últimos lavados con TBS de 5 min. Los portaobjetos se observan en el microscopio confocal (Bio-Rad) mediante una excitación por láser con unas longitudes de onda adecuadas. Con el fin de diferenciar el marcaje entre Cy3 y Topro3, el color de fluorescencia de Topro3 se modifica a azul (color de los núcleos).

M3. Flujo de salida de radiotrazadores

Las mediciones de transporte de iones cloruro dentro de las células se han realizado por medio de la técnica de los flujos de salida de yoduro radioactivo (Becq *et al.*, 1999; Dormer *et al.*, 2001). El trazador (^{125}I) se incorpora al medio intracelular. A continuación, se mide la cantidad de radiotrazador que sale de la célula después de la adición de diferentes agentes farmacológicos. El yoduro se utiliza como un trazador del transporte de iones cloruro. ^{125}I presenta, además, la ventaja de tener una vida útil corta comparada con la de otros marcadores como ^{35}Cl (1/2 vida respectivamente 30 días y 300000 años).

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

M4. Prueba de citotoxicidad

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

Resultados

R1. Efecto de la roscovitina sobre el direccionamiento de delF508 en las células CF15

El estudio del direccionamiento de la proteína delF508-CFTR se realiza en el laboratorio combinando enfoques de farmacología, de tratamiento de imágenes celulares, de pruebas bioquímicas y electrofisiológicas sobre unas células CF15 epiteliales humanas pulmonares homocigotas para la delección delF508.

Los resultados de inmunoprecipitación y de análisis Western-Blot de CFTR no mutado de células CHO de tipo salvaje y de células delF508 tratadas 2 h con 100 µM de compuesto probado (figura 3C) o de células no tratadas (control). Las células CF15 tratadas 24 h a 27°C (figura 3B) o 2 h con 10 µM de taspigargina (TG) se utilizaron como

control positivo.

En cada experimento, la adición de un cóctel (Forskolina 10 μM + Genisteína 30 μM) permite la activación del CFTR cuando éste está localizado en la membrana. De este modo, se podrá observar un flujo de salida de yoduro si se ha restaurado el direccionamiento de delF508. Los resultados, que se presentan en forma de diagrama de barras, han sido normalizados con respecto a un tratamiento de referencia (tratamiento de las células con MPB-91 250 μM durante 2 h) para el cual se considera que se tiene un 100% de actividad CFTR. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento mediante las dos formas R y S de la roscovitina, de las células CF15 durante 2 h a 37°C restaura un direccionamiento de la proteína delF508 y permite que ésta funcione como un transportador iónico (figura 1).

En ausencia de tratamiento de las células, la proteína delF508 no es membranaria y no hay flujo de salida de yoduro estimulado por el cóctel (Forskolina 10 μM + Genisteína 30 μM). El EC_{50} (concentración de la molécula que provoca un 50% de la eficacia máxima) de la roscovitina se ha determinado en $34 \pm 1,9 \mu\text{M}$ (R-Roscovitina, figura 1A, C) y $32 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (S-Roscovitina, figura 1B, C) (n=4, para cada condición). Las imágenes celulares permiten mostrar que la proteína delF508 ha sido localizada en los compartimentos membranarios plasmáticos después de un tratamiento con roscovitina.

Las figuras 3A y 3C ilustran asimismo la inmunolocalización de delF508-CFTR después de 2 h de tratamiento con roscovitina o en ausencia de tratamiento. Se trata de una visualización confocal de CFTR-delF508 en células CF15 con un anticuerpo monoclonal anti-CFTR de rata. Las células CF15 tratadas 24 h a 27°C se han utilizado como control positivo (figura 3A).

La figura 4A ilustra la activación de delF508-CFTR en las células CF15 después de un tratamiento con roscovitina.

Los flujos de salida de yoduro se observaron después de 2 h de incubación con 100 μM de compuesto probado o en ausencia de tratamiento.

Las células CF15 tratadas 24 h a 27°C se utilizaron como control positivo y las células CF15 no tratadas como control negativo (37°C).

La figura 4B muestra que la respuesta a la roscovitina depende del tiempo de incubación. Se utilizaron 100 μM de roscovitina para tratar las células CF15. Las células fueron estimuladas con 10 μM fsk + 30 μM gst.

La figura 5A muestra los resultados dosis-respuesta después de 2 h de tratamiento con roscovitina. En la figura 5B, se presentan los perfiles farmacológicos de los canales CFTR en las células CF15 después de 2 h de incubación con 100 μM de roscovitina.

Estos resultados muestran que después del tratamiento con roscovitina, se observa:

- una maduración de delF508-CFTR (véase la banda C que aparece en el Western-Blot) después de un tratamiento con CFTR-T1,
- una corrección de la localización de delF508-CFTR a nivel de la membrana plasmática, y
- una corrección máxima de la función de canal de cloruro de delF508-CFTR después de 2 h de tratamiento.

La competencia entre CFTR-T1 y la maquinaria de la chaperona del RE se ilustran en las figuras 6A y 6B. La figura 6A trata sobre la inhibición de la acción de CFTR-T1 por parte de Brefeldina A (BFA), inhibidor del tráfico vesicular ERGIC, lo cual muestra que la roscovitina induce un redireccionamiento de la proteína delF508-CFTR. La figura 6B muestra que no se observa ninguna modulación en presencia de MG132, un inhibidor de proteosoma, lo cual muestra una competencia entre la roscovitina y MG132.

La tabla mostrada a continuación presenta un resumen de experimentos de competencia realizados mediante la técnica de flujo de salida de yoduro entre la roscovitina y la maquinaria de la chaperona del RE:

	BFA 20 μ M	Tunicamicina 10 μ M	Swainsonina 100 μ M	Castanospermina 100 μ g/l	Thapsigargina 10 μ M	MG132 20 μ M	Geldanamicina 2,5 μ g/ml
Potencialización del efecto CFTR-T1	-	**	**	*	*	ns	ns
		Inhibidores de glicosilación		Inhibidores de calnexina		Vía de degradación de los inhibidores	

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

5 Estos resultados muestran que la roscovitina induce un redireccionamiento de delF508-CFTR, inhibe la vía de degradación de CFTR-T1 y puede modular la interacción entre CFTR-T1 y la calnexina (mecanismo dependiente de calcio).

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

10 Con el fin de mostrar que el efecto de la roscovitina es específico del direccionamiento del delF508 y no altera los otros canales de cloruro, la roscovitina ha sido probada como activador potencial sobre células Calu-3. Estos resultados han sido obtenidos en flujo de salida de yoduro sobre células Calu-3. Los controles utilizados son la forskolina (5 μ M, n=8) y el MPB-91 (250 μ M, n=8) la roscovitina (n=8) no es un activador del CFTR salvaje ni de otros transportes aniónicos de estas células (no hay diferencia significativa).

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

20 Con el fin de mostrar que el efecto de la roscovitina es específico del direccionamiento del delF508, la roscovitina ha sido probada en tanto que modulador del direccionamiento del CFTR salvaje sobre células Calu-3. Estos resultados han sido obtenidos en flujo de salida de yoduro sobre células Calu-3 tratadas 2 h con roscovitina (100 μ M). La actividad CFTR en esta condición experimental no es significativamente diferente con respecto a los controles. Estos resultados demuestran que la roscovitina no afecta a la vía de direccionamiento del CFTR salvaje o de otros canales de cloruro, ni altera la actividad de CFTR en las células epiteliales humanas pulmonares no-CF.

R4. Citotoxicidad de la roscovitina

30 Con el objetivo de probar la citotoxicidad de la roscovitina, se incubaron unas células CHO-WT 2 h con diferentes concentraciones de inhibidores antes de ser sometidas a la prueba de viabilidad celular con MTT. Los resultados muestran que las células son viables para todas las concentraciones de roscovitina. Por lo tanto esta molécula no presenta ninguna citotoxicidad celular.

35 Las pruebas de flujo de salida han revelado que la roscovitina permite una relocalización membranaria de la proteína delF508-CFTR y representa pues, un medio farmacológico de redireccionamiento del delF508 en una célula epitelial humana pulmonar.

40 Un tratamiento de 2 h con 100 μ M de roscovitina provoca la aparición de una banda madura del CFTR (como lo muestran las técnicas de inmunoprecipitación y de western-blot) que indica que la roscovitina ha permitido la liberación del RE, y a continuación la maduración en el Golgi de la proteína delF508-CFTR. Unos experimentos de inmunofluorescencia han confirmado que un tratamiento de 2h con 100 μ M de roscovitina permitía la relocalización membranaria de la proteína delF508-CFTR. Finalmente, unos experimentos de flujo de salida de yoduro y de técnica de fijación de membrana sobre célula entera pusieron de manifiesto la funcionalidad de la proteína redireccionada. El tratamiento con roscovitina presenta una EC50 de 56 μ M para 2 h de tratamiento y permite un redireccionamiento máximo después de 2 h.

45 Por otro lado, unos experimentos de competencia con el objetivo de determinar el mecanismo de acción de la roscovitina han permitido demostrar que la roscovitina entraba en competencia con los inhibidores de la unión calnexina/delF508-CFTR así como con los inhibidores de la vía de degradación.

50 Estos diferentes resultados permiten evidenciar que la roscovitina corrige el defecto de direccionamiento de la proteína delF508-CFTR. Un tratamiento con roscovitina de células CF debe entonces permitir interferir con la capacidad que posee la maquinaria de control de interaccionar y retener la proteína delF508-CFTR en el retículo endoplasmático, esto mediante una inhibición de la calnexina y de las moléculas chaperonas que intervienen en la vía de degradación.

Ejemplo de formulación

Se prepara una solución para inhalación con un nebulizador ampolla a partir de cloruro de sodio, de cloruro de calcio deshidratado y de agua para preparaciones inyectables.

5

Se añade la roscovitina como ingrediente activo.

La solución se formula en ampollas de 2,5 ml.

10

De esta forma se preparan unas ampollas que contienen 5, 10 mg o 20 mg de roscovitina.

Bibliografía

BECQ *et al.* (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 27415-27425.

15

DORMER *et al.* (2001) *Journal of Cell Science* 114, 4073-4081.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Derivados de purinas para su utilización en el tratamiento de la mucoviscidosis, caracterizados por que dichos derivados se seleccionan de entre la 2-(R, S)-(1-etil-2-hidroxiethylamino)-6-benzilamino-9- isopropilpurina, la 2-(R)-(1-etil-2-hidroxiethylamino)-6-benzilamino-9-isopropilpurina y la 2-(S)-(1-etil-2-hidroxiethylamino)-6-benzilamino-9-isopropilpurina.
- 10 2. Derivados para su utilización según la reivindicación 1, caracterizados por que los derivados son utilizados para fabricar unos medicamentos preparados para una administración en forma de pastillas, comprimidos, grageas, cápsulas, gotas o jarabes.
3. Derivados para su utilización según la reivindicación 1, caracterizados por que los derivados son utilizados para fabricar unos medicamentos preparados para su administración por vía inyectable, en forma de solución.
- 15 4. Derivados para su utilización según la reivindicación 1, caracterizados por que los derivados son utilizados para fabricar unos medicamentos preparados para su administración en forma de aerosol.

Figura 1

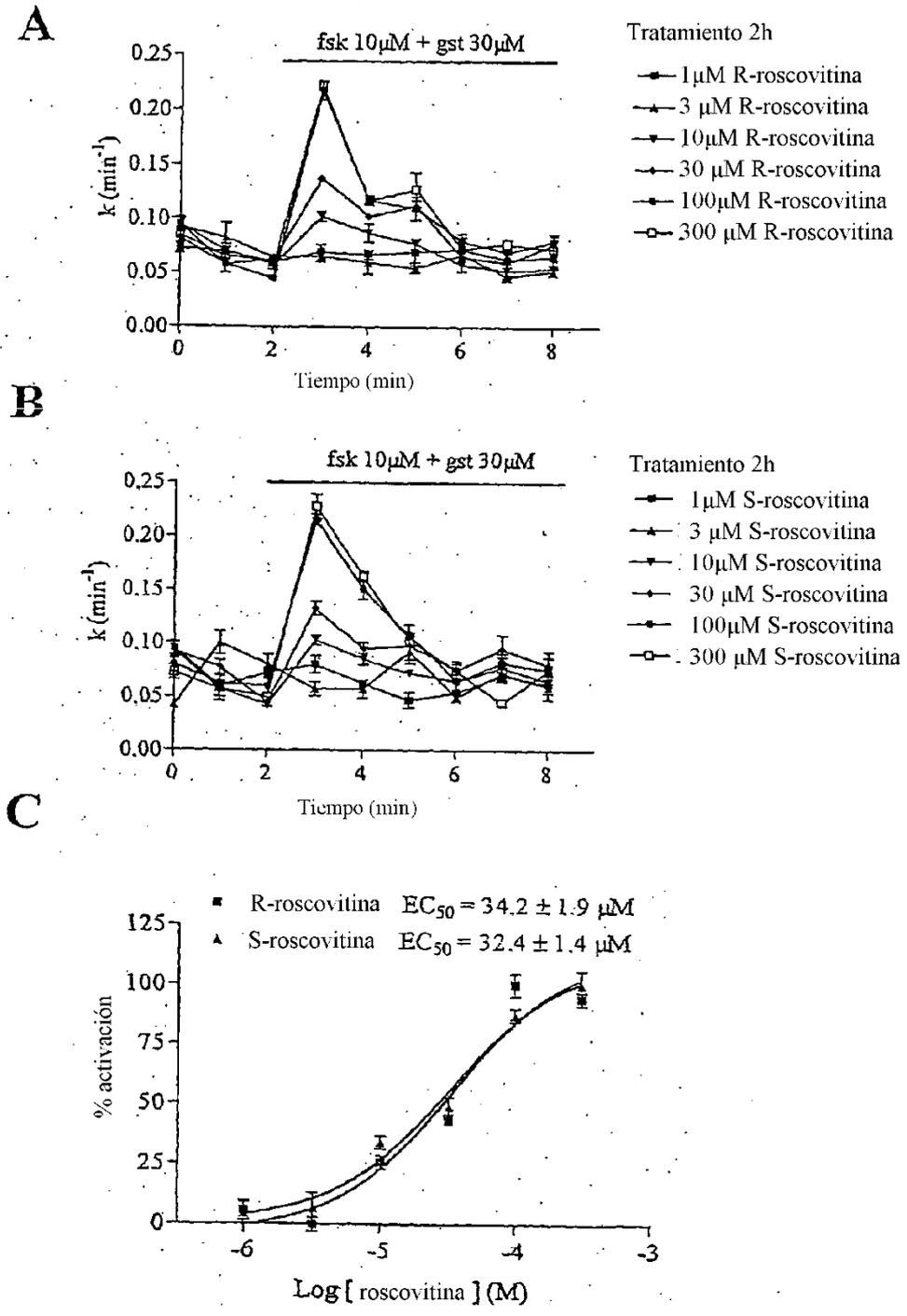


Figura 2

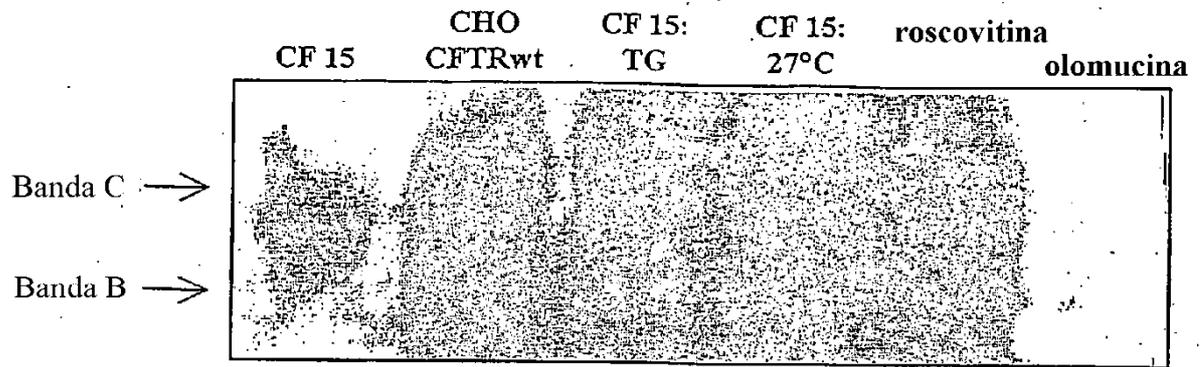


Figura 3

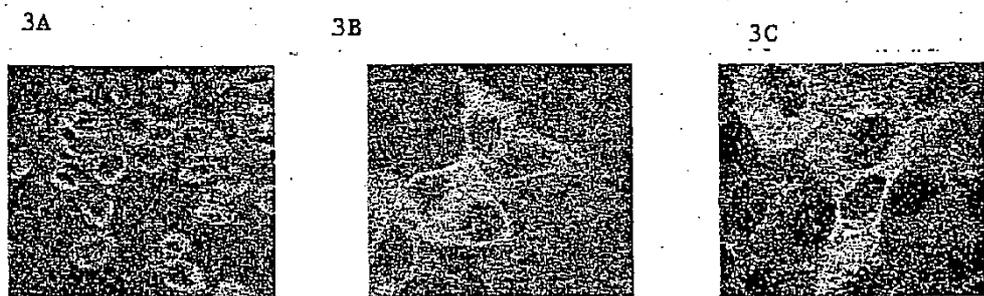


Figura 4

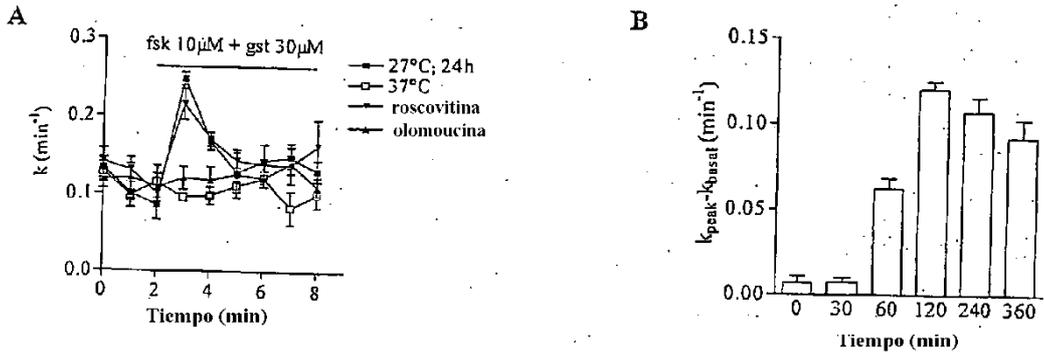


Figura 5

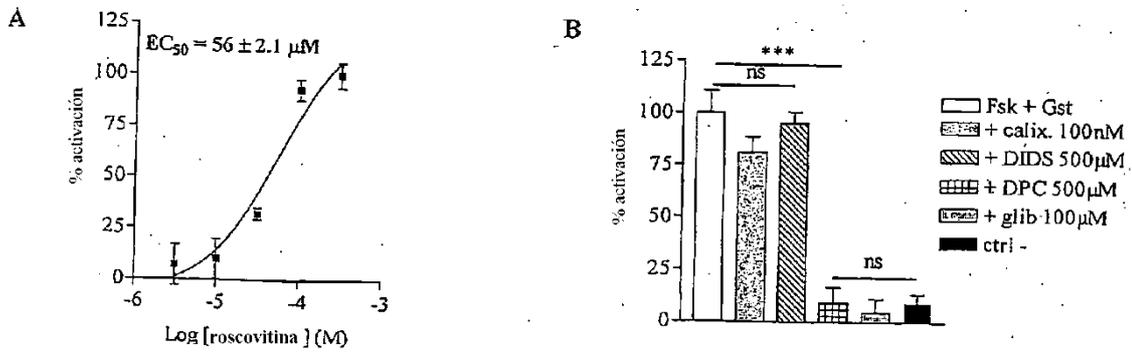


Figura 6

