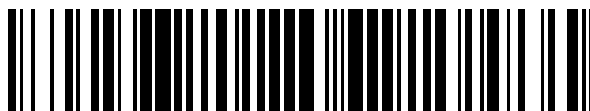


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 628**

51 Int. Cl.:

C07D 219/10 (2006.01)
C07D 473/30 (2006.01)
C07F 9/30 (2006.01)
C07C 233/65 (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 473/22 (2006.01)
C07C 235/84 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2011 E 11736202 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2616444**

54 Título: **Compuestos como moduladores de una proteína CFTR mutante y su uso para el tratamiento de enfermedades asociadas con el mal funcionamiento de la proteína CFTR**

30 Prioridad:

14.09.2010 PL 39239610 P
14.09.2010 PL 39239710 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2015

73 Titular/es:

INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN (100.0%)
Ul. Pawinskiego 5A
02-106 Warszawa, PL

72 Inventor/es:

ODOLCZYK, NORBERT;
ZIELENKIEWICZ, PIOTR;
WIECZOREK, GRZEGORZ;
EDELMAN, ALEKSANDER;
TONDELIER, DANIELLE y
FRITSCH, JANINE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 553 628 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

Compuestos como moduladores de una proteína CFTR mutante y su uso para el tratamiento de enfermedades asociadas con el mal funcionamiento de la proteína CFTR

5 La presente invención se refiere a nuevos moduladores de proteínas capaces de alterar la función de la proteína CFTR mutante y su uso para tratar enfermedades asociadas con el mal funcionamiento de la proteína CFTR. La invención proporciona composiciones, preparaciones farmacéuticas y procedimientos de corrección de la alteración celular de una proteína CFTR mutante donde la mutación es una mutación $\Delta F508$ -CFTR, u otra mutación de la clase II.

10 La fibrosis quística (también conocida como FQ o mucoviscidosis) es una de las enfermedades genéticas más comunes, fatales en humanos. La FQ es una enfermedad genética autosómica recesiva hereditaria que afecta aproximadamente a 1 niño de cada 2.500 nacidos vivos (1). La FQ está causada por mutaciones en el *gen cftr* que codifica el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (proteína CFTR, por sus siglas en inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) con actividad como un canal de iones cloruro epitelial (2, 3). Como resultado de la alteración de la función de esta proteína aparecen síntomas graves asociados con los sistemas respiratorio y digestivo y reproductor masculino (4). Hasta la fecha, se han identificado y descrito más de 1600 mutaciones en el *gen CFTR* (5).

20 Las mutaciones del *gen CFTR* se clasificaron en cinco clases basadas en los mecanismos moleculares que conducen al mal funcionamiento de la proteína CFTR (6,7). Las mutaciones de clase I contribuyen a la formación de las proteínas de longitud incompleta y por lo general implican la pérdida completa de su actividad (por ejemplo, G542X). La mutación en la clase II que conduce a la maduración anormal de las proteínas en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático. El efecto de estas mutaciones es la degradación prematura de la proteína. Por lo tanto, la CFTR no llega a la membrana celular donde debe realizar su función (por ejemplo, $\Delta F508$, $\Delta I507$, S549R) (8). El producto génico que tiene mutaciones de clase III se sintetiza, transportan e incorporan en la membrana celular de forma adecuada, pero tiene una actividad disminuida a causa de una regulación anormal de la proteína.

25 Estas mutaciones se encuentran frecuentemente dentro de uno de los dominios de unión de nucleótidos (por ejemplo, G551D/S). Las mutaciones de clase IV causan anomalías en la estructura de la proteína transmembrana y reducen de este modo la conducción de los canales de cloruro (por ejemplo, R117H, R334W). Las mutaciones que alteran la estabilidad del ARNm representan una clase V de las mutaciones del *gen CFTR* (3849+10kbC->T,5T).

30 La mutación más prevalente presente en al menos un alelo en aproximadamente el 90 % de los pacientes (9) es una delección de fenilalanina en la posición 508 de la secuencia de aminoácidos de CFTR ($\Delta F508$ CFTR). Este es un ejemplo clásico de mutación de clase II que provoca una degradación prematura de la proteína (8, 10). Esta mutación se asocia con alteraciones de electrolitos-agua (entre otros, con salida de anión cloruro fuera de una célula a través de la membrana plasmática (11) y el movimiento de iones de sodio dentro de la célula (12)) y da como resultado la aparición de síntomas patológicos. Algunos de los síntomas más graves incluyen congestión y aumento de la viscosidad del moco en las vías respiratorias superiores e inferiores que conducen a daños en los pulmones. Estas condiciones crean un ambiente favorable para el desarrollo de infecciones bacterianas causadas, por ejemplo, por *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte, el mal funcionamiento de la proteína CFTR conduce a la obstrucción de los conductos pancreáticos exocrinos y trastornos digestivos relacionados (13).

40 La CFTR es una glicoproteína con 1480 aminoácidos y clasificada como transportador ABC (casete de unión a ATP). La proteína se compone de cinco dominios. Hay dos dominios de unión de nucleótidos (NBD1 y NBD2), dominio de regulación (RD) y dos dominios transmembrana (TMD1 y TMD2). La actividad de la proteína está regulada por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) que cataliza la fosforilación del dominio regulador (RD) y también por la unión de dos moléculas de ATP a los dominios NBD1 y NBD2 (14).

45 La invención descrita en la solicitud de patente WO2007075901 (publ. 2007-07-05) se refiere a profármacos de moduladores de transportadores ABC, en particular, a moduladores de CFTR, a composiciones de los mismos, y a procedimientos con los mismos. La invención también se refiere a procedimientos de tratamiento de enfermedades causadas por el transportador de ABC usando dichos moduladores.

50 En una publicación WO2005120497 (documento US20080319008), se describen compuestos que aumentan la actividad (transporte de iones) de una proteína CFTR mutante, y usos de los mismos. La invención también proporciona composiciones, preparaciones farmacéuticas y procedimientos de aumento de la actividad de transporte de iones de una proteína CFTR mutante, es decir, $\Delta F508$ CFTR, G551D-CFTR, G1349D-CFTR o D1152H-CFTR, que son útiles en el tratamiento de la fibrosis quística (FQ). Las composiciones y preparaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más compuestos que contienen fenilglicina o compuestos que contienen sulfonamida o un análogo o derivados de los mismos.

55 En una publicación WO2009051910, se describen compuestos que aumentan la actividad de transporte de iones de una proteína CFTR mutante, y usos de los mismos. La invención proporciona composiciones, preparaciones farmacéuticas y procedimientos para aumentar la actividad de una CFTR mutante. Las preparaciones de composiciones farmacéuticas y procedimientos son útiles para el estudio y el tratamiento de trastornos asociados

con la CFTR mutante, tales como fibrosis quística. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más compuestos que contienen fenilglicina o un análogo o derivados de los mismos.

5 La solicitud de patente US5948814 describe el uso del compuesto de genisteína para el tratamiento de la FQ. Se describe un procedimiento de tratamiento de la fibrosis quística mediante la generación de la función de CFTR en las células que contienen CFTR mutante y la composición terapéutica para el tratamiento. El procedimiento de tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz de genisteína, o análogos y derivados de genisteína, a un paciente aquejado de fibrosis quística.

10 En la solicitud de patente US20040006127 se describe el procedimiento para la activación del cloruro. La fluoresceína y derivados tienen uso en el tratamiento de una enfermedad de un cuerpo animal vivo, incluyendo el ser humano, en el que la enfermedad es sensible a la activación de los canales de cloruro de CFTR, por ejemplo fibrosis quística, bronquiectasia diseminada, infecciones pulmonares, pancreatitis crónica, infertilidad masculina y síndrome del QT largo.

15 En una publicación WO2006101740 (documento US20080318984) se describen compuestos para la corrección de la alteración celular de una proteína CFTR mutante, y usos de los mismos. La invención proporciona composiciones, preparaciones farmacéuticas y procedimientos para corregir el procesamiento celular de una proteína mutante CFTR (por ejemplo, $\Delta F508$ CFTR) que son útiles para el tratamiento de la fibrosis quística. Las composiciones y preparaciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más compuestos que contienen aminobenzotiazol, compuestos que contienen aminoariltiazol, compuestos que contienen quinazolinilaminopirimidinona, compuestos que contienen bisaminometilbitiazol o compuestos que contienen fenilaminoquinolina, o un análogo o derivado de la misma.

20 En una publicación WO2009051909, se describen compuestos que mejoran la alternación celular de una proteína CFTR mutante, y usos de los mismos. La invención proporciona composiciones, preparaciones farmacéuticas y procedimientos para aumentar la actividad de una CFTR mutante. Las preparaciones de composiciones farmacéuticas y procedimientos son útiles para el estudio y el tratamiento de trastornos asociados con la CFTR mutante, tales como fibrosis quística. Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más compuestos que contienen bitiazol de la invención o un análogo o derivado de los mismos.

La fenilalanina 508 en la proteína CFTR se encuentra la superficie del dominio NBD1 de CFTR.

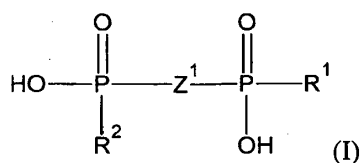
30 Los estudios estructurales y biofísicos actuales revelan ausencia de diferencias significativas entre la proteína de dominio salvaje y el dominio mutante $\Delta F508$ que pueden afectar a la cinética de plegamiento y a la estabilidad termodinámica de la proteína CFTR. Las estructuras cristalinas resueltas de ambos dominios solo muestran ligeras diferencias en la reorganización de los aminoácidos situados cerca del lugar, que deben estar ocupados por F508 (10).

35 El propósito de esta invención es proporcionar composiciones, preparaciones farmacéuticas y procedimientos de corregir el procesamiento celular de la proteína CFTR mutante. La delección de F508 tiene un efecto mínimo sobre la estructura del dominio NBD1 como se ha observado en los resultados de rayos X y no puede explicar la diferencia espectacular en el comportamiento de las formas mutantes y nativas de la proteína CFTR en la célula. Para los fines de la presente invención, los datos estructurales de ambas formas de proteína se sometieron a simulación por ordenador diseñado para determinar las propiedades dinámicas de NBD1. En la presente invención, se han utilizado los procedimientos de dinámica molecular. Este procedimiento se basa en un cálculo iterativo de las interacciones entre los átomos que forman el sistema simulado y la solución de ecuaciones de movimiento (15). Estas simulaciones (por ambas formas estudiadas de NBD1) tienen como resultado grupos de estructuras que pueden ser adoptadas por la proteína diana de acuerdo con los supuestos físicos iniciales, las llamadas trayectorias.

45 Basándose en el análisis de la dinámica de trayectorias moleculares de los dos dominios fue posible aislar una conformación de la proteína mutante, que difiere significativamente de los estados conformacionales adoptadas por la proteína salvaje. La conformación posee los dos bolsillos principales en la superficie de la proteína situada a ambos lados del sitio de unión a ATP. La estructura de la proteína en esta conformación se utilizó para desarrollar compuestos para la corrección de la actividad de $\Delta F508$ -CFTR.

50 La realización del propósito de la invención y la solución de los problemas asociados con los compuestos realmente utilizados para el tratamiento de la fibrosis quística, como se han descrito en la técnica anterior, se han logrado en la presente invención con la mayor eficiencia del proceso.

La materia objeto de invención es un compuesto de fórmula general (I):

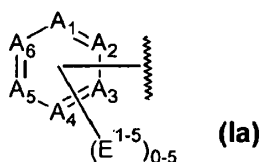


5 sus tautómeros, los isómeros geométricos E y Z, las formas ópticamente activas tales como enantiómeros, diastereómeros y sus formas racemato o una mezcla de formas estereoisoméricas o sus sales farmacéuticamente aceptables de los mismos o complejos de los mismos; en la que Z¹ se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

-C_nH_(2n)-, que está ramificado o no ramificado en el que n es un número entero de 1 a 5; -C_nH_(2n-2)- en E o Z conformación geométrica que está ramificada o no ramificada en la que n es un número entero de 2 a 5; -C_nH_(2n-4)- que está ramificada o no ramificada en la que n es un número entero de 2 a 5; -CR'H-, -C₂H₃R'-, E o Z -C₂HR'-, -C₃H₅R'-, E or Z -C₃H₃R'-, -OCH₂-, -CH₂O-, NR''CH₂-, -CH₂NR''-; en los que R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en: -H, halógeno, -NH₂, -OH, -CN, CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -SH, -SCN, -CH₃, -C₂H₅; en el que R'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en: -H, -CH₃, -C₂H₅; en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en anillo aromático o anillo heteroaromático,

como un modulador de una proteína CFTR mutante para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística.

15 Preferentemente, R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo de la subfórmula (Ia):



en la que A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆ se selecciona independientemente átomos de N o de C en el que el anillo contiene 0-3 átomos de nitrógeno;

en la que E¹, E², E³, E⁴, E⁵ representa sustituyentes opcionales, que se seleccionan de: -OR_B, -OC(=O)R_C, -OC(=O)OR_B, -OC(=O)N(R_A)R_A' , -C(=O)R_C, -C(=O)N(R_A)R_A' , -C(=O)N(OR_B)R_A, -C(=O)OR_B, -C(=S)R_C, -C(=O)C(=O)R_C, -CH₂OR_B, -CH₂CH₂OR_B, -CH₂N(R_A)R_A' , -CH₂CH₂N(R_A)R_A' , -CH₂OCH₂R_C, -CH₂N(R_A)CH₂R_C, -SR_D, -S(=O)R_D, -SO₂R_D, -SO₂N(R_A)R_A' , -SO₃R_B, -N(R_A)C(=O)R_C, -N(R_A)C(=O)OR_B, -N(R_A)C(=O)N(R_A')R_A' , -N(R_A)SO₂R_D, -N(R_A)SO₂N(R_A')R_A' , -N(R_A)R_A' , -N(R_A)C(=O)R_C, -N(R_A)C(=O)OR_B, -N(R_A)N(R_A')R_A' , -N(R_A')N(R_A)C(=O)R_C, -NO₂, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -NH₂, -SCN, -SO₂CN, -F, Cl, -Br, -I, -PO₃H₂, -OPO₃H₂, -C_nH_{2n}R_C que está ramificado o no ramificado en el que n es un número entero de 1 a 5; -C_nH_(2n-2)R_C en la conformación geométrica E o Z que está ramificada o no ramificada

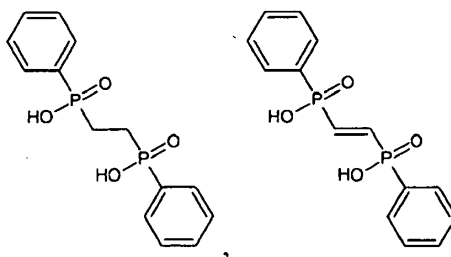
en la que n es un número entero de 2 a 5; -C_nH_(2n-4)R_C que está ramificado o no ramificado, en el que n es un número entero de 2 a 5; en la que R_A, R_A' , R_A'' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en: -H, grupo de alquilo inferior, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -OH;

en la que R_B se selecciona del grupo que consiste en: -H, grupo de alquilo inferior, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂I;

en la que R_C se selecciona del grupo que consiste en: -H, grupo de alquilo inferior, -CN, -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂I, -F, -Cl, -Br, -I, -NH₂,

en la que R_D se selecciona del grupo que consiste en: -H, grupo alquilo inferior;

35 Preferentemente, estando dicho compuesto representado por las siguientes estructuras:



Preferentemente, tiene efecto sobre la proteína CFTR mutante, en la que dicha mutación CFTR es una mutación ΔF508-CFTR u otra mutación de la clase II y en la que una mutación ΔF508-CFTR, u otra mutación de clase II están implicadas en el mal funcionamiento de la proteína CFTR. Preferentemente, la enfermedad asociada con el mal funcionamiento de la proteína CFTR es fibrosis quística.

El siguiente objeto de invención es un modulador de acuerdo con lo anterior, para uso en el tratamiento de la fibrosis quística en el que tiene efecto sobre el transporte de iones dependiente de CFTR a través de la membrana celular y / o que tiene la capacidad de aumentar el número de proteínas CFTR mutantes que llegan a la superficie de la célula.

- 5 Preferentemente, para uso en el tratamiento de la fibrosis quística en el que tiene un efecto estabilizador sobre la estructura de la proteína CFTR mutante y / o bloquea la interacción con las proteínas celulares responsables de la degradación prematura de la CFTR mutante.

Preferentemente, para uso en el tratamiento de la fibrosis quística en la que tiene efecto sobre la proteína CFTR mutante, en la que dicha mutación CFTR es una mutación $\Delta F508$ -CFTR, u otra mutación de la clase II.

- 10 La presente invención se ilustra en los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1

- Los efectos de diferentes compuestos sobre la salida de yoduro a $1\mu\text{M}$ en las células HeLa $\Delta F508$ -CFTR. (a) gráfico de barras que muestra las amplitudes máximas de las salidas de yoduro dependientes de Fsk/Gsk en las células tratadas por los diferentes fármacos como en A. Los valores son la media de 3 experimentos independientes. $*p<0,05$, $**p<0,01$. (b) estructuras químicas de correctores activos identificados in silico (c) ejemplos de curvas de la salida de yoduro obtenidos en células HeLa transfectadas de forma estable con $\Delta F508$ -CFTR y tratadas durante 24 horas con $10\mu\text{M}$ con diferentes compuestos. La respuesta dependiente de CFTR se indujo con forskolina $10\mu\text{M}$ (FSK) + genisteína (GSK) $30\mu\text{M}$ como se indica mediante la barra horizontal por encima de los trazos. (d) se determinó la CE_{50} para compuestos activos deL bolsillo 2: 407882 and 73100 y uno deL bolsillo1: 130813, para 118208 la CE_{50} no pudo determinarse con precisión, ya que no se alcanzó la salida máximo de yoduro incluso a $100\mu\text{M}$ (también se muestra).

Figura 2

- Para analizar si los compuestos presentaban actividad potenciadora independiente de su efecto sobre el tránsito de CFTR, los inventores investigaron el flujo de salida de yoduro en células WT-CFTR HeLa no tratadas. Los compuestos se añadieron junto con forskolina y sus efectos se compararon con los de forskolina sola o forskolina más genisteína. A diferencia de la genisteína, todas las moléculas analizadas indujeron un flujo de salida de I⁻ mayor que el de la forskolina sola.

Figura 3

- La potenciación también se ensayó en células HeLa $\Delta F508$ -CFTR tratadas durante 2 horas con miglustat para rescatar $\Delta F508$ -CFTR. El flujo de salida de I⁻ se estimuló con forskolina, sola, con forskolina más genisteína o con forskolina más los diferentes compuestos. Como se muestra en la figura, sólo la genisteína fue capaz de aumentar el flujo de salida, lo que demuestra la ausencia de actividad de potenciación de los medicamentos de los inventores.

Figura 4

- 35 Impacto de correctores identificados sobre la maduración de $\Delta F508$ -CFTR y la localización celular.

- (a) Efectos de diferentes compuestos sobre el procesamiento de CFTR. Inmunotransferencias representativas de las proteínas WT-CFTR y $\Delta F508$ -CFTR de las proteínas de las células HeLa tratadas con $1\mu\text{M}$ de los diferentes compuestos durante 24 horas con Mab 24-1. Se indican las posiciones de las formas maduras (banda C) e inmaduras (banda B) de CFTR.
 40 (b) Comparación de la intensidad relativa (C / B + C) para WT-CFTR, $\Delta F508$ -CFTR sola y $\Delta F508$ -CFTR después de la corrección con las moléculas de los inventores.
 (c) Efectos de los diferentes compuestos utilizados a $1\mu\text{M}$ sobre la localización de CFTR. Imagen confocal que muestra la localización de la membrana plasmática de WT-CFTR y la localización intracelular de $\Delta F508$ -CFTR. El efecto de los fármacos se ilustra en paneles c a f. Barras: $20\mu\text{M}$. Las flechas indican tinción de CFTR en la membrana plasmática.

Figura 5

Efecto sinérgico de compuestos activos sobre el flujo de salida de yoduro analizado a $1\mu\text{M}$.

- (a) la salida de yoduro en respuesta a forskolina $1\mu\text{M}$ (FSK) + genisteína (GSK) $30\mu\text{M}$ como se indica mediante la barra horizontal por encima de los trazos, para las células tratadas durante 24 horas con los compuestos analizados solos y en combinación del siguiente modo (a) 407882, 118208, (b) 118 208, 73100 gráfico (c) 407 882, 37173. (d) gráficos de barras que muestra las amplitudes máximas de los flujos de salida de yoduro dependientes de Fsk / GST en las células tratadas por los diferentes fármacos como en. Los valores son la media de 3 experimentos independientes. $*p<0,05$, $**p<0,01$.

Figura 6

- 55 (a) / (b) relación corriente-voltaje de las corrientes de cloruro dependientes de AMPc en células HeLa tratadas con los compuestos 407 882 (12) más 118 208 (6) a $1\mu\text{M}$.

Figura 7

Los efectos de los diferentes compuestos sobre el flujo de salida de yoduro a 1 μ M en una línea celular epitelial serosa derivada de células (CF-4KM) de un paciente de FQ Δ F508. La dependencia de la concentración se ha demostrado para la molécula más potente 407882

- 5 Para una mejor comprensión de la invención, los ejemplos de la materia sujeto de la invención se divulgan a continuación.

Ejemplos**Materiales y procedimientos****Anticuerpos**

- 10 Se usaron los anticuerpos siguientes: MAB25031 (clon 24-1, R&D systems, EE.UU.) y MM13-4 (Upstate,) anticuerpos monoclonales (mAb) para detección de CFTR; los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa 594 y 488 se adquirieron de Molecular Probes (Cergy Pontoise, Francia)

Cultivo celular

- 15 Las células HeLa transfectadas de forma estable (con el plásmido pTracer solo como control (pTracer) o que expresan WT-CFTR (spTCF-WT), Δ F508-CFTR s(pTCF-F508del) fueron proporcionados por Pascale Fanen (Inserm U.468, Créteil, Francia) y cultivadas como se describe en otro lugar (16). Brevemente, las células HeLa se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con FCS al 10 % inactivado con calor, 100 U / ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina y 250 μ g/ ml de ceocina. Los cultivos se realizaron en un incubador humidificado a 37 °C en 5 % de CO₂. La expresión de WT-CFTR y Δ F508-CFTR en estas células se verificó
20 mediante inmunoprecipitación e inmunocitoquímica a lo largo del estudio. Los tratamientos con diferentes moléculas (a 1 y 10 μ M) y el vehículo se realizaron cuando las células alcanzaron 75 % de confluencia.

La línea celular CF-KM4, obtenida mediante transformación de los cultivos primarios de células serosas de la glándula traqueal de FQ homocigotas para la mutación Δ F508 utilizando el virus SV40 de tipo salvaje, se cultivaron como se ha descrito en otra parte (17).

25 Experimentos de inmunotransferencia

- Las células cultivadas en matraces de 75 cm² se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo, se rasparon en 2 ml de PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 min. Los sedimentos se suspendieron en 300 μ l de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 1 % de Triton X-100, 1 % de Na desoxicolato, 0,1 % de SDS, pH 7,5) a 4 °C durante 30 min con agitación. Después de centrifugación a 15.000 g durante 30 min, los sobrenadantes se procesaron para los
30 experimentos de inmunotransferencia como se ha descrito previamente (18) con ligeras modificaciones.

- Las muestras se resolvieron mediante 8 % de SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se realizó el análisis siguiendo las recomendaciones del fabricante para el sistema de imágenes de infrarrojos Odyssey (LI-COR Biosciences, NE, EE.UU.). Las membranas de la transferencia se bloquearon con tampón de Odyssey (ScienceTec, Paris, France) durante 1 hora y se hibridaron usando el anti CFTR Mab24-1 monoclonal (1/1000). Las proteínas se
35 visualizaron mediante incubación con anticuerpos secundarios (1/10000) y se detectaron utilizando la técnica de ECL (19).

Tinción de inmunofluorescencia

- Las células HeLa cultivadas en cubreobjetos de vidrio se trataron como anteriormente y como se describe en Lipecka y col., (20). Las células se fijaron con formaldehído al 4 % y se permeabilizaron con 0,1 % de Triton en PBS.
40 Las células se bloquearon con 1 % de seroalbúmina bovina en PBS / Triton y se incubaron a 4 °C durante la noche con los anticuerpos primarios, 24-1 (1: 300). Después de lavar y bloquear con 5 % de suero de cabra normal, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios. Los cubreobjetos de vidrio se montan utilizando el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) y se analizaron mediante microscopia láser confocal (Zeiss, LSM 510).

Experimentos del flujo de salida de yoduro

- 45 La actividad de los canales de cloruro CFTR se analizó midiendo el flujo de salida de yoduro (¹²⁵I) de células CHO transfectadas como se ha descrito previamente (21). Las células cultivadas durante 4 días en placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con 2 ml de solución de sal de Earle modificada que contiene NaCl 137 mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄ 0,4 mM, MgCl₂ 0,8 mM, CaCl₂ 1,8 mM, glucosa 5,5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4. Las células se incubaron a continuación en el mismo medio que contiene 1 mM de KI (1 mCi de Na¹²⁵I/ml, NEN Life Science Products)
50 durante 30 min a 37 °C. Después del lavado, las células se incubaron con 1 ml de solución de sal de Earle modificada. Después de 1 min, se retiró el medio para el recuento y fue reemplazado rápidamente por 1 ml del mismo medio. Este procedimiento se repitió cada 1 min durante 8 minutos. Las tres primeras partes alicuotas se usaron para establecer un valor basal estable en el flujo de salida en tampón solo. El medio que contenía el cóctel

dirigido a aumentar el AMPc intracelular forskolina 10 μ M y 30 μ M genisteína) se utilizó para las próximas alícuotas para activar los canales de cloruro CFTR. Al final de la incubación, el medio se recuperó y las células se solubilizaron en NaOH 1 N. La radiactividad se determinó utilizando un contador G (LKB). La cantidad total de 125 I (en cpm a tiempo 0 se calculó como la suma de cpm contadas en cada muestra de 1 min más las cpm en la fracción de NaOH. La fracción de 125 I intracelular inicial perdida durante cada punto de tiempo se determinó y las tasas de flujo de salida de 125 I dependientes del tiempo se calcularon de acuerdo con Becq y col., (22) de

$$\ln(^{125}_{It_1}/^{125}_{It_2})/(t_1 - t_2),$$

en la que

125 It es el 125 I intracelular a tiempo t ;

y t_1 y t_2 son los puntos de tiempo sucesivos.

Las curvas se construyeron representando la tasa del flujo de salida de 125 I en función del tiempo. Los datos se presentan como la media \pm S.E. de n experimentos separados.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas utilizando la prueba t de Student cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

15 Registros de fijación de voltaje en células enteras

La técnica para los registros de fijación de voltaje en la configuración de célula entera se ha descrito en otra parte (23,24). Las células transfectadas se sembraron de forma estable en placas Petri de plástico de 35 mm de cultivo celular que se montaron en la etapa de un microscopio invertido. Los experimentos de fijación de voltaje se realizaron a temperatura ambiente con un amplificador Axopatch 200A controlado por un ordenador a través de una interfaz digitada 1440 (AXON Instruments, EE.UU.). Las pipetas se sacaron de vidrio duro (Kimax 51) con un extractor micropipeta Setter y su punta se pulió con fuego. Los registros de corriente realizaron utilizando la configuración de fijación de voltaje perforado con nistatina. La solución madre de nistatina (50 mg / ml) se preparó a diario en DMSO. La solución madre se diluyó (1: 250) en la solución interna que después se sometió a ultrasonidos durante 1 minuto. La solución interna contenía lo siguiente (en mM) 131 NaCl, 2 MgCl₂ y 10 Hepes-Na⁺, pH 7,3, ajustado con NaOH. La solución de baño contenía (en mM): 150 NaCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 35 sacarosa y 10 Hepes-Na⁺, pH 7,3, ajustado con NaOH.

Las corrientes se registraron mediante la aplicación de pulsos de voltaje regulares de 60 mV de amplitud durante 1 segundo, a partir de un potencial de retención de de 0 mV, con un intervalo de 3 segundos.

Para establecer curvas I-V, pulsos regulares de tensión se interrumpieron por la serie de 9 saltos de tensión (de 1 segundo de duración cada uno), hacia los potenciales de membrana entre -100 y +80 mV. Las corrientes de Cl⁻ CFTR se activaron con 200 μ M de la sal de sodio de 8-(4-clorofenil)-AMPc (CPT-AMPc) más 100 μ M de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX).

Cuando se alcanzó la máxima estimulación, las células se bañaron con 5 μ M del de CFTR específico, CFTR_{inh}-172, añadido a la solución de CPT-AMPc. Las corrientes de CFTR se definieron como las diferencias en las amplitudes de corriente registradas durante la estimulación máxima con CPT-AMPc y después de la inhibición por CFTR_{inh}-172.

Mediciones de la diferencia de potencial nasal (NPD)

Se adoptó el procedimiento de medición de potencial nasal y se miniaturizó a partir de la técnica desarrollada por los inventores para niños pequeños (25). Se anestesió a ratones mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (133 mg / kg; IMALGENE 1000, MERIAL, Francia) y xilazina (13,3 mg / kg; Rompun al 2 %, BayerPharma, Francia). Se colocó a los ratones en un tablero con inclinación de 45 ° y se colocó una almohadilla de papel debajo de la nariz para evitar sofocar a los ratones. Una aguja subcutánea estaba conectado a un electrodo de referencia de Ag⁺/AgCl por un puente de agar. Un catéter de polietileno de doble lumen (0,5 mm de diámetro) se insertó en una fosa nasal a 4 mm de profundidad. En una luz se perfundió una solución de Ringer (en mM: 140 NaCl, 6 KCl, 10 Hepes, 10 Glucosa, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, pH ajustado a 7,4 con NaOH) a 0,15 mL/h está conectado a un electrodo de Ag⁺/AgCl de medición. Los dos electrodos de Ag⁺/AgCl se conectaron a un voltímetro de alta impedancia (LOGAN Research Ltd, Reino Unido). En la segunda luz se perfundió una solución con la siguiente secuencia: (1) solución de Ringer, (2) solución de Ringer contiene amilorida (inhibidor de la conductancia de Na⁺, 100 μ M), solución de Ringer baja en cloruro (3), para desenmascarar las conductancias de Cl⁻ (en mM: 140 gluconato sódico, 6 K gluconato, 10 Hepes, 10 Glucosa, 1 MgCl₂, 6 gluconato de calcio, pH ajustado a 7,4 con NaOH), (4) Solución de Ringer baja en cloruro que contiene inhibidor de CFTR-172 (5 μ M, Calbiochem, Alemania) para evaluar la participación de CFTR. Cada solución se perfundió al menos 3 minutos, y se necesitaron 30 segundos de estabilidad antes de realizar la perfusión. El potencial transepitelial estado estacionario, V_{TE} , ΔV_{TEAmil} (diferencia entre V_{TE} y el potencial transepitelial registrado después de la perfusión de la solución que contiene amilorida), $\Delta V_{TEAmilLowCl}$ (diferencia entre V_{TE} y el potencial transepitelial registrado después de la perfusión con la solución que contiene poco Cl⁻ más amilorida) y $\Delta V_{TEAmilLowClInh-172}$ (diferencia entre V_{TE} y después de la adición del inhibidor de CFTR con la solución previa) fueron las medias de 30 valores registrados durante la estabilidad.

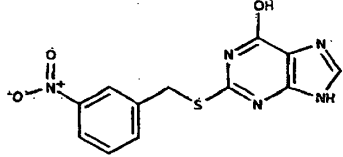
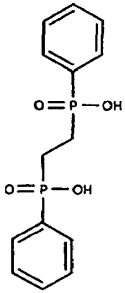
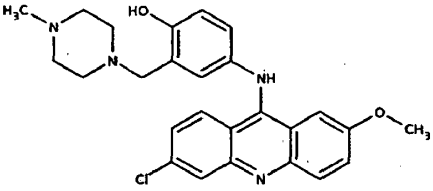
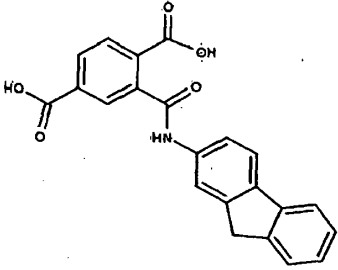
Ensayo de viabilidad celular MTT (26)

5 Para determinar la viabilidad celular se utilizó el ensayo típico MTT. Las células HeLa se cultivaron en una placa de 96 pocillos y se expusieron a concentraciones variables de compuestos de la invención durante 24 horas. Después del lavado, se introdujeron a continuación solución de MTT y medio. Después de la incubación, los cristales de formazán resultantes se disolvieron en sulfóxido de dimetilo y la intensidad de la absorbancia se midió con un lector de microplacas a 570 nm.

El amarillo MTT se reduce a formazán púrpura en las células vivas. La absorbancia de esta solución de color puede cuantificarse mediante la medición a una longitud de onda determinada con un espectrofotómetro. Esta conversión puede estar directamente relacionado con el número de células viables (vivas).

10 Detección selectiva virtual - Identificación de compuestos moduladores

15 Una base de datos de un compuesto de bajo peso molecular se utilizó en el proceso de detección selectiva virtual como fuente de aciertos. Se usó el programa de acoplamiento molecular Dock 6.1 para analizar un espacio conformacional de moléculas pequeñas dentro de dos posibles sitios de unión en la superficie de la proteína. Posteriormente, todos los ligandos seleccionados y complejos enteros se minimizaron completamente en campo de fuerza. En cada etapa se utilizó un conjunto de funciones de puntuación para la clasificación de los complejos potenciales y las moléculas apropiadas se seleccionaron para las pruebas experimentales.

	<p>118208/NOP1.6/Pok 1c</p> <p>2-[(3-nitrofenil)metilsulfanil]-3,7-dihidropurin-6-ona</p>
	<p>407882/NOP2.6/Pok 2f</p> <p>Ácido 2-[hidroxi(fenil)fosforil]etil-fenilfosfinico</p>
	<p>130813/NOP1.2/Pok1b</p> <p>4-((6-cloro-2-metoxi-9-acridinil)amino)-2-((4-metil-1-piperazinil)metil)fenol</p>
	<p>73100/Pok2e</p> <p>Ácido 2-(9H-fluoren-2-ilcarbamoyl)tereftálico</p>

Resultados

Efecto de fármacos sobre el flujo de salida de yoduro, I⁻

Para analizar la corrección del tránsito de $\Delta F508$ -CFTR y la función, los inventores evaluaron la permeabilidad a haluro por un ensayo macroscópico utilizando una metodología basada en la célula robotizada mediante la técnica de flujo de salida de I⁻. En la primera serie de experimentos, los potenciales efectos correctores se analizaron mediante un pretratamiento de 24 horas de células HeLa $\Delta F508$ -CFTR con todos los compuestos a 1 μM , seguido de mediciones del flujo de salida de yoduro radiomarcado dependiente de AMPc. Los tratamientos con los compuestos 130813 y 118208 en el bolsillo 1 y 73100 y 407882 en el bolsillo 2 conducen a un aumento significativo de del flujo de salida de yoduro radiomarcado estimulado con AMPc (Fig. 1a), siendo el más potente 407882. A esta dosis baja (1 μM), el aumento del flujo de salida estimulado por AMPc fue menor que el observado usando 100 μM del conocido corrector miglustat (27). En la **Figura 1b** se muestran ejemplos de flujo de salida de I⁻ después del tratamiento con cada uno de los cuatro compuestos activos. El flujo de salida de I⁻ estimulado por AMPc se impidió por completo cuando los experimentos se realizaron en presencia del bloqueador de los canales de CFTR CFTR_{inh}-172.

Los inventores analizaron también el efecto de los cuatro compuestos en un amplio intervalo de concentraciones y se determinó la CE₅₀ para el compuesto del bolsillo 1 130 813, y dos compuestos del bolsillo 2 407882 y 73100 a 1 μM , 10 μM y 844 nM, respectivamente (**Fig. 1c**). La CE₅₀ para el bolsillo 1 - 118208 no se pudo determinar con precisión ya que no se alcanzó el máximo flujo de salida de yoduro incluso a 100 μM (**Fig. 1d**). En particular, el efecto del compuesto 407882 se podría multiplicar por 3 cuando se utiliza a 10 μM , alcanzando un flujo de salida estimulado comparable al valor observado para la WT-CFTR (**Fig. 2**).

Para probar si los compuestos presentan actividad potenciadora independiente de su efecto sobre el tránsito de CFTR, los inventores analizaron el flujo de salida de yoduro en las células WT-CFTR HeLa no tratadas. Los compuestos se añadieron junto con forskolina y sus efectos se compararon con los de forskolina sola o forskolina más genisteína. A diferencia de la genisteína, todas las moléculas analizadas indujeron un flujo de salida de I⁻ mayor que el de forskolina sola (**Fig. 2**). La potenciación también se analizó en células HeLa $\Delta F508$ -CFTR tratadas durante 2 horas con miglustat para rescatar $\Delta F508$ -CFTR. El flujo de salida de I⁻ se estimuló con forskolina sola, con forskolina más genisteína o con forskolina más los diferentes compuestos. Como se muestra en la **figura 3**, solamente la genisteína fue capaz de aumentar el flujo de salida, lo que demuestra la ausencia de actividad de potenciación por los fármacos de los inventores.

Efecto de los fármacos sobre la maduración de CFTR

La eficacia de los cuatro compuestos como correctores para el tránsito de $\Delta F508$ -CFTR se validó adicionalmente por inmunotransferencia. Los inventores han asumido que la detección de una banda C totalmente glicosilada sugiere un procesamiento correcto de $\Delta F508$ -CFTR. Una inmunotransferencia representativa se muestra en la **Figura 4a**. Los anticuerpos anti-CFTR detectan dos bandas de proteínas derivadas de células-WT CFTR, (línea WT-CFTR en la **Figura 4a**). La banda difusa de aproximadamente 170 kDa (banda C) corresponde a una proteína madura totalmente glicosilada que se ha procesado a través del aparato de Golgi. La banda de debajo de aproximadamente 145 kDa corresponde a la proteína del núcleo glucosilada inmadura situada en el retículo endoplásmico. En las células que expresan $\Delta F508$ -CFTR, solo la proteína inmadura es detectable (línea $\Delta F508$ en la **Figura 4a**). La banda C era claramente detectable en las células tratadas con 1 μM de compuesto 407882 en comparación con las células no tratadas, mientras que la señal en 170 kDa no fue diferente del tratamiento de DMSO en las células tratadas con 1 μM de los compuestos 118208, o 130813 o muy ligeramente mayor en las células tratadas con 1 μM del compuesto 73100. Ninguno de los compuestos modificó la expresión de proteína total. La abundancia relativa de CFTR madura, expresada como la relación entre la banda C y la banda C + banda B se muestra en la **Figura 4b**. Solo el compuesto 407882 aumentó significativamente la abundancia relativa de CFTR madura.

Efecto de los fármacos sobre la inmunolocalización de CFTR

La Figura 4c muestra la tinción típica de CFTR en la membrana plasmática en células HeLa que expresan WT-CFTR, mientras que $\Delta F508$ -CFTR se encontró en todo el citoplasma. El tratamiento de las células durante 24 horas con 1 μM de 407882 dio lugar a una clara tinción de CFTR en o cerca de la membrana plasmática, lo que indica rescate del tránsito de $\Delta F508$ -CFTR de acuerdo con los experimentos de inmunotransferencia. Cuando se trató a las células con cada uno de los otros tres compuestos, 118208, 73100 o 130813, se observó una tinción por puntos discreta en la membrana plasmática en una pequeña fracción de las células, como se ilustra para el compuesto 118208 en la Figura 4c.

Efecto combinado de la unión de compuestos a diferentes bolsillos

Si dos compuestos son capaces de corregir $\Delta F508$ -CFTR mediante la unión a la misma conformación de la proteína pero en diferentes cavidades de la superficie, sus efectos podrían ser aditivos o sinérgicos. Los inventores analizaron esta hipótesis mediante dos tipos independientes de ensayos, es decir flujo de salida de yoduro y fijación de voltaje. Los resultados de los ensayos de permeabilidad al yoduro (**Fig. 5**) mostraron que el tratamiento combinado de las células con los compuestos 118208 más 407882 (**Fig. 5a**) o con 118208 más 73100 (**Fig. 5b**) a 1

μM de cada uno, conduce a un mayor flujo de salida de aniones dependiente de AMPc que los observados con cualquiera de las moléculas de forma individual. En esta serie de experimentos, el compuesto 37173 (**Fig. 5c**) se utilizó como control, ya que no indujo ningún flujo de salida de yoduro estimulado por AMPc a la misma concentración. Como se muestra en la **Figura 5c**, el cotratamiento de las células HeLa $\Delta\text{F508-CFTR}$ con 37173 más 407882 indujo el flujo de salida de yoduro estimulado por AMPc con una amplitud similar al del tratamiento con 407882 de forma individual. Por el contrario, el cotratamiento con los compuestos 118208 y 40.882 indujo el flujo de salida de yoduro con una amplitud igual a la suma de los flujos de salida inducidos por cada compuesto, mientras que se observó un ligero efecto sinérgico después del tratamiento Bey 118208 más 73100.

La actividad de los diferentes compuestos también se evaluó en experimentos de fijación de voltaje. La **Figura 6a** resume los valores medios de las amplitudes de corriente registradas a -60 mV en las diferentes condiciones experimentales. La densidad de la corriente relacionada con CFTR ($I_{\Delta\text{F508-CFTR}}$; pA/pF) se define como la corriente estimulada por AMPc menos la corriente registrada después de la inhibición mediante CFTR inh-172 a $5\mu\text{M}$, y se normalizó con la capacitancia celular. La $I_{\Delta\text{F508-CFTR}}$ fue muy baja en las células no tratadas y estimuladas aproximadamente 3 veces cuando las células se cultivaron a $27\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas antes de los registros. El tratamiento de las células durante 24 horas con $1\text{ }\mu\text{M}$ de cualquiera de 118208, 407882 o 73100 de forma individual no aumentó la amplitud de la corriente en comparación con sus respectivos controles (datos no mostrados). Sin embargo, 24 horas de pretratamiento con $1\text{ }\mu\text{M}$ de 118208 más 407882 o 118208 más 73100 mostró un aumento significativo de $I_{\Delta\text{F508-CFTR}}$. Ejemplos de gráficos lineales I/V de células pretratadas con 118208 más 407882 antes de la estimulación, en presencia de $\text{cptcAMP} + \text{IBMX}$ y después de la inhibición con CFTRinh-172 se muestran en la **Figura 6b**.

Efectos de 407882 y 118208 sobre las células CF-4KM

Los efectos de las cuatro moléculas activas en las células HeLa se analizaron después sobre el flujo de salida de yoduro dependiente de CFTR en una línea de células serosas epiteliales derivada de un paciente de FQ ΔF508 (CF-KM4) que expresan cantidades bajas de $\Delta\text{F508-CFTR}$ endógena. En estas células epiteliales, los compuestos 407882 y 118208 todavía eran capaces de inducir un flujo de salida de yoduro dependiente de AMPc significativo (**Fig. 7**). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que 2 moléculas de que corrigen la $\Delta\text{F508-CFTR}$ en las células HeLa (130813 y 73100) no fueron activas en esta línea celular.

Efectos de 73100, más 118208 sobre la diferencia de potencial nasal en ratones ΔF508 .

Los resultados de los inventores en las células sugirieron que los pares de moléculas que actúan sobre diferentes bolsillos muestran efectos aditivos correctores. Para analizar si estas moléculas son activas *in vivo*, se monitorizó la diferencia de potencial nasal (ΔV_{TE}) (25) en ratones $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ tratados por vía intranasal durante 24 horas con $30\text{ }\mu\text{l}$ de las moléculas 73100 más 118208 ($0,1\text{ }\mu\text{mol}$ cada una) embebidas en liposomas (5:1) o con liposomas de forma individual. En ratones ΔF508 , los valores basales de V_{TE} y los cambios de ΔV_{TE} inducidos mediante perfusión del epitelio nasal con amilorida $100\text{ }\mu\text{M}$, los ΔV_{TEamil} fueron similares en los ratones tratados con las dos moléculas o con liposomas de forma individual. Por el contrario, la perfusión de solución baja en Cl⁻ en 3 de los 5 ratones hiperpolarizó el V_{TE} en más de 2 mV ($\Delta V_{\text{TEamil-lowCl}}$) es decir, el valor umbral establecido por los inventores como efecto significativo del tratamiento (manuscrito en preparación). La corriente relacionada con CFTR desenmascarada por el inhibidor de CFTR I_{inh172} representa aproximadamente el 30 % de ($\Delta V_{\text{TEamil-lowCl}}$) (datos no mostrados).

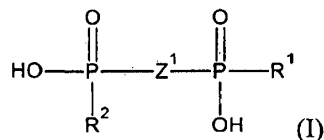
Bibliografía

1. Ollero M, Brouillard F, Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. *Proteomics*,2006 Jul;6(14):4084-99.
2. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, y col., Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.
3. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, y col., Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*,1989 Sep 8;245(4922): 1059-65.
4. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, y col., Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*,2008 May;7(3): 179-96.
5. Cystic Fibrosis Mutation Database <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>.
6. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Celi*, 1993 Jul 2;73(7): 1251-4.
7. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, Corey M, Levison H, y col., Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatr*,1995 Nov;127(5):705-10.
8. Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*,1995 Oct6;83(1):121-7.
9. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*,2002 Jun;19(6):575-606.
10. Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, y col., Impact of the ΔF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem*,2005 Jan 14;280(2): 1346-53.

11. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev*, 1999 Jan;79(1 Suppl):S145-66.
12. Reddy MM, Light MJ, Cjuinton PM. Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl-channel function. *Nature*, 1999 Nov 18;402(6759):301-4.
- 5 13. Ahmed N, Corey M, Forstner G, Zielenski J, Tsui LC, Ellis L, y col., Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut*, 2003 Aug;52(8): 1159-64.
14. Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol*, 2005;67:701-18.
15. Allen MP, Tildesley DJ. *Computer simulation of liquids*: Oxford, Clarendon Press; 1987.
16. Jungas, T., y col., Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells
10 expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 2002. 277(31): p. 27912-8.
17. Antigny, F. y col., Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell calcium* 43, 175-83(2008).
18. Baudouin-Legros, M. y col., Control of basal CFTR gene expression by bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase
15 in human pulmonary cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 21, 75-86(2008).
19. Bensalem, N. y col., Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 4, 1591-601(2005).
20. Lipecka, J. y col., Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *American journal of physiology. Cell physiology* 282, C805-16(2002).
21. Marivingt-Mounir, C, y col., Synthesis, SAR, crystal structure, and biological evaluation of benzoquinolinium
25 as activators of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels. *J Med Chem*, 2004. 47(4): p. 962-72.
22. Becq, F., y col., Development of substituted Benzo[c]quinolinium compounds as novel activators of the
cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem*, 1999. 274(39): p. 27415-25.
23. Hinzpeter, A. y col., Association between Hsp90 and the ClC-2 chloride channel upregulates channel function. *American journal of physiology. Cell physiology* 290, C45-56(2006).
24. Tanguy, G. y col., CSN5 binds to misfolded CFTR and promotes its degradation. *Biochimica et biophysica
30 acta* 1783, 1189-99(2008).
25. Sermet-Gaudelus, I. y col., Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal
sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax* 65, 539-44(2010).
26. Norez, C. y col., Maintaining low Ca²⁺ level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous
F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7, 562-73(2006).
- 35 27. Norez, C. y col., Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS letters* 580, 2081-6(2006).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):

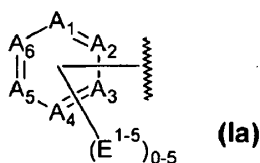


5 sus tautómeros, los isómeros geométricos E y Z, las formas ópticamente activas, tales como enantiómeros, diastereómeros y sus formas racemato o una mezcla de formas estereoisoméricas o sus sales farmacéuticamente aceptables de los mismos o complejos de los mismos; en la que Z^1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en:

10 $-\text{C}_n\text{H}_{(2n)-}$, que está ramificado o no ramificado en el que n es un número entero de 1 a 5; $-\text{C}_n\text{H}_{(2n-2)-}$ en E o Z conformación geométrica que está ramificada o no ramificada en la que n es un número entero de 2 a 5; $-\text{C}_n\text{H}_{(2n-4)-}$ que está ramificada o no ramificada en la que n es un número entero de 2 a 5; $-\text{CR}'\text{H}-$, $-\text{C}_2\text{H}_3\text{R}'-$, E o Z $-\text{C}_2\text{HR}'-$, $-\text{C}_3\text{H}_5\text{R}'-$, E o Z $-\text{C}_3\text{H}_3\text{R}'-$, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{NR}''\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NR}''-$; en los que R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en: -H, halógeno, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, CF_3 , $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{SH}$, $-\text{SCN}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$; en el que R'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en: -H, $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$; en el que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en anillo aromático o anillo heteroaromático,

15 como un modulador de una proteína CFTR mutante para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística.

2. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo de subfórmula (Ia):



20 en la que $\text{A}_1, \text{A}_2, \text{A}_3, \text{A}_4, \text{A}_5, \text{A}_6$ se selecciona independientemente átomos de N o de C en el que el anillo contiene 0-3 átomos de nitrógeno;

25 en la que $\text{E}^1, \text{E}^2, \text{E}^3, \text{E}^4, \text{E}^5$ representa sustituyentes opcionales, que se seleccionan de: $-\text{OR}_B$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_C$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_B$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A)\text{R}_A'$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_C$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A)\text{R}_A'$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{OR}_B)\text{R}_A$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_B$, $-\text{C}(=\text{S})\text{R}_C$, $-\text{C}(=\text{O})\text{C}(=\text{O})\text{R}_C$, $-\text{CH}_2\text{OR}_B$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}_B$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_A)\text{R}_A'$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_A)\text{R}_A'$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{R}_C$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}_A)\text{CH}_2\text{R}_C$, $-\text{SR}_D$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}_D$, $-\text{SO}_2\text{R}_D$, $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_A)\text{R}_A'$, $-\text{SO}_3\text{R}_B$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{C}(=\text{O})\text{R}_C$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{C}(=\text{O})\text{OR}_B$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_A')\text{R}_A''$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{SO}_2\text{R}_D$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_A')\text{R}_A''$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{R}_A'$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{C}(=\text{O})\text{R}_C$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{C}(=\text{O})\text{OR}_B$, $-\text{N}(\text{R}_A)\text{N}(\text{R}_A')\text{R}_A''$, $-\text{N}(\text{R}_A')\text{N}(\text{R}_A)\text{C}(=\text{O})\text{R}_C$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SCN}$, $-\text{SO}_2\text{CN}$, $-\text{F}$, Cl , $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{R}_C$ que está ramificado o no ramificado, en el que n es un número entero de 1 a 5; $-\text{C}_n\text{H}_{(2n-2)}\text{R}_C$ en la conformación geométrica E o Z que está ramificada o no ramificada, en el que n es un número entero de 2 a 5; $-\text{C}_n\text{H}_{(2n-2)}\text{R}_C$ que está ramificada o no ramificada, en el que n es un número entero de 2 a 5;

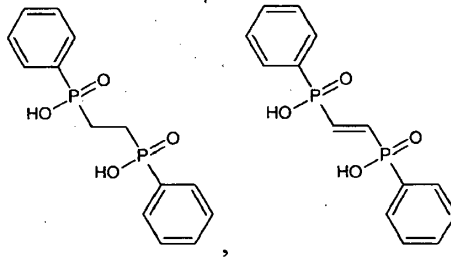
30 en la que $\text{R}_A, \text{R}_A', \text{R}_A''$ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en: -H, grupo de alquilo inferior, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{OH}$;

en la que R_B se selecciona del grupo que consiste en: -H, grupo de alquilo inferior, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{I}$;

35 en la que R_C se selecciona del grupo que consiste en: -H, grupo de alquilo inferior, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{I}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{NH}_2$,

en la que R_D se selecciona del grupo que consiste en: -H, grupo alquilo inferior.

3. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, estando dicho compuesto representado por las siguientes estructuras:



- 5 4. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o 3, en el que tiene efecto sobre la proteína CFTR mutante, en el que dicha mutación de CFTR es una mutación $\Delta F508$ -CFTR u otra mutación de la clase II y en el que una mutación $\Delta F508$ -CFTR u otra mutación de clase II están implicadas en el mal funcionamiento de la proteína CFTR.
5. Un compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad asociada con el mal funcionamiento de la proteína CFTR es la fibrosis quística.
- 10 6. Modulador de formula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística en el que tiene efecto sobre el transporte de iones dependiente de CFTR a través de la membrana celular y / o que tiene la capacidad de aumentar el número de proteínas CFTR mutantes que llegan a la superficie de la célula.
7. Modulador de formula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística, en el que tiene un efecto estabilizador sobre la estructura de la proteína CFTR mutante y / o bloquea la interacción con las proteínas celulares responsables de la degradación prematura de la CFTR mutante.
- 15 8. Modulador de formula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de la fibrosis quística en la que tiene efecto sobre la proteína CFTR mutante, en la que dicha mutación CFTR es una mutación $\Delta F508$ -CFTR, u otra mutación de la clase II.

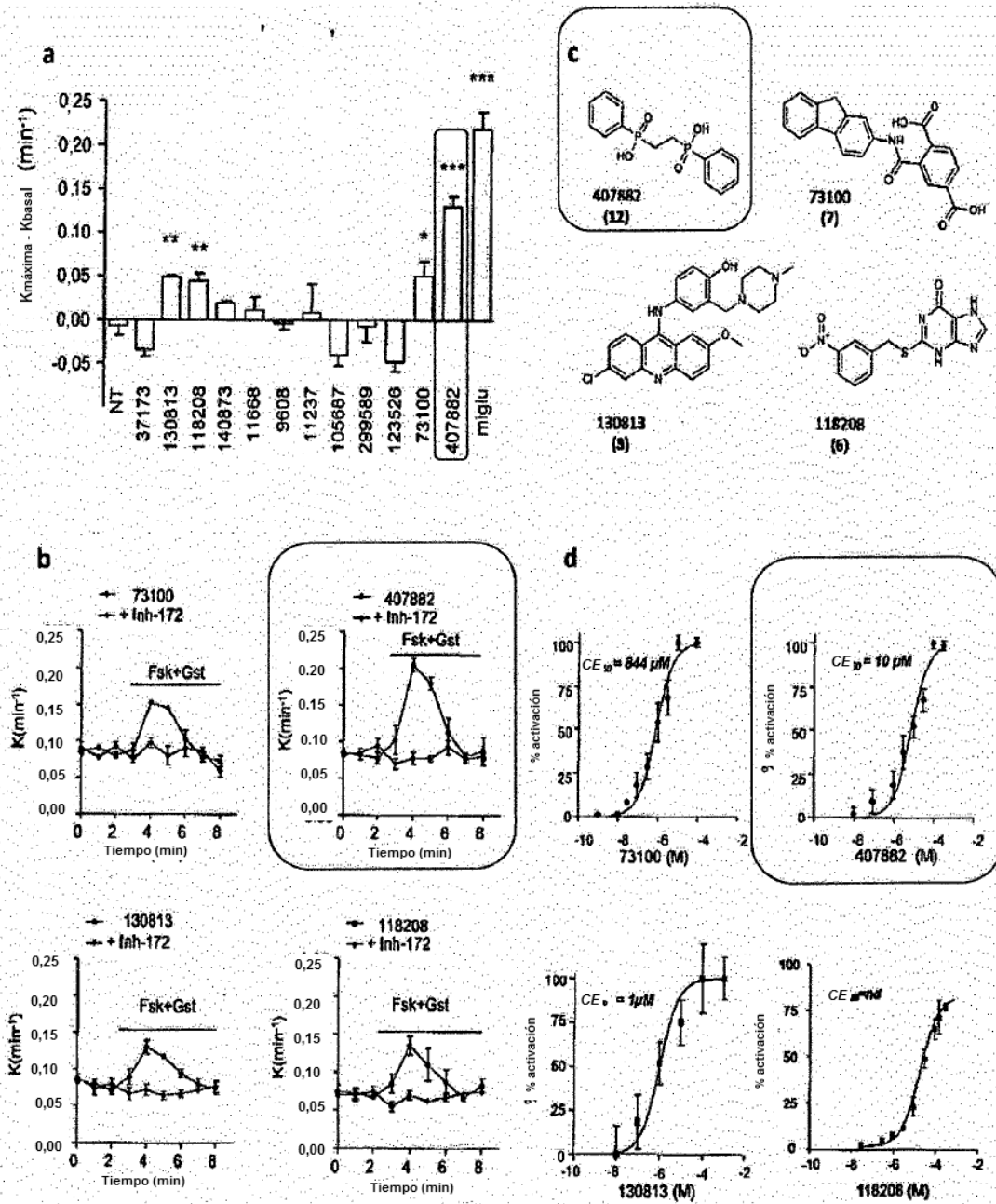


Fig. 1

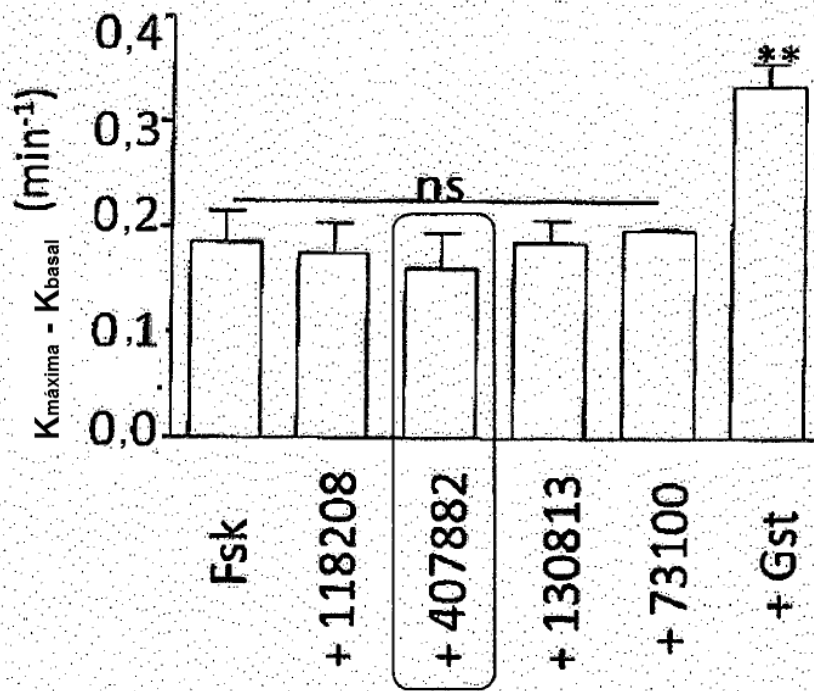
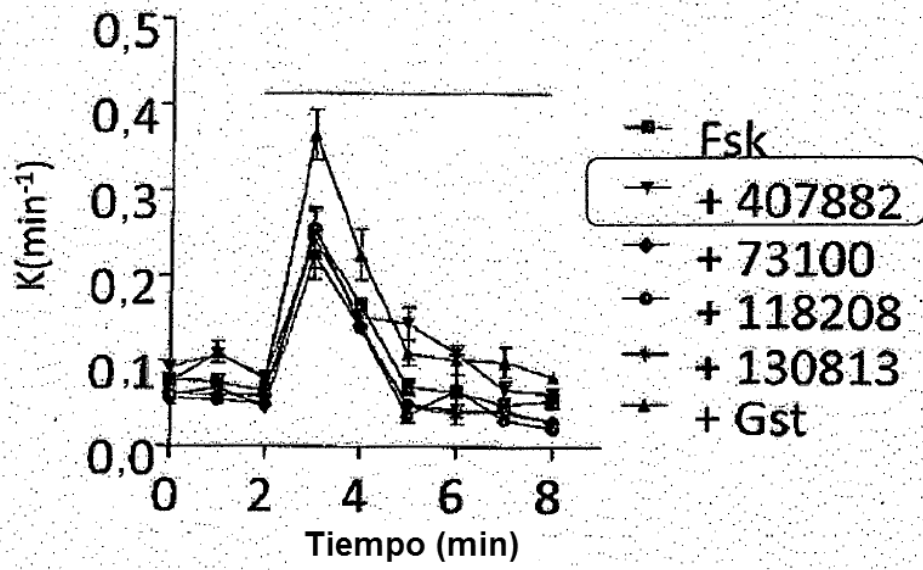


Fig. 2

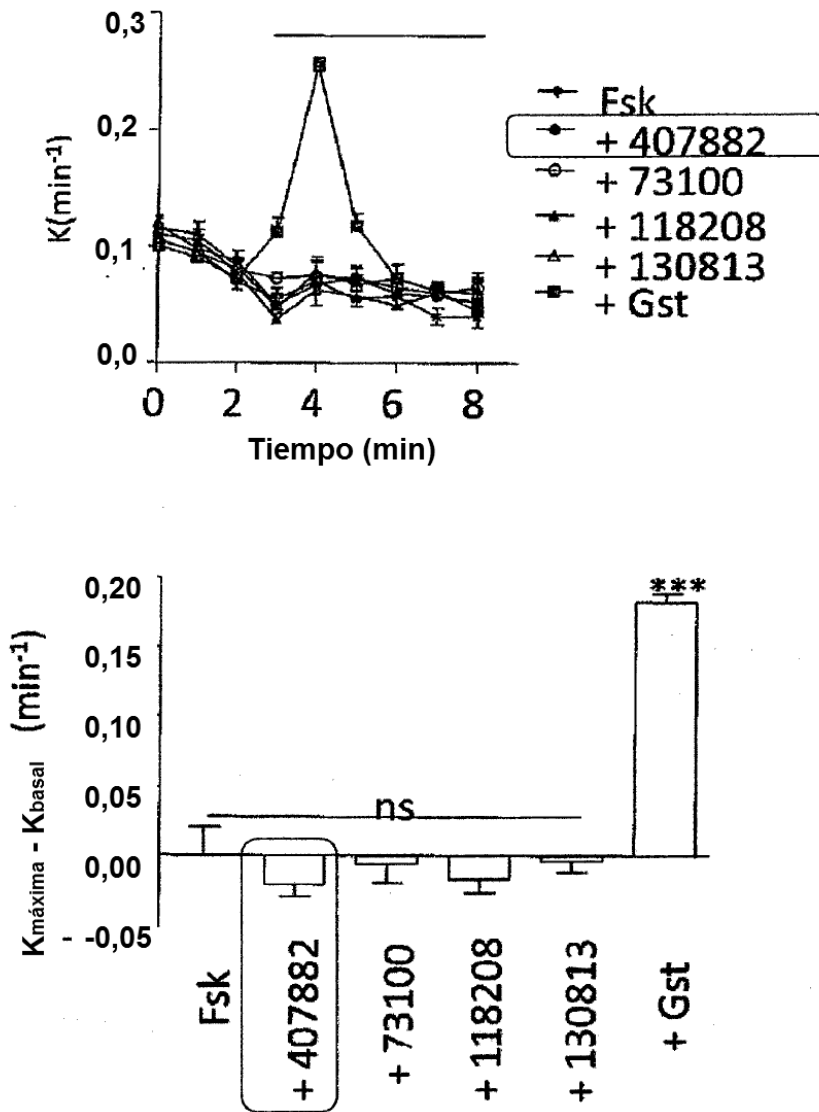


Fig. 3

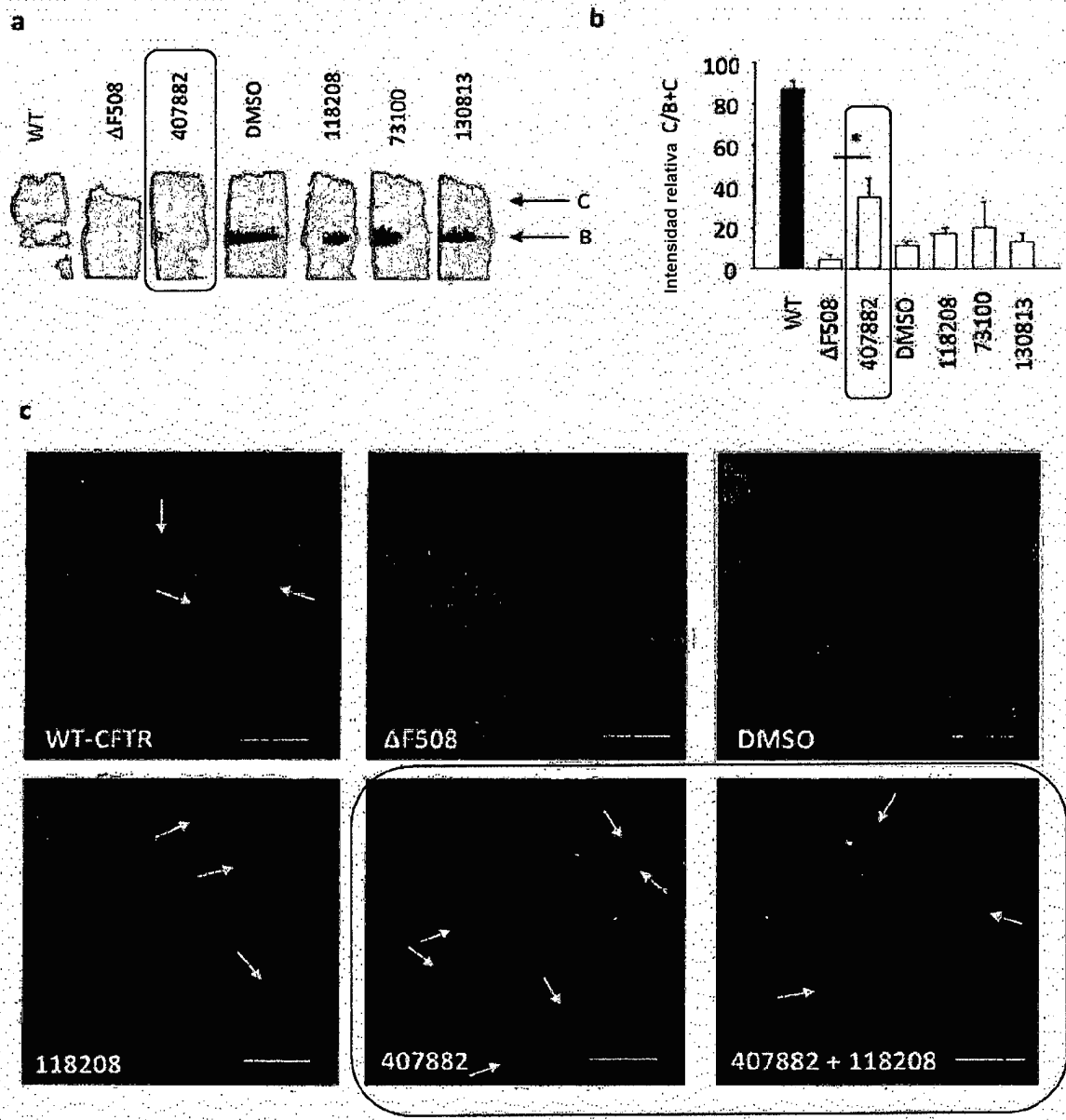


Fig. 4

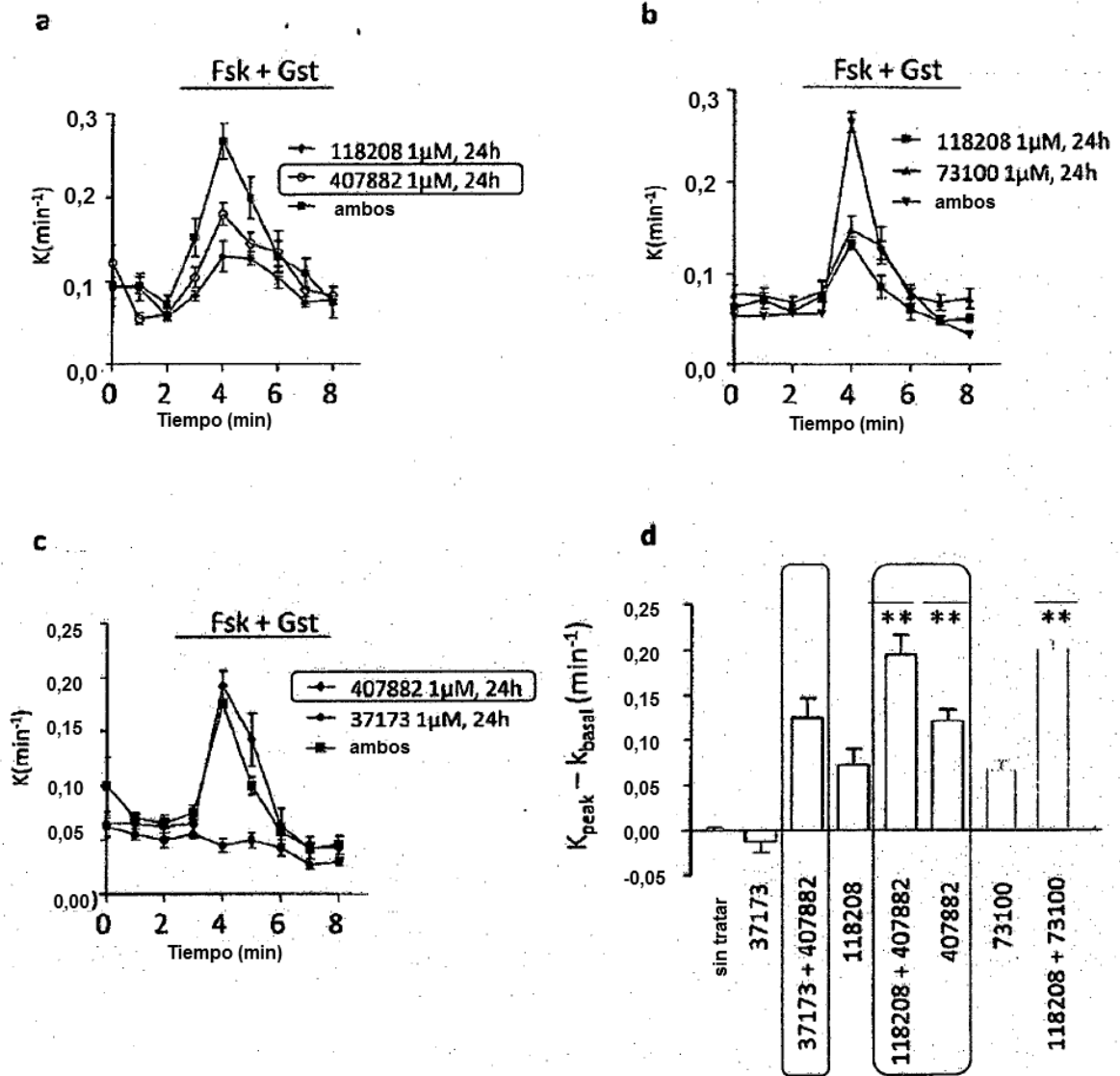


Fig. 5

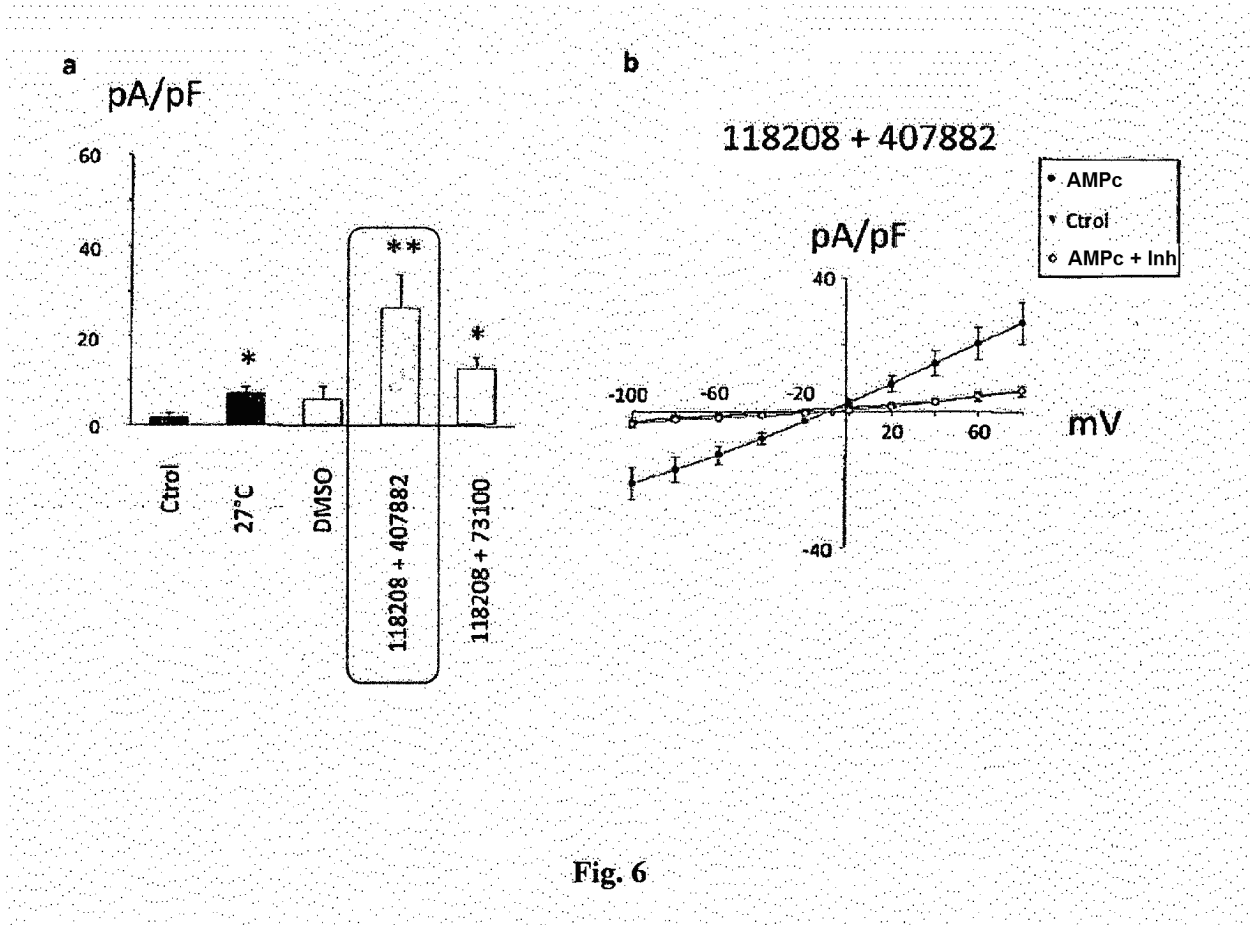


Fig. 6

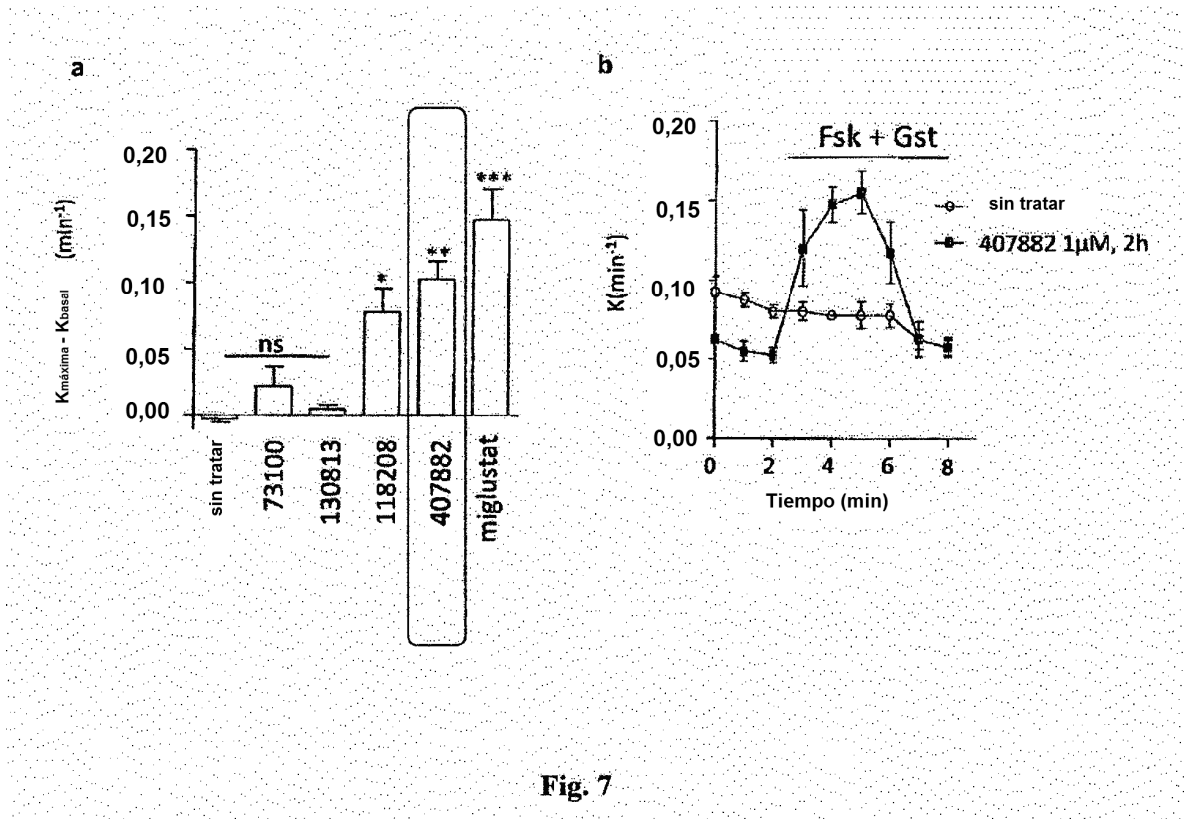


Fig. 7