(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 639 832**

(51) Int. CI.:

A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2012 PCT/EP2012/073936**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079580**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 12791780 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2785335**

(54) Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Darier**

(30) Prioridad:

29.11.2011 EP 11306578

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2017

(73) Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.0%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (33.0%)

(72) Inventor/es:

HOVNANIAN, ALAIN y
SAVIGNAC, MAGALI

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Darier

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Darier.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Darier (ED) es un trastorno de la queratinización caracterizado por el desarrollo de pápulas queratósicas en áreas seborreicas y anomalías específicas de la uña. La prevalencia está estimada en alrededor de 1/50 000. El comienzo de la enfermedad normalmente tiene lugar alrededor de la pubertad. Los pacientes presentan pápulas queratósicas grasas y coloreadas (pardo-amarillentas o pardas), que pueden estar aisladas o agrupadas formando placas. Las lesiones cutáneas con frecuencia llegan a infectarse y a ser malolientes y son responsables de un gran malestar. Pueden agravarse por exposición a la luz solar o a radiación UVB artificial, calor, sudoración, fricción e infecciones. Los sitios de predilección son las áreas seborreicas del tronco y el rostro: parte superior del pecho, espalda, lados del cuello, frente, orejas y cuero cabelludo. Las curvaturas también están implicadas con frecuencia (las ingles, axilas y la región anogenital). Las manos y los pies también pueden presentar pápulas discretas en las superficies dorsales. El examen cuidadoso de las palmas y las plantas con frecuencia revela pequeñas marcas o queratosis puntuadas que son muy sugerentes, si no específicas, de ED. Las anormalidades en la uña son casi constantes y muy sugerentes. Las uñas muestran la combinación específica de estrías longitudinales rojas y blancas y presentan hiperqueratosis subungueal. Son frágiles y presentan un defecto con forma de V. El paladar duro, la mucosa oral, el esófago, la vulva y el recto pueden ser el sitio de pápulas pequeñas blanquecinas, con frecuencia densamente agrupadas (leucoplaquia). Los pacientes presentan una susceptibilidad aumentada a herpes simple e infecciones piogénicas. La importancia de la enfermedad es muy variable, incluso dentro de la misma familia.

La ED es producida por mutaciones en el gen *ATP2A2* (12q23-q24.1) que codifica una bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El *ATP2A2* codifica la isoforma 2 de Ca^{2+}-ATPasa de retículo sarco/endoplásmico (SERCA2), una bomba de calcio que transporta Ca^{2+} del citosol al lumen de retículo endoplásmico (RE) para mantener una alta concentración de Ca^{2+} en este orgánulo. Estudios funcionales de mutaciones de *ATP2A2* identificadas en ED han demostrado que conducen a pérdida de transporte de Ca^{2+} de la bomba. Como consecuencia de la pérdida de transporte de Ca^{2+} de SERCA2, los queratinocitos Darier (QD) muestran depósito de Ca^{2+} de RE agotado.

El diagnóstico de la ED se basa en el examen histológico de biopsias de lesiones cutáneas que revelan hiperqueratosis, disqueratosis focal y acantólisis suprabasal. Los diagnósticos diferenciales incluyen enfermedad de Hailey-Hailey, pénfigo y disqueratoma verrugoso (véanse estos términos), así como dermatosis acantolítica transitoria.

El tratamiento es sintomático. Los pacientes deberían evitar el sol y el calor. Los emolientes que contienen urea o ácido láctico son beneficiosos para lesiones más limitadas. La aplicación tópica de tretinoína o isotretinoína es eficaz contra la hiperqueratosis, pero el riesgo de irritación limita su uso. Los esteroides tópicos pueden reducir la irritación, pero no son eficaces cuando se usan solos. Los retinoides tales como tazaroteno se toleran mejor. En el caso de enfermedad grave, la acitretina (un retinoide oral) es el tratamiento más eficaz, pero deben controlarse posibles efectos secundarios. Se han indicado depresión y manifestaciones neuropsicológicas y puede ser necesario soporte psicológico específico. De acuerdo con esto, hay una necesidad en la técnica de identificar nuevos objetivos farmacológicos para el tratamiento de la ED.

Sumario de la invención

La presente descripción se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Darier. Más en particular, la presente descripción se refiere a un agente que es capaz de recuperar el tráfico de E-cadherina en QD y la formación de uniones adherentes para uso en un método para tratar pacientes con enfermedad de Darier. En particular, la presente descripción se refiere a un agente seleccionado del grupo que consiste en chaperonas moleculares, químicas y farmacológicas para uso en un método para tratar pacientes con enfermedad de Darier.

La presente invención se refiere a un agente que es capaz de recuperar el tráfico de E-cadherina en queratinocitos de Darier y la formación de uniones adherentes para uso en el tratamiento de un paciente con enfermedad de Darier, en la que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en chaperonas químicas y chaperonas farmacológicas, siendo la chaperona química ácido 4-fenilbutírico (AFB) y siendo la chaperona farmacológica 1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol (miglustat).

Descripción detallada de la invención

La enfermedad de Darier es un trastorno cutáneo genético, dominante, grave, caracterizado por pérdida de adhesión

célula a célula y queratinización anormal. Los autores identificaron previamente el gen defectuoso, *ATP2A2,* que codifica SERCA2, una bomba de Ca^{2+}-ATPasa del retículo endoplásmico (RE). Aquí, demuestran que los queratinocitos de Darier (QD) muestran una respuesta al estrés del RE constitutivo y formación de uniones adherentes (UA) inmaduras. Estos defectos resultan directamente de la pérdida de la función de SERCA2 puesto que tratar los queratinocitos normales con tapsigargina, un inhibidor de SERCA2, recuerda el estrés del RE y UA inmaduras. Demuestran que las UA anormales en los QD se deben a un defecto selectivo en el tráfico de E-cadherina que es retenido en el RE. Por supuesto, la expresión de E-cadherina constitutiva en la membrana plasmática recupera el reclutamiento de catenina para la membrana celular. El tratamiento de QD con ácido 4-fenilbutírico, una chaperona química que reduce el estrés del RE o con Miglustat una chaperona farmacológica, recupera la formación de UA maduras, identificando estas moléculas como prometedores agentes terapéuticos en pacientes de Darier.

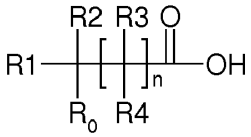
De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a un agente que es capaz de recuperar el tráfico de E-cadherina en los QD y la formación de uniones adherentes para uso en un método para tratar a pacientes con enfermedad de Darier. En particular, la presente invención se refiere a un agente seleccionado del grupo que consiste en chaperonas moleculares, químicas y farmacológicas, para uso en un método para tratar a pacientes con Darier.

El agente puede ser cualquier tipo de compuesto químico. El agente puede ser una molécula pequeña, un complejo organometálico, un compuesto inorgánico, una proteína, una glucoproteína, un péptido, un carbohidrato, un lípido o un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el agente es una molécula pequeña.

Típicamente, el agente relativo a la invención es una chaperona química. Una “chaperona química” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un compuesto que se sabe que estabiliza la conformación de proteínas contra la desnaturalización (por ejemplo, desnaturalización química, desnaturalización térmica), conservando de ese modo la estructura y la función de la proteína (Welch et al., Cell Stress Chaperones 1:109-115, 1996). En algunas realizaciones, la “chaperona química” es una molécula pequeña o compuesto de bajo peso molecular. Preferiblemente, la “chaperona química” no es una proteína.

Ejemplos de chaperonas químicas incluyen, pero no se limitan a, glicerol, agua deuterada (D2O), dimetilsulfóxido (DMSO), N-óxido de trimetilamina (OTMA), glicina betaína (betaína), glicerolfosfocolina (GFC) (Burg et al. Am. J. Physiol. (Renal Physiol. 43): F762-F765, 1998), butirato de 4-fenilo o ácido 4-fenilbutírico (AFB), metilaminas y ácido tauroursodesoxicólico (ATUDC) o cualquier derivado de los mismos.

En algunas realizaciones, la chaperona química según la descripción es un derivado de butirato de 4-fenilo con la fórmula:



en la que n es 1 o 2;

R0 es arilo, heteroarilo o fenoxi, en la que el arilo, heteroarilo y fenoxi que está no sustituido o sustituido con, independientemente, uno o más grupos halógeno, hidroxi o alquilo (C1-C6) inferior;

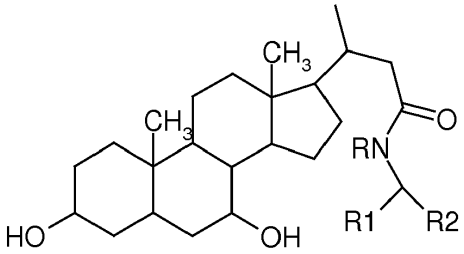
R1 y R2 son independientemente H, alcoxi inferior, hidroxi, alquilo inferior o halógeno y

R3 y R4 son independientemente H, alquilo inferior, alcoxi inferior o halógeno o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, R0 es un anillo de fenilo sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R0 es un anillo de fenilo no sustituido. En otras realizaciones, R0 es un anillo de fenilo monosustituido. En otras realizaciones más, R0 es un anillo de fenilo disustituido. En otras realizaciones más, R0 es un anillo de fenilo trisustituido. En algunas realizaciones, R0 es un anillo de fenilo sustituido con 1, 2, 3 o 4 átomos de halógeno. En algunas realizaciones, R0 es un anillo de heteroarilo sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R0 es un anillo de naftilo. En algunas realizaciones, R0 es de cinco o de seis miembros, preferiblemente de seis miembros. En algunas realizaciones, R1 y R2 son ambos hidrógeno. En algunas realizaciones, n es 1. En otras realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, todos los R3 y R4 son hidrógeno. En otras realizaciones, al menos R3 o R4 es hidrógeno. En algunas realizaciones, el compuesto se usa en forma de sal (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de amonio, etc.). Otros derivados útiles en la presente descripción se describen en la Patente de EE. UU. núm. 5.710.178. Puede obtenerse butirato de 4-fenilo o sus derivados de fuentes comerciales o prepararse por síntesis total o semisíntesis.

En algunas realizaciones, la chaperona química según la descripción es un derivado de ATUDC útil en la presente

descripción es de la fórmula:



en la que:

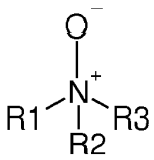
R es -H o alquilo C1-C4;

R1 es -CH2-SO3R3 y R2 es -H o R1 es -COOH y R2 es -CH2-CH2-CONH2, - CH2-CONH2, -CH2-CH2-SCH3 o -CH2-S-CH2-COOH y

R3 es -H o un aminoácido básico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, R es H. En otras realizaciones, R es metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo o terc-butilo, preferiblemente, metilo. En algunas realizaciones, R1 o R2 es hidrógeno. En algunas realizaciones, R1 es -CH2-SO3R3 y R2 es -H. En otras realizaciones, R1 es -COOH y R2 es -CH2-CH2-CONH2, -CH2-CONH2, -CH2-CH2-SCH3 o -CH2-S-CH2-COOH. En algunas realizaciones, R3 es hidrógeno. En algunas realizaciones, R3 es lisina, arginina, ornitina o histidina. Pueden obtenerse derivados de ATUDC y ácido ursodesoxicólico de fuentes comerciales, preparados a partir de síntesis total u obtenidos a partir de una semisíntesis. En algunas realizaciones, el derivado se prepara por semisíntesis, por ejemplo, como se describe en las Patentes de EE. UU., núms., 5.550.421 y 4.865.765.

La chaperona química según la descripción también puede ser un derivado de N-óxido de trimetilamina que presente la fórmula:



en la que:

R1, R2 y R3 son independientemente hidrógeno, halógeno o alquilo C1-C6 inferior o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, R1, R2 y R3 son iguales. En otras realizaciones, al menos uno de R1, R2 y R3 es diferente. En otras realizaciones más, todos los R1, R2 y R3 son diferentes. En algunas realizaciones, R1, R2 y R3 son independientemente hidrógeno o alquilo C1-C6 inferior. En otras realizaciones más, R1, R2 y R3 son independientemente alquilo C1-C6 inferior. En otras realizaciones más, R1, R2 y R3 son independientemente metilo, etilo o propilo. En algunas realizaciones, R1, R2 y R3 son etilo. Pueden obtenerse derivados de OTMA de fuentes comerciales o prepararse por síntesis total o semisíntesis.

Típicamente, el agente según la descripción es una chaperona farmacológica. Como se usa en la presente memoria, los términos "chaperona farmacológica" se refieren a una molécula, tal como una molécula pequeña, proteína, péptido, ácido nucleico o carbohidrato, que entra en las células y se une de manera específica a una proteína y presenta uno o más de los siguientes efectos: (i) potenciar la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) servir como andamiaje molecular (iii) inducir el tráfico de la proteína del RE a otra localización celular, preferiblemente una localización celular natural, es decir, evitar la degradación asociada al RE de la proteína; (iv) evitar la agregación de proteínas mal plegadas y/o (v) recuperar o potenciar la función y/o actividad natural al menos parcial a la proteína.

En otra realización, la chaperona farmacológica según la descripción es isofagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidinodiol). La IFG presenta una fórmula molecular de C 6 H 13 NO3 y un peso molecular de 147,17. Este compuesto se describe además en las Patentes de EE. UU., núms., 5.844.102 a Sierks et al., y 5.863.903, a Lundgren et al. Se describen derivados de N-alquil IFG en la Patente de EE. UU., núm., 6.046.214.

En otra realización, la chaperona farmacológica según la descripción se selecciona del grupo que consiste en derivados de hidroxipiperidina, que se describen en las publicaciones de patente internacional PCT en tramitación WO 2005/046611 y WO 2005/046612 y en la solicitud de patente de EE. UU., número de serie 10/988 428, presentada el 12 de noviembre de 2004. Otros ejemplos incluyen derivados de glucoimidazol y polihidroxiciclohexenilamina que se describen en la solicitud de patente de EE. UU., número de serie 10/988 427 presentada el 12 de noviembre de 2004.

Otras chaperonas farmacológicas más se describen en la Patente de EE. UU. núm. 6.599.919 a Fan et al., e incluyen calistegina A 3, calistegina A 5, calistegina B 1, calistegina B 2, calistegina B 3, calistegina B 4, calistegina C 1, N-metil-calistegina B 2, DMDP, DAB, castanospermina, N-butil-isofagomina, N-(3-ciclohexilpropil)-isofagomina, N-(3-fenilpropil)-isofagomina y N-[(2E,6Z,10Z)-3,7,11-trimetildodecatrienil]-isofagomina.

En otra realización no limitante, la chaperona farmacológica puede ser un inhibidor de la glucosidasa. Actualmente, para el control de calidad de plegamiento de la glucoproteína, las glucosidasas son de eminente importancia (Roth J. et al., Histochem Cell Biol (2008) 129: 163-177; Marcus NY. Et al., the Journal of Biological Chemistry, vol 275 núm., 3 (2000) 1987-1992). En otra realización, la chaperona farmacológica puede ser un N-alquil-derivado de 1,5-didesoxi-1,5-imino-D-glucitol. 1,5-Didesoxi-1,5-imino-D-glucitol (o 1-desoxinojirimicina o DNJ) y sus N-alquil-derivados son inhibidores conocidos de las enzimas de tratamiento de oligosacáridos unidos en el N, alfa-glucosidasa I y II. Saunier et al., J. Biol. Chem. 257, 14155-14161 (1982); Elbein, Ann. Rev. Biochem. 56, 497-534 (1987). En una realización particular, dicho grupo alquilo contiene de 2-8 átomos de carbono y preferiblemente de 4-6 átomos de carbono. En otra realización particular, el grupo alquilo es butilo o hexilo. Finalmente, en otra realización, el N-alquil-derivado de 1,5-didesoxi-1,5-imino-D-glucitol es 1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol que también se conoce como miglustast (Zavesca™). Otros ejemplos de inhibidores de la glucosidasa incluyen polihidroxibenzofenonas como se describe en Hu et al. (Arch Pharme Chem Life Sci 2010 000 1-7).

En otra realización, la chaperona farmacológica según la descripción es un inhibidor de la glucosilceramida sintasa.

Por ejemplo, dicho inhibidor de la glucosilceramida sintasa puede ser tartrato de eliglustat como se describe en Cox TM. Curr Opin Investing Drugs, octubre de 2010; 11 (10): 1169-81 o peterschmitt MJ. Et al. Clin Pharmacol., 25 de octubre de 2010. Otros ejemplos también incluyen D-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol (FDMP) y derivados de los mismos como se describe en Abe A. et al., Curr Drug Metab., septiembre de 2001; 2 (3): 331-8 tales como D-treo-3',4'-etilenodioxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol y D-treo-4'-hidroxi-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol. Otros ejemplos incluyen derivados de piperidina como se describe en la patente internacional WO02/055498 y 3,4,5-piperidinotriol, 2-(hidroximetil)-1-[(4-(pentiloxi)fenil)metil]-, (2S,3S,4R,5S) tal como se describe en la patente de EE. UU. 2007/0259918.

Los agentes para uso según la invención pueden administrarse en la forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación. Los agentes de la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente matrices de liberación prolongada, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

De acuerdo con esto, un aspecto más de la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente útil según la invención para uso en un método para tratar pacientes con enfermedad de Darier.

El término "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, cuando sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material de encapsulación o agente auxiliar de formulación de cualquier tipo, no tóxico.

En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, sólo o junto con otro principio activo, pueden administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias, adecuadas, comprenden formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones orales o disoluciones, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, disoluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que, en la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso y polvos estériles para la

preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista aptitud para ser inyectado fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y debe conservarse contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las disoluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezcladas convenientemente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de los microorganismos.

El agente de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede producirse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse por el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones inyectables estériles por incorporación de los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan por incorporación de los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución filtrada estéril previamente del mismo.

En la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones son administradas fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para administración parenteral en disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería ser tamponada convenientemente si es necesario y hacer primero el diluyente líquido isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, podía disolverse una dosis en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y añadir a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o inyectar en el sitio propuesto de infusión. Necesariamente tendrá lugar alguna variación en la dosis dependiendo de la enfermedad del individuo que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el individuo.

El agente de la invención puede formularse dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o así. También pueden administrarse dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones de liposomas; cápsulas de liberación controlada y cualquier otra forma usada en la actualidad.

En una realización particular, puede ser deseable administrar el agente de la invención en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, tópico. El portador farmacéuticamente aceptable, tópico, es cualquier portador sustancialmente no tóxico utilizable de manera convencional para administración tópica de productos farmacéuticos en que el agente de la invención permanecerá estable y biodisponible cuando se aplique directamente a superficies cutáneas. Por ejemplo, portadores tales como los conocidos en la técnica eficaces para penetrar la capa de queratina de la piel en el estrato corneo pueden ser útiles en el suministro del agente de la invención al área de

interés. Dichos portadores incluyen liposomas. El agente de la invención puede ser dispersado o emulsionado en un medio de una manera convencional para formar una preparación líquida o mezclada con un portador semisólido (gel) o sólido para formar una pasta, polvo, pomada, crema, loción o similar.

Portadores farmacéuticamente aceptables tópicos, adecuados, incluyen agua, disolución salina tamponada, gelatina de petróleo (vaselina), petrolato, aceite de parafina, aceite vegetal, aceite animal, ceras orgánicas e inorgánicas, tales como cera microcristalina, parafina y ozocerita, polímeros naturales, tales como xantanas, gelatina, celulosa, colágeno, almidón o goma arábiga, polímeros sintéticos, alcoholes, polioles y similares. El portador puede ser una composición de portador miscible en agua. Dicha composición de portador farmacéuticamente aceptable, tópica, miscible en agua, puede incluir las preparadas con uno o más principios de ingredientes apropiados de tratamiento.

Debido a que las condiciones dermatológicas que se tienen que tratar pueden ser visibles, el portador tópico puede ser también un portador tópico aceptable. El portador tópico aceptable será cualquier portador sustancialmente no tóxico convencionalmente utilizable para administración tópica en que el agente de la invención permanecerá estable y biodisponible cuando se aplique directamente a la superficie de la piel. Portadores cosméticamente aceptables adecuados son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, líquidos, cremas, aceites, lociones, pomadas, geles o sólidos, cosméticamente aceptables, tales como cremas cosméticas de noche, bases de maquillaje, aceites bronceadores, filtros solares, lociones para las manos, maquillaje y bases de maquillaje, mascarillas y similares, convencionales. Los portadores aceptables tópicos pueden ser similares o idénticos por naturaleza a los portadores farmacéuticamente aceptables, tópicos, descritos anteriormente.

Puede ser deseable tener un sistema de suministro que controle la liberación de agente de la invención a la piel y se adhiera a la misma o se mantenga sobre la piel durante un periodo de tiempo prolongado para aumentar el tiempo de contacto del agente de la invención sobre la piel. La liberación prolongada o retardada de agente de la invención proporciona una administración más eficaz resultante de una dosificación menos frecuente y/o disminuida de agente de la invención y mejor cumplimiento del paciente. Ejemplos de portadores adecuados para liberación prolongada o retardada en un entorno húmedo incluyen gelatina, goma arábiga, polímeros de xantana. Portadores farmacéuticos capaces de liberar el agente de la invención cuando se exponen a cualquier entorno oleoso, graso, ceroso o húmedo en el área que se esté tratando, incluyen resina termoplástica o resina termoendurecible flexible o elastómero, incluyendo resinas termoplásticas tales como poli(haluros de vinilo), poli(ésteres de vinilo), poli(haluros de vinilideno) y poliolefinas halogenadas, elastómeros tales como brasiliensis, polidienos y cauchos naturales y sintéticos halogenados y resinas termoendurecibles flexibles tales como poliuretanos, resinas epoxídicas y similares. Se describen sistemas de suministro controlado, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. núm. 5 427 778 que proporciona formulaciones de gel y disoluciones viscosas para suministro del agente de la invención a un sitio de la piel. Los geles presentan las ventajas de tener un alto contenido en agua para mantener la humedad de la piel, la capacidad para absorber exudado de la piel, aplicación fácil y eliminación fácil por lavado. Preferiblemente, el portador de liberación prolongada o retardada es un gel, liposoma, microesponja o microesfera. El agente de la invención también puede administrarse junto con otros agentes farmacéuticamente eficaces incluyendo, pero no limitado a, antibióticos, otros agentes de curación de la piel y antioxidantes.

Un objeto más de la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad de Darier que comprende administrar a un individuo con necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente para uso según la invención.

Por una “cantidad terapéuticamente eficaz” se quiere decir una cantidad suficiente del agente para tratar la enfermedad de Darier a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico interviniente dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de la dosis terapéuticamente eficaz, específico, para cualquier individuo particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del individuo; el tiempo de administración, vía de administración y tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en asociación o coincidentes con el polipéptido específico empleado y factores similares conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la destreza de la técnica empezar con dosis del compuesto a niveles menores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se consiga el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variarse por un amplio intervalo de 0,01 a 1000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 50,0; 100; 250 y 500 mg del agente para el ajuste sintomático de la dosis al individuo que se está tratando. Un medicamento contiene típicamente desde aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del agente, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del agente. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra ordinariamente a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

La invención se ilustrará además por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deberían interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: La disfunción de SERCA2 en la enfermedad de Darier produce estrés constitutivo y uniones adherentes inmaduras: reversión por moléculas de chaperona

Material y métodos

Pacientes de ED y diagnóstico molecular. Se tomaron biopsias de pacientes de Darier de la piel no afectada (perilesional). Se obtuvieron biopsias de control de piel normal de cinco controles con igual edad y sexo. Se investigaron en los cinco pacientes de Darier (D1 a D5) mutaciones en el gen ATP2A2 por secuenciación de los 21 exones y flanqueando sitios de empalme de ATP2A2. En el siguiente estudio, se han comparado los queratinocitos de estos cinco pacientes de ED (D1 a D5) con queratinocitos normales de seis controles sanos (QN).

Cultivo celular. Se cultivaron queratinocitos en medio 0,06 mM de $CaCl_2$ EpiLife (Invitrogen) a confluencia del 60-80% y se incubaron después en medio 1,2 mM de $CaCl_2$ EpiLife durante 4 horas para inducir la formación de contactos célula-célula. Los experimentos se realizaron a pases comparables entre QN y QD.

Tratamientos con fármacos. Para la inducción de estrés del RE, se cultivaron queratinocitos en medio de alto contenido en Ca^{2+} (1,2 mM) con tapsigargina (TG, Sigma) a 1 µM durante diferentes periodos de tiempo. Para la inhibición de bomba de SERCA en QN, se trataron previamente los queratinocitos con 100 nM de TG durante 30 min en medio de bajo contenido en Ca^{2+} (0,06 mM). Se retiró el medio y se incubaron las células en medio de alto contenido en Ca^{2+} (1,2 mM) durante unas 4 horas adicionales para inducir la formación de contactos célula-célula. Para tratamiento de moléculas de chaperona, se trataron previamente los queratinocitos con 4-fenilbutirato de sodio (AFB, 5 mM, Calbiochem), Miglustat y su análogo de iminoazúcar inactivo (NB-DGJ) (500 µM, un obsequio de F. Becq) durante 24 h antes de cambiar el medio para medio de alto contenido en Ca^{2+} (1,2 mM).

Inmunofluorescencia. Se cultivaron queratinocitos sobre cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 10 minutos. Después de bloquear con suero fetal bovino al 1% en PBS, se incubaron las células con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche. Con posterioridad, se incubaron las células con el anticuerpo secundario conjugado de Alexa apropiado a temperatura ambiente durante 1 hora. Para la coloración con actina, se incubaron las células con faloidina-TRITC a temperatura ambiente durante 1 hora. Por último, se montaron los cubreobjetos sobre tiras de vidrio usando ajuste Vectashield Hard (Vector laboratories) y se examinaron usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 con un objetivo 40 Plan-Apochromat (aceite 1,3) o un objetivo 63 Plan-Apochromat (aceite 1,4), junto con una ampliación x2.

Cuantificación de volúmenes de compartimentos intracelulares y colocalización. Para cuantificaciones de volumen, se formaron imágenes de todas las reconstrucciones de la serie Z con un agujerito de 1 unidad de Airy con una etapa Z óptima. Se abrieron archivos de la serie Z LSM en el programa informático Imaris 7.1.1 (Bitplane Inc.) como volúmenes y después se tomaron isosuperficies usando un filtro gaussiano de 0,2 µm. Se inspeccionó de manera visual la isosuperficie de cada compartimento intracelular para asegurar que siguiera próximo a la imagen tridimensional original subyacente y no incorporara vóxeles fuera de la región del compartimento intracelular observable. Se seleccionó cada isosuperficie y se registró estadísticamente el volumen. Se realizó cuantificación de las señales de colocalización usando el programa informático Metamorph (Molecular Devices). En una única sección óptica, se calcula la superficie de la señal roja (E-cadherina) que se combina con una señal verde (Calnexina).

Métodos Western. Se lisaron queratinocitos en tampón conteniendo Tris 50 mM (pH 8), NaCl 120 mM, NP-40 al 0,5%, cóctel de inhibidores de proteasa Complete™ (Roche) y cóctel 2 de inhibidor de fosfatasa (Sigma) durante 30 minutos sobre hielo y se granularon por centrifugación. Se recogió el sobrenadante para la cuantificación de la cantidad de proteína por la prueba de Bradford. Se añadieron cantidades iguales de proteína soluble a tampón Laemmli (Tris HCl 62,5 mM, pH 6,8, ®-mercaptoetanol al 5%, SDS al 2%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,002%). Se separaron muestras por SDS-PAGE y se transfirieron sobre membrana Hybond-C extra (GE Healthcare). Se usó inmunodetección de β-actina como un control de carga. Se desarrollaron manchas por quimioluminiscencia (ECL Advance, GE Healthcare o SuperSignal West Dura, Pierce).

RT-PCR. Se aisló el ARN de queratinocitos usando TRIzol (Invitrogen) y se transcribió inverso usando iniciadores de hexámero y virus RT de leucemia de murina Moloney. Se realizó multiplicación PCR.

Transducción de queratinocitos con vectores retrovirales. Para transducción de queratinocitos, se complementó medio acondicionado que contenía retrovirus recombinante con 4 µg/ml de *polybrene*. Se cambió el medio 16 h después de la adición del virus y se dejó que las células expresaran la proteína de interés durante 72 h antes de experimentos de inmunofluorescencia. La eficacia de infección típica fue 90%, cuando se valoró usando el gen indicador GFP.

Análisis estadístico. Se usó la prueba t de Student para datos no pareados de dos colas para análisis estadístico. Los valores de P de 0,05 o menos se consideraron significativos. Los asteriscos representan la significación estadística frente al control apropiado en cada caso * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

Aprobación del estudio. Este estudio se realizó según los principios éticos de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético médico del Hospital Purpan en Toulouse. Todos los pacientes dieron su consentimiento

informado.

Resultados

Los queratinocitos de Darier muestran una respuesta al estrés del RE constitutivo.

La $[Ca^{2+}]_{RE}$ disminuida, un rasgo característico de QD (3-6), desencadena estrés del RE en muchas células (18, 19). Se muestra que la pérdida de un alelo *ATP2A2* en QD es suficiente para aumentar la fosforilación de eIF2α e IRE1, es decir, en ausencia de factor estresante exógeno, cuando se compara con queratinocitos normales (QN). Este resultado describe un estrés del RE constitutivo en QD. Después de exposición a tapsigargina (TG), un inhibidor altamente específico de bombas SERCA (20), se aumenta la fosforilación de eIF2α e IRE1 en QD hasta el punto que es mayor que en QN (2 a 3 veces en QD y 1,5 veces en QN para fosfo-eIF2α). Además, la forma activa, empalmada, de ARNm de XBP1, el objetivo de ARNasa fosforilada IRE1, aumentó en QD comparado con QN, después de tratamiento de TG, consistente con la activación creciente de IRE1 observada en QD. La fosforilación de eIF2α e IRE1 y el empalme de XBP1 aumentaron en QD de los cinco pacientes estudiados (D1 a D5), estableciendo que los QD son más susceptibles de respuesta al estrés del RE inducida por factores estresantes que QN.

La inmunocoloración para marcadores específicos calnexina, ERGIC-53, GM130 y TGN46 mostró respectivamente, que el RE, ERGIC (compartimento intermedio de Golgi del RE, por sus siglas en inglés), compartimentos *cis*-Golgi y *trans*-Golgi se localizan estrictamente en una zona perinuclear en QN. Por el contrario, la coloración de calnexina es difusa por todo el citoplasma en QD en condiciones basales. La coloración específica para cada compartimento pos-RE muestra puntos dispersados por todo el citoplasma, indicando su fragmentación. Las mediciones cuantitativas mostraron un aumento significativo en los volúmenes de cada compartimento. Todos estos cambios morfológicos se han descrito como inducidos por estrés del RE en diferentes tipos de células (18, 21).

Cabe señalar que, el número de células confluentes por campo fue siempre más pequeño para QD que para QN, que sugiere que QD se extiende más que QN, en un número de pases comparable.

Además, estos datos muestran que QD muestra diferentes características de respuesta al estrés del RE en condiciones exentas de factor estresante.

La formación de uniones adherentes inducidas por Ca^{2+} está disminuida en QD.

El desplazamiento de 0,06 mM a 1,2 mM de concentración de calcio extracelular induce contactos célula a célula y la formación de complejos de adhesión. La presencia de un estrés del RE constitutivo en QD es probable que altere importantes funciones del RE, tales como plegamiento de proteínas secretoras y (trans)membrana (revisado en (18)). Siendo la pérdida de adhesión célula a célula (acantólisis) el principal rasgo histológico en lesiones cutáneas de Darier, se investigó primero la localización de E-cadherina, la proteína transmembrana de UA cuyo direccionamiento a la membrana plasmática es una de las respuestas celulares más tempranas a aumento de Ca^{2+} que conduce a adhesión celular. En condiciones de bajo contenido en calcio (0,06 mM), la E-cadherina fue distribuida de manera difusa en el citoplasma en QN y QD. Después de 4 horas en medio de alto contenido en calcio (1,2 mM) para inducir adhesión célula-célula, las moléculas de E-cadherina se desplazaron a la membrana plasmática en QN, con una coloración fina alrededor de la periferia celular, formando un cinturón continuo a lo largo de las fronteras célula-célula. La coloración de la E-cadherina en QD fue drásticamente diferente comparado con QN: se detectaron agrupaciones puntuadas en las fronteras célula-célula, con organización anormal en hebras dispuestas de manera perpendicular, o a diferentes ángulos, al borde de la célula. Al contrario que para QN, el espacio intercelular observado entre QD adyacentes puso de manifiesto pérdida de adherencia entre estas células.

La localización de diferentes cateninas implicadas en los complejos de UA también se modificó en QD. Después de incubación en medio con alto contenido en calcio (1,2 mM), las proteínas de catenina se desplazaron a la membrana plasmática en QN y formaron un cinturón continuo lineal delgado a lo largo de las fronteras célula-célula, mientras en QD todos los patrones de coloración de catenina mostraron un patrón puntuado bajo la membrana plasmática. En condiciones de bajo contenido en calcio (0,06 mM), las β-, α- y p120-cateninas se distribuyeron de manera difusa en el citosol en QN y QD.

Durante la formación de UA, la unión secuencial de cateninas a E-cadherina induce polimerización de actina como se observa en QN, en que F-actina aparece como haces corticales delgados bajo, y paralelos a, la membrana plasmática. Por el contrario, los filamentos de F-actina formaron haces gruesos y desorganizados en QD. Estos hallazgos proporcionan evidencia para la localización incorrecta de componentes de UA, que revela la formación anormal de estas estructuras de adhesión tempranas en QD con un efecto sobre la organización de los filamentos de F-actina.

Los niveles de expresión de cada proteína de UA fueron similares entre QN y QD como se reveló por análisis de inmunotransferencia que sugieren que la formación de UA anormal en QD no es una consecuencia del nivel de expresión reducido. Cabe destacar que, después de 4 horas de exposición a 1,2 mM de Ca^{2+} (tiempo para permitir la formación de UA), se aumentó la fosforilación de eIF2α en QD comparado con QN. Así, la disminución de formación de UA inducida por Ca^{2+} se correlaciona con la respuesta aumentada al estrés del RE en QD.

La tapsigargina inhibe la formación de uniones adherentes en QN

Para ensayar si el conjunto de UA defectuoso en QD es una consecuencia directa de pérdida de función de SERCA2, se trató QN con TG para inhibir de manera específica bombas SERCA. TG indujo un agrandamiento del compartimento del RE caracterizado por un aumento de dos veces el volumen del RE en QN tratado con TG comparado con QN no tratado. Cabe destacar que, el número de células confluentes por campo del microscopio fue siempre más pequeño en QN tratado con TG que en QN no tratado, como se observó entre QD y QN. El análisis de inmunofluorescencia de UA en QN pretratado con TG cultivado en Ca^{2+} 1,2 mM reveló anormalidades de UA similares a las de QD: la E-cadherina y las cateninas se organizaron en hebras dispuestas en un ángulo con el borde de la célula, la coloración fue puntuada en las fronteras célula-célula y la red de F-actina apareció desorganizada en el citosol. Estos resultados demuestran que la extensión del RE y la formación de UA defectuosas observadas en QD son una consecuencia directa de la pérdida de función de SERCA2.

La formación de la unión adherente disminuida en QD se debe a un defecto selectivo de tráfico de E-cadherina a la membrana plasmática.

La E-cadherina recién sintetizada requiere unir β-catenina para facilitar su transporte fuera del RE a la membrana plasmática (22). Para distinguir entre un defecto selectivo en tráfico de E-cadherina y salida deficiente del RE producida por ausencia de reclutamiento de β-catenina en la membrana plasmática, se expresó un mutante de E-cadherina fijado como objetivo en la membrana plasmática independientemente de unión de β-catenina (23). Se transdujeron QN y QD con partículas víricas (MSCV-EcadM-GFP) que codificaban este mutante de E-cadherina, en condiciones de bajo contenido en calcio (0,06 mM) para evitar localización de membrana plasmática de E-cadherina endógena. Se observó una coloración pericelular, delgada, de mutante de E-cadherina en la membrana plasmática, además de una fracción citosólica, como se indicó previamente en estirpes de queratinocitos (23). Curiosamente, la β-catenina se relocalizó en la membrana plasmática en QD como se observó en QN. QN y QD transducidos con un vector MSCV-IRES-GFP de control, expresando GFP solo, no mostraron ni coloración de E-cadherina ni relocalización de β-catenina en la membrana plasmática en condiciones de bajo contenido en calcio. Estos resultados muestran que β-catenina endógena en QD se puede localizar en la membrana plasmática en coloración lineal, que demuestra que la formación deficiente de UA en QD se debe a un defecto selectivo en el tráfico de E-cadherina a la membrana plasmática.

La E-cadherina es retenida en el RE en QD y en QN tratado con TG

Usando un anticuerpo contra la región intracelular de E-cadherina, se confirmó la coloración espesa y puntuada de E-cadherina en la membrana plasmática en QD y QN tratado con TG comparado con QN. Además, se observó retención intracelular de E-cadherina en QD y en QN tratado con TG como señal perinuclear que estaba ausente de QN, indicando el tráfico deficiente de E-cadherina a la membrana plasmática.

Para identificar el compartimento en el que se retiene E-cadherina en QD, se realizó coinmunofluorescencia para E-cadherina y calnexina, un marcador del RE. La E-cadherina intracelular colocalizada con calnexina en QD y QN tratado con TG. La cuantificación de superficie intracelular de E-cadherina que se superpone con el compartimento positivo de calnexina demostró una retención significativa de E-cadherina en el RE en QD de los cinco pacientes estudiados y en QN tratado con TG.

El tratamiento de QD con moléculas de chaperona recupera la formación de uniones adherentes

Las chaperonas químicas tales como ácido 4-fenilbutírico (AFB) alivian el estrés del RE y recuperan el plegamiento de las proteínas y la estabilidad en modelos de enfermedad (24, 25). El AFB es, por lo tanto, una herramienta elegante para examinar las consecuencias funcionales de estrés del RE en la formación de UA en QD. El tratamiento de AFB de QD disminuyó la fosforilación de eIF2α inducida por TG y recuperó la condensación perinuclear del RE, similar a QN. Además, el QD tratado con AFB adquirió una forma poligonal pronunciada (característica de adhesión célula a célula) cuyos rasgos son: una coloración pericelular lineal, aguda y más intensa de E-cadherina y cateninas; haces corticales de F-actina paralelos y más próximos a la membrana celular. En conjunto estos datos muestran que el AFB disminuye el estrés del RE y corrige la formación de UA en QD.

También se ensayó la chaperona farmacológica Miglustat (N-butildesoxinojirimicina, Zavesca®). Esta molécula ha sido propuesta para uso clínico en fibrosis cística debido a su capacidad para corregir el tráfico defectuoso de ΔF508-CFTR(26). No se redujo ni la fosforilación de eIF2α inducida por TG ni la expansión del RE en QD tratado con Miglustat. Sin embargo, Miglustat indujo una coloración pericelular continua, intensa, estrecha, de todos los componentes de la UA en la membrana plasmática de QD, así como polimerización de la red de F-actina. Su análogo inactivo (NB-DGJ) no tuvo efecto sobre la localización de E-cadherina. Estos resultados se obtuvieron con Miglustat 500 μM, una concentración a la que todas las células presentaron un fenotipo poligonal. A concentración menor (100 μM), Miglustat indujo localización aumentada de la membrana plasmática de E-cadherina solo en un número limitado de células. No se observó toxicidad de las moléculas de chaperona hacia los queratinocitos para estos protocolos.

Los efectos de AFB y Miglustat se observaron de manera reproducible en los queratinocitos de los cinco pacientes

de ED estudiados. Cabe señalar que, ni AFB ni Miglustat aumentaron la expresión de E-cadherina y SERCA2 en QD. Estos resultados demuestran el total de rescate de formación de UA por moléculas de chaperona en QD.

Discusión

Este estudio demuestra por primera vez que el QD mostró una respuesta al estrés del RE constitutivo que conduce a formación de UA defectuosa y ese tratamiento con moléculas de chaperona recupera la formación de UA maduras.

La $[Ca^{2+}]_{RE}$ desempeña una función importante en las funciones relacionadas con el RE (27), remodelado del RE (28), arquitectura del compartimento pos-RE (21) y respuesta al estrés del RE (18, 19). Aquí, se muestra que, la disfunción de SERCA2, por disminución de $[Ca^{2+}]_{RE}$ (5, 6), indujo una tensión del RE constitutiva. En el QD, el RE es difuso por todo el citoplasma, todos los compartimentos possecretores del RE están desorganizados y fragmentados y se aumenta el tamaño celular comparado con QN, como se describió previamente en otras células con estrés del RE (29). La expansión del RE y el agrandamiento celular se recapitularon en QN tratado por un inhibidor de SERCA2, que demuestra que estos cambios morfológicos son una consecuencia directa de la pérdida de función de SERCA2 en QD.

El comienzo de la enfermedad de Darier es normalmente alrededor de la pubertad y realiza un curso recidivante crónico, con exacerbaciones por factores estresantes tales como irradiación UVB, calor, fricción e infecciones. De manera destacable, en condiciones basales, se aumenta la fosforilación de eIF2α e IRE1 en QD, que demuestra que una pérdida de un alelo *ATP2A2* es suficiente para inducir una respuesta al estrés del RE en condiciones sin factor estresante. Los factores desencadenantes de manifestaciones clínicas podían actuar exacerbando el estrés del RE constitutivo de QD, como se observó con TG. Consistente con esta noción, se sabe que la irradiación UVB induce una respuesta al estrés del RE (30). La presencia de queratinocitos redondeados (cuerpos redondos), que son característicos de ED y que se cree que corresponden a células apoptóticas, podía resultar de una respuesta al estrés del RE no controlada desencadenada por factores externos, conduciendo a muerte celular programada.

Las secciones de la piel de pacientes de Darier se caracterizan de manera histológica por acantólisis, que conduce a grietas suprabasales. La formación de UA, uno de los casos más tempranos siguiendo al incremento en la concentración extracelular de calcio (11), se sabe que transcurre por diferentes fases, siendo las UA inmaduras una de las más tempranas[42]. En QD, se observaron dos filas de moléculas de E-cadherina/catenina colocalizadas como puntos en los bordes de los contactos célula-célula y los filamentos de actina se aproximaron a contactos de la célula inicial perpendicularmente (31-34). Estos son rasgos de la primera etapa de formación de UA y típico de UA inmaduras. Por contraste, en las mismas condiciones, el QN mostró coloración lineal de E-cadherina y cateninas en la membrana plasmática, que es característico de UA maduras. Se concluyó que QD forma UA inmaduras, que predispone la epidermis de ED a adhesión intercelular defectuosa cuando se expuso a factores desencadenantes. QN tratado con TG desarrolló la misma UA inmadura, que demuestra que la pérdida de función de SERCA2 es la causa de defecto en la formación de UA.

Se proporcionó evidencia de que la formación de UA inmaduras en QD se debe al tráfico defectuoso de E-cadherina a la membrana plasmática: 1) los niveles de expresión de proteínas de componentes de UA son comparables entre QD y QN; 2) la respuesta al estrés del RE activada en QD y en QN tratado con TG conduce a retención de E-cadherina en el RE y 3) la expresión de E-cadherina recombinante que localiza de manera constitutiva la membrana celular en condiciones de bajo contenido en Ca^{2+} es suficiente para trasladar β-catenina endógena a la membrana celular.

El tratamiento actual para la ED no es satisfactorio y se basa principalmente en el uso de retinoides tópicos u orales (acitretina o isotretinoína) que con frecuencia no son tolerados y no son completamente eficaces (35). Se ha demostrado que el AFB actúa como una chaperona química en varias enfermedades de mal plegamiento de proteínas, que permite el plegado de la proteína mutada y su localización apropiada en la célula por liberación del estrés del RE (24-26, 36). Se demostró aquí que el AFB atenúa la respuesta al estrés del RE en QD, como se pone de manifiesto por la disminución de la fosforilación de eIF2α y el volumen del RE y restaura el tráfico de proteínas de UA a la membrana plasmática para formar UA maduras. Estos datos establecen una función causal para el estrés del RE en la formación de UA inmaduras. Además, Miglustat, una chaperona farmacológica conocida por permitir la localización apropiada de CFTR (26) mutado, restaura el tráfico de moléculas de la UA a la membrana plasmática y la formación de UA maduras en QD. Se demuestra por primera vez que estas moléculas de chaperona pueden restaurar la localización apropiada de una proteína no mutada retenida en el RE como resultado de un estrés del RE inducido por agotamiento de Ca^{2+}.

Los mecanismos precisos de acción de estas moléculas no están claros. Aunque se ha descrito el AFB como un regulador (37) de la transcripción, no se modifica la expresión ni de E-cadherina ni de SERCA2 en QD tratado con AFB. Por el contrario, la respuesta al estrés del RE disminuida y el traslado de moléculas de las UA a la membrana plasmática en QD tratado con AFB sugiere que el AFB podía actuar por su actividad de chaperona química evitando la agregación de proteínas mutantes mal plegadas y aliviando el estrés del RE, como se indicó previamente (38).

En la fibrosis quística, Miglustat evita la interacción entre ΔF508-CFTR y calnexina, una proteína de chaperona de RE dependiente de Ca^{2+}, que permite un ΔF508-CFTR funcional para alcanzar la membrana plasmática (26). En

QD, Miglustat puede liberar la E-cadherina de calnexina, permitiendo así su tráfico del RE a la membrana plasmática.

En conclusión, estos resultados establecen que un estrés del RE constitutivo produce formación de UA inmaduras en QD. El estrés del RE sería un mecanismo general que justificara la formación defectuosa de UA, pero también el tráfico deficiente de desmoplaquina como se describió previamente (10), pérdida subyacente de adhesión célula a célula en la epidermis de ED. Este trabajo pone en evidencia el papel crucial de la concentración en Ca^{2+} del RE en la fisiopatología de la ED y permite clasificar la ED como una enfermedad relacionada con el estrés del RE que implica mal plegamiento de proteínas. Además, debido a que las moléculas de chaperona han sido usadas con éxito ya en animales y/o ensayos clínicos (24, 25, 39-41), este estudio proporciona una importante prueba del principio que soporta una futura aplicación clínica en pacientes de Darier.

REFERENCIAS

Por toda esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan por la presente por referencia en la presente descripción.

1. Burge, S., y Hovnanian, A. 2011. Acantholytic Disorders of the Skin. Capítulo 51, en Dermatology in General Medecine 2011, 8ª edición, Fitzpatrick's

2. Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C. S., O'Donovan, M., Craddock, N., et al. 1999. Mutations in ATP2A2, encoding a Ca2+ pump, cause Darier disease. Nat Genet 21:271-277.

3. Dode, L., Andersen, J. P., Leslie, N., Dhitavat, J., Vilsen, B., y Hovnanian, A. 2003. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses. J Biol Chem 278:47877-47889.

4. Miyauchi, Y., Daiho, T., Yamasaki, K., Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, A., Danko, S., Suzuki, H., y Iizuka, H. 2006. Comprehensive analysis of expression and function of 51 sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase mutants associated with Darier disease. J Biol Chem 281:22882-22895.

5. Foggia, L., Aronchik, I., Aberg, K., Brown, B., Hovnanian, A., y Mauro, T. M. 2006. Activity of the hSPCA1 Golgi Ca2+ pump is essential for Ca2+-mediated Ca2+ response and cell viability in Darier disease. J Cell Sci 119:671-679.

6. Pani, B., Cornatzer, E., Cornatzer, W., Shin, D.M., Pittelkow, M.R., Hovnanian, A., Ambudkar, I.S., and Singh, B.B. 2006. Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. Mol Biol Cell 17:4446-4458.

7. Hovnanian, A. 2004. Darier's disease: from dyskeratosis to endoplasmic reticulum calcium ATPase deficiency. Biochem Biophys Res Commun 322:1237-1244.

8. Savignac, M., Edir, A., Simon, M., y Hovnanian, A. 2011. Darier disease : a disease model of impaired calcium homeostasis in the skin. Biochim Biophys Acta 1813:1111-1117.

9. Liu, L.H., Boivin, G.P., Prasad, V., Periasamy, M., y Shull, G.E. 2001. Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase isoform 2 Ca2+ pump. J Biol Chem 276:26737-26740.

10. Dhitavat, J., Cobbold, C., Leslie, N., Burge, S., y Hovnanian, A. 2003. Impaired trafficking of the desmoplakins in cultured Darier's disease keratinocytes. J Invest Dermatol 121:1349-1355.

11. Wheelock, M. J., y Johnson, K. R. 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. Annu Rev Cell Dev Biol 19:207-235.

12. Getsios, S., Huen, A. C., y Green, K. J. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 5:271-281.

13. Perez-Moreno, M., Jamora, C., y Fuchs, E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell 112:535-548.

14. Pokutta, S., y Weis, W. I. 2007. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. Annu Rev Cell Dev Biol 23:237-261.

15. Berridge, M. J., Bootman, M. D., y Roderick, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 4:517-529.

16. Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. Febs J 274:630-658.

17. Schroder, M., y Kaufman, R. J. 2005. ER stress and the unfolded protein response. Mutat Res 569:29-63.

18. Schroder, M., y Kaufman, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 74:739-789.

19. Ashby, M. C., y Tepikin, A. V. 2001. ER calcium and the functions of intracellular organelles. Semin Cell Dev Biol 12:11-17.

20. Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B., y Hanley, M. R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. Agents Actions 27:17-23.

21. Amodio, G., Renna, M., Paladino, S., Venturi, C., Tacchetti, C., Moltedo, O., Franceschelli, S., Mallardo, M., Bonatti, S., y Remondelli, P. 2009. Endoplasmic reticulum stress reduces the export from the ER and alters the architecture of post-ER compartments. Int J Biochem Cell Biol 41:2511-2521.

22. Chen, Y. T., Stewart, D. B., y Nelson, W. J. 1999. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. J Cell Biol 144:687-699.

23. Fukumoto, Y., Shintani, Y., Reynolds, A. B., Johnson, K. R., y Wheelock, M. J. 2008. The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane. Exp Cell Res 314:52-67.

24. Erbay, E., Babaev, V. R., Mayers, J. R., Makowski, L., Charles, K. N., Snitow, M. E., Fazio, S., Wiest, M. M., Watkins, S. M., Linton, M. F., et al. 2009. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. Nat Med 15:1383-1391.

25. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Gorgun, C. Z., y Hotamisligil, G.S. 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. Science 313:1137-1140.

26. Norez, C., Noel, S., Wilke, M., Bijvelds, M., Jorna, H., Melin, P., DeJonge, H., y Becq, F. 2006. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. FEBS Lett 580:2081-2086.

27. Federovitch, C. M., Ron, D., and Hampton, R. Y. 2005. The dynamic ER: experimental approaches and current questions. Curr Opin Cell Biol 17:409-414.

28. Sammels, E., Parys, J. B., Missiaen, L., De Smedt, H., y Bultynck, G. 2010. Intracellular Ca2+ storage in health and disease: a dynamic equilibrium. Cell Calcium 47:297-314.

29. Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Qian, S. B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B. K., Rosenwald, A., et al. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. Immunity 21:81-93.

30. Mera, K., Kawahara, K., Tada, K., Kawai, K., Hashiguchi, T., Maruyama, I., y Kanekura, T. 2010. ER signaling is activated to protect human HaCaT keratinocytes from ER stress induced by environmental doses of UVB. Biochem Biophys Res Commun 397:350-354.

31. Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. 1995. Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. J Cell Sci 108 (Pt 1):127-142.

32. Adams, C. L., Chen, Y. T., Smith, S. J., y Nelson, W. J. 1998. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. J Cell Biol 142:1105-1119.

33. Adams, C. L., Nelson, W. J., y Smith, S. J. 1996. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. J Cell Biol 135:1899-1911.

34. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., y Fuchs, E. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. Cell 100:209-219.

35. Burge, S. 1999. Management of Darier's disease. Clin Exp Dermatol 24:53-56.

36. Chamcheu, J. C., Pihl-Lundin, I., Mouyobo, C. E., Gester, T., Virtanen, M., Moustakas, A., Navsaria, H., Vahlquist, A., y Torma, H. 2010. Immortalized keratinocytes derived from epidermolytic ichthyosis patients reproduce the disease phenotype: a useful in vitro model for testing new treatments. Br J Dermatol.

37. Dover, G. J., Brusilow, S., y Samid, D. 1992. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. N Engl J Med 327:569-570.

38. Kubota, K., Niinuma, Y., Kaneko, M., Okuma, Y., Sugai, M., Omura, T., Uesugi, M., Uehara, T., Hosoi, T., y Nomura, Y. 2006. Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. J Neurochem 97:1259-1268.

39. Cox, T. M., Aerts, J. M., Andria, G., Beck, M., Belmatoug, N., Bembi, B., Chertkoff, R., Vom Dahl, S., Elstein, D., Erikson, A., et al. 2003. The role of the iminosugar N-butyldeoxynojirimycin (miglustat) in the management of type I (non-neuronopathic) Gaucher disease: a position statement. J Inherit Metab Dis 26:513-526.

40. Rubenstein, R. C., y Zeitlin, P. L. 1998. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. Am J Respir Crit Care Med 157:484-490.

41. Collins, A. F., Pearson, H. A., Giardina, P., McDonagh, K. T., Brusilow, S. W., y Dover, G. J. 1995. Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. Blood 85:43-49.

REIVINDICACIONES

1. Un agente que es capaz de recuperar el tráfico de E-cadherina en queratinocitos de Darier y la formación de uniones adherentes para uso en el tratamiento de un paciente con enfermedad de Darier, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en chaperonas químicas y chaperonas farmacológicas, siendo la chaperona química ácido 4-fenilbutírico (AFB) y siendo la chaperona farmacológica 1,5-(butilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol (miglustat).