

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 321**

51 Int. Cl.:

A61K 31/047 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2012** **E 12168409 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2664326**

54 Título: **Terapia combinada para fibrosis quística**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2018

73 Titular/es:

**I.E.R.F.C. European Institute for Cystic Fibrosis
Research (100.0%)
Via Olgettina, 58
20132 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**MAIURI, LUIGI;
RAIA, VALERIA;
BORELLA, FABIO y
KROEMER, GUIDO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 656 321 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

Terapia combinada para fibrosis quística

La presente invención se refiere al tratamiento de la Fibrosis Quística (CF) en pacientes portadores de la mutación $\Delta F508$ -CFTR. Más específicamente, la invención proporciona una combinación de inhibidores de transglutaminasa tisular (TG2) y activadores del canal de CFTR (potenciadores) para uso en administración separada, secuencial o simultánea a pacientes con CF que portan la mutación $\Delta F508$ -CFTR. Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que contiene el inhibidor de TG2 y el potenciador para usar en este método terapéutico.

Antecedentes de la invención

La CF es un trastorno autosómico recesivo, la enfermedad genética letal más común en caucásicos (O'Sullivan 2009; Rowe, 2005; Accurso, 2006), caracterizada por enfermedad pulmonar crónica, la principal causa de morbilidad y mortalidad, disfunción pancreática, aumento de los niveles de electrolitos en el sudor y la infertilidad masculina. La CF es causada por mutaciones de una sola proteína, el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), un canal de cloruro regulado por cAMP que se localiza principalmente en la membrana apical de las células epiteliales (Park 2010). Más de 1.500 mutaciones diferentes asociadas a la enfermedad han sido identificadas, algunas de ellas codifican mutantes de CFTR que alcanzan la membrana plasmática celular pero carecen de actividad de CFTR, otras que codifican cantidades insignificantes de proteína o mutantes mal plegados que se degradan prematuramente y no logran alcanzar una localización de la superficie celular. Entre los últimos, una supresión de un solo codón, $\Delta F508$, se produce en aproximadamente el 90% de los pacientes con CF en al menos un alelo. Debido a su mal plegado, $\Delta F508$ -CFTR pierde su actividad esencial de canal iónico en la membrana plasmática (PM), provocando inflamación local, aumento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas respiratorias e insuficiencia pulmonar y digestiva progresiva (Collins 1992).

Un $\Delta F508$ -CFTR aún parcialmente funcional puede rescatarse en la membrana plasmática (PM) mediante moléculas que corrigen la retención y degradación intracelular de $\Delta F508$ -CFTR (correctores). Sin embargo, $\Delta F508$ -CFTR que alcanza la PM es inestable como resultado de una ubiquitinación mediada por (CHIP) [proteína que interactúa con el cognado 70 de choque térmico del terminal carboxilo (Hsc70)] seguido por redireccionamiento de la proteína desde el reciclaje endosómico hacia el suministro y degradación lisosómico (Okiyoneda T, 2010). Por lo tanto, los pacientes con CF que portan la $\Delta F508$ -CFTR mal plegada responden escasamente a los potenciadores de la actividad del canal de CFTR que pueden usarse para el tratamiento del pequeño subconjunto de pacientes con CF que portan mutantes de CFTR residentes en la PM (Ramsey BW, 2011; Davids PB, 2011). Por lo tanto, la fijación del mutante $\Delta F508$ -CFTR mal plegado en la PM después del rescate es el objetivo principal de las terapias "reparadoras de CFTR" (Lucaks GL, 2012; Davids PB, 2011).

Una terapia ideal para la CF debe apuntar no solo a rescatar la función de CFTR, sino también a mejorar la inflamación pulmonar crónica y la mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas que constituyen el principal problema clínico de los pacientes con CF (Belcher CN, 2010). Un ensayo clínico reciente con el corrector de CFTR VX-809 en pacientes homocigotos de $\Delta F508$ -CFTR demostró reducciones moderadas dependientes de la dosis en cloruro de sudor (Clancy JP 2012; Elborn S. 2012). Sin embargo, no se informó mejoría en la función pulmonar o complicaciones de la CF (Clancy JP 2012 Elborn S. 2012) y los estudios clínicos de Fase II que combinan VX-809 y el potenciador VX-770 deben esperarse para evaluar su beneficio clínico.

Se ha informado que se produce un trastorno complejo de la homeostasis proteica (proteostasis) en las células epiteliales de CF y es causado por la pérdida de la función de CFTR. Los mayores niveles de especies de oxígeno reactivo (ROS) inducidas por la función CFTR defectuosa conducen a la activación de transglutaminasa tisular (TG2) que conduce al entrecruzamiento y acumulación agresiva de varias proteínas del sustrato de TG2 (Maiuri L, 2008; Luciani A, 2009), entre las cuales el secuestro de la proteína esencial de autofagia Beclin-1 (Luciani A, 2010; Luciani A, 2011). El secuestro funcional de Beclin-1 disloca el complejo III de PI3K del retículo endoplasmático (ER), inhibiendo así la formación del autofagosoma e impulsando la inflamación en las vías respiratorias con CF. Esto genera un ciclo de retroalimentación que mantiene el estrés oxidativo y perpetúa la inflamación. La autofagia defectuosa también se confirmó en macrófagos de CF (Abdulrahman BA, 2012). El rescate de Beclin-1 y la autofagia mediante sobreexpresión de Beclin-1 forzada por transfección o mediante inhibidores de TG2 (por ejemplo, cistamina) o antioxidantes (por ejemplo, N-acetil-cisteína o superóxido dismutasa (SOD)/EUK-134 mimético de catalasa), mitiga la inflamación en las vías aéreas homocigóticas del $\Delta F508$ -CFTR, tanto en ratones *in vivo* como en tejidos humanos, *in vitro* (Luciani A, 2010; Luciani A, 2011). Además, el rescate de la autofagia favorece el tráfico de $\Delta F508$ -CFTR a la membrana plasmática de las células epiteliales.

Descripción de la invención

Usando diferentes modelos experimentales *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de fibrosis quística $\Delta F508$ -CFTR, se descubrió sorprendentemente que el pretratamiento con un inhibidor de TG2 o un agente inhibidor de especies reactivas de oxígeno (inhibidor de ROS) o una combinación de los mismos, permite la acción de los potenciadores de CFTR en $\Delta F508$ -CFTR mucho más allá de la retirada del inhibidor de TG2 y/o del inhibidor de ROS, permitiendo así por primera vez un enfoque terapéutico eficaz y duradero para la fibrosis quística causada por la mutación $\Delta F508$ -CFTR.

Se estableció por primera vez un entorno experimental *ex vivo* en el que se incubaron células epiteliales nasales primarias recién obtenidas mediante cepillado nasal de pacientes homocigotos con $\Delta F508$ -CFTR durante 18 horas con cistamina o EUK-134 o con los correctores de CFTR bien conocidos Corr-4a y VRT-325 (Varga K, 2008) seguido de lavado y nuevo cultivo durante 24 horas con medio. Al final de la incubación se evaluó la función del canal de CFTR mediante un procedimiento estandarizado de evaluación del flujo de yoduro (Silvis MR 2009). Sorprendentemente se encontró que la cistamina y el EUK-134 no solo eran eficaces para rescatar la función de $\Delta F508$ -CFTR, sino también, diferencia de Corr-4a y VRT-325, para hacer que las células sean capaces de conservar la respuesta de $\Delta F508$ -CFTR a los potenciadores de CFTR genisteína, VX-532 mucho más allá del lavado del fármaco. Por lo tanto, se proporciona la evidencia impredecible de que los potenciadores de CFTR pueden resultar efectivos en $\Delta F508$ -CFTR en células epiteliales de las vías respiratorias de CF humana si el entorno ha sido restaurado previamente por reguladores de proteostasis como cistamina o EUK-134.

Se usó otro entorno experimental *ex vivo* humano en el que se obtuvieron biopsias de pólipos nasales de pacientes homocigóticos de $\Delta F508$ -CFTR, ya que la poliposis nasal no alérgica idiopática a menudo complica la CF. Las biopsias de pólipos nasales homocigóticos $\Delta F508$ -CFTR se trataron con cistamina durante 18 horas, se lavaron y luego se cultivaron durante 36 horas más en ausencia de cistamina. Sorprendentemente, en este modelo experimental, la situación más cercana a la situación *in vivo*, ya que diferentes tipos de células pueden interactuar con las células vecinas dentro de su entorno natural, la reducción de los signos de inflamación de la mucosa junto con una expresión de CFTR conservada en la superficie epitelial persistió durante 36 horas después de la extracción de la cistamina. Además, en este contexto, un procedimiento experimental prolongado que consiste en un único pulso corto de biopsias con los potenciadores de CFTR antes mencionados al final del período de lavado, aumentó significativamente los efectos de la cistamina en la amortiguación de la inflamación de la mucosa, mientras que los potenciadores de CFTR fueron totalmente ineficaces en las biopsias que no fueron tratados previamente con cistamina. Estos resultados demuestran un efecto sinérgico del tratamiento secuencial de cistamina más genisteína y proporcionan la evidencia inesperada de que los potenciadores de CFTR son beneficiosos en las vías aéreas de $\Delta F508$ -CFTR siempre que el $\Delta F508$ -CFTR se estabilice primero en la membrana plasmática de las células epiteliales de las vías respiratorias mediante pretratamiento con cistamina.

Para demostrar la eficacia de dicha administración secuencial de fármaco en $\Delta F508$ -CFTR *in vivo*, se usó otro entorno experimental donde se les administró a ratones homocigotos para la $\Delta F508$ -CFTR (Cftr^{F508del}) por vía intraperitoneal durante 7 días con vehículo solamente o con el inhibidor de TG2 cistamina. Este último probó ser capaz en muestras de vías aéreas de CF humana *in vitro*, y *ex vivo* de prolongar la expresión de $\Delta F508$ -CFTR en la superficie epitelial más allá del lavado del fármaco. En este modelo experimental, los efectos de la cistamina en el mantenimiento de la reubicación de la proteína $\Delta F508$ en la superficie del epitelio pulmonar y en la reducción de la inflamación pulmonar persistieron durante 10 días después de la extracción de la cistamina. En un entorno experimental extendido donde ratones Cftr^{F508del} se trataron con inhalaciones diarias de cistamina intraperitoneal o en forma de aerosol durante una semana, se mantuvieron durante otra semana sin tratamiento y luego se pulsaron secuencialmente con el potenciador genisteína, los signos de inflamación pulmonar, constitutiva o provocada por el lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-LPS) se redujeron significativamente en ratones tratados previamente con cistamina por el potenciador de CFTR que, por el contrario, no fue efectivo en ratones que no habían recibido pretratamiento con cistamina.

Para proporcionar la justificación del uso de inhibidores de TG2 o fármacos que reducen los niveles de ROS como pretratamiento antes de la administración de potenciadores de CFTR, se utilizó otro entorno experimental, donde se trataron las líneas de células epiteliales de las vías respiratorias que portan las mutaciones de $\Delta F508/\Delta F508$ CFTR con cistamina o EUK-134 o donde el TG2 se agotó por medio de un enfoque de ARN pequeño de interferencia o donde las ROS se redujeron por la sobreexpresión de la superóxido dismutasa de manganeso humana (Mn-SOD). En un primer grupo de experimentos, las células se trataron previamente durante 18 horas con cistamina o EUK-134 y luego se mantuvieron en medio solo durante 48 horas más y finalmente se pulsaron con genisteína o VX-532, como se indicó anteriormente. En otro entorno experimental, se realizó el silenciamiento del gen de TG2 o la sobreexpresión de Mn-SOD en lugar de la incubación con cistamina o EUK-134 y las células se analizaron después de 48 horas. El análisis de la función de CFTR después de los tratamientos reveló que los pretratamientos farmacológicos o la desactivación de TG2 o la sobreexpresión de Mn-SOD fueron igualmente efectivos para permitir la acción de los potenciadores de CFTR en la estimulación de la función del canal de CFTR. Estos resultados demuestran que los efectos de la cistamina y EUK-134 dependen de su capacidad para inhibir la actividad de TG2 y/o reducir los niveles de ROS.

Se usó otro enfoque experimental para probar la eficacia de otros agentes farmacológicos capaces de amortiguar TG2 y/o reducir los niveles de ROS. Estos agentes farmacológicos fueron moléculas capaces de inhibir la actividad de TG2 a través de diferentes mecanismos, como se describió previamente, (aquí generalmente indicado como inhibidores de TG2) como compuestos tiol que se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en cistamina, cisteamina, ácido lipoico, tiopronina, acetilcisteína, carboximetilcisteína, erdosteína, moguisteína, mesna y glutatión (GSH). Los inhibidores de ROS preferiblemente incluyen fenoles y polifenoles tales como ácido elágico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico, resveratrol y carotenoides tales como luteína, astaxantina y zeaxantina. Estos agentes farmacológicos se probaron siguiendo el enfoque experimental de pretratamiento (18 horas), lavado (48 horas) y pulso único con potenciadores, en presencia o ausencia de estimulación con PA-LPS después del pulso con potenciadores, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Usando estos ajustes experimentales, se

5 encontró que la cisteamina, ácido lipoico, tiopronina, acetilcisteína, carboximetilcisteína, erdosteína, moguisteína, mesna y glutatión (GSH), así como el ácido elágico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico, resveratrol y los carotenoides tales como luteína, astaxantina y zeaxantina están dotados de efectos similares a los de la cistamina o EUK-134 al permitir la actividad de los potenciadores de CFTR genisteína o VX-532 después del lavado, como se describió anteriormente. Se demostró que todas estas sustancias probadas fueron efectivas para reducir los niveles de ROS y/o amortiguar la actividad de la proteína TG2 y de la Exzyme TG2. También se descubrió que el pretratamiento con cistamina, EUK-134, así como con los otros agentes farmacológicos mencionados anteriormente, permite la actividad de los potenciadores de CFTR genisteína y VX-532, así como del conocido potenciador de CFTR VX-770 en $\Delta F508$ -CFTR 48 horas después de la retirada de las moléculas utilizadas como régimen de pretratamiento.

10 Además, se probó la eficacia de otras moléculas dotadas con actividad inhibitora de ROS o actividad potenciadora. Se encontró que quercetina, silibina, apigenina, catequina, epigallocatequina, antocianidinas fueron tan efectivas como la genisteína para estimular la función de CFTR después del pretratamiento con todas las moléculas mencionadas anteriormente, seguido de 48 horas de lavado.

15 En conjunto, estos resultados apoyan un nuevo enfoque para el tratamiento de pacientes homocigotos F508-CFTR. Particularmente, estos resultados indican que la inhibición de TG2, así como la reducción de los niveles de ROS que sostienen la expresión de TG2, inducen y conservan la proteína $\Delta F508$ -CFTR en la superficie epitelial después del rescate permitiendo así que los potenciadores ejerzan su actividad de mejoradores de la función de canal en el $\Delta F508$ -CFTR todavía reside en la superficie de la célula después de la suspensión del fármaco.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona una combinación de:

a) un inhibidor de transglutaminasa tisular TG2 que se selecciona del grupo que consiste en cistamina, cisteamina, ácido lipoico, tiopronina, acetilcisteína, carboximetilcisteína, erdosteína, moguisteína, mesna y glutatión (GSH) y

b) un activador del canal (potenciador) del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR),

25 para uso en un método de tratamiento de un paciente con fibrosis quística que porta la mutación $\Delta F508$ -CFTR, que comprende administrar a dicho paciente el inhibidor de transglutaminasa TG2 tisular seguido del potenciador.

Los inhibidores de TG2 son compuestos tiol seleccionados del grupo que consiste en cistamina, cisteamina, ácido lipoico, tiopronina, acetilcisteína, carboximetilcisteína, erdosteína, moguisteína, mesna y glutatión (GSH). El inhibidor de TG2 cistamina es particularmente preferido.

Las moléculas que pueden usarse como potenciadores de acuerdo con la presente invención se describen en:

30 • Davison H.R et al., "Fluorinated DF508-CFTR correctors and potentiators for PET imaging, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 (2012) 1602-1605;

• Becq F et al., "Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside", Journal of Cystic Fibrosis Volume 10 Suppl 2 (2011) S129-S145;

35 • Moran O, "Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators", Journal of Theoretical Biology 262 (2010) 73-79;

En una realización preferida, el potenciador son los compuestos VX770 (Flume PA et. al., para el grupo de estudio VX08-770-104. Ivacaftor in Subjects with Cystic Fibrosis who are Homozygous for the F508del-CFTR Mutation. Chest. Marzo 1 de 2012).

40 Ramsey BW et al, VX08-770-102 Study Group A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D Mutation. N Engl J Med. 3 de noviembre de 2011; 365 (18): 1663-72.

Accurso FJ et al, Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. N Engl J Med. 2010 Nov 18; 363 (21): 1991-2003).

En una realización de la invención, el inhibidor de TG2 se administra al paciente durante un período de 1 a 4 semanas, preferiblemente durante un período de 1 a 2 semanas.

45 Al final de dicho período de tiempo, la administración del inhibidor de TG2 se detiene y la administración del potenciador se inicia y se prolonga.

50 En un régimen terapéutico alternativo, la administración del inhibidor de TG2 se reanuda periódicamente a intervalos de 4 a 6 semanas durante la administración del potenciador, dependiendo de la respuesta del paciente al potenciador. En particular, el suministro de inhibidor de TG2 será necesario cada vez que disminuyan los efectos del tratamiento con potenciadores y los síntomas de CF tales como la función pulmonar empeoren significativamente o aumenten significativamente los marcadores de inflamación, disfunción pancreática o afectación hepática, así como las concentraciones de electrolitos en el sudor. En este caso, la administración de inhibidor de TG2 durante la

terapia con potenciadores debería durar el tiempo necesario para la recuperación del paciente de los síntomas de fibrosis quística, generalmente durante un período de 1 a 4 semanas.

5 El inhibidor de TG2 y el potenciador se administran preferiblemente a través de las vías oral, respiratoria o parenteral. En general, la forma farmacéutica y la vía de administración se determinarán con base en la molécula específica seleccionada para la terapia.

En otra realización de la invención, un agente que posee actividad de inhibidor o potenciador de TG2 se administra conjuntamente con el inhibidor o el potenciador de TG2. Estos agentes son preferiblemente flavonoides seleccionados de quercetina, silibina, genisteína, apigenina, catequina, epigallocatequina, antocianidinas.

10 La combinación para uso en el tratamiento terapéutico de acuerdo con la presente invención se administra convenientemente a sujetos diagnosticados mediante pruebas genéticas positivas para mutaciones $\Delta F508$ y prueba de sudor positiva, así como a lactantes diagnosticados tempranamente por cribado neonatal con el fin de prevenir precozmente daño pulmonar.

15 La dosis de inhibidor y de potenciador de TG2 se adaptará a la situación específica teniendo en cuenta la edad del paciente, las condiciones generales de salud, el peso, otras terapias concomitantes y la capacidad de respuesta al tratamiento combinado a lo largo del tiempo.

20 Otra realización es una composición farmacéutica que contiene un inhibidor y/o un potenciador de TG2 como se definió anteriormente, para usar en un método para el tratamiento de la fibrosis quística $\Delta F508$ de acuerdo con la presente invención. La composición está en una forma farmacéutica adecuada para administración oral, en aerosol o parenteral y contiene una cantidad efectiva de ingredientes activos junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y las figuras anexas.

Descripción de las figuras

25 Figura 1. La cistamina y el EUK-134 mantienen la función del canal de $\Delta F508$ -CFTR más allá del lavado del fármaco y permiten la acción de los potenciadores genisteína o Vrx-532 en células epiteliales nasales recién cepilladas aisladas de pacientes con CF homocigota $\Delta F508$ -CFTR.

30 (A, B) Se incubaron células epiteliales nasales cepilladas recientemente aisladas de 5 pacientes homocigotos $\Delta F508$ -CFTR durante 18 horas con medio o Vrx-325, Corr-4a, cistamina o EUK-134, se lavaron y luego se mantuvieron con medio solo durante 24 horas. Las células epiteliales nasales cepilladas de 5 controles sin CF se cultivaron con medio solo (WT/WT: medio). Evaluación del flujo de yoduro mediante un ensayo de fluorescencia (SPQ) tras la estimulación con forskolina (Fsk) más (A) genisteína (Gen) o (B) Vrx-532. Intensidad de fluorescencia SPQ (unidades arbitrarias) (arriba) y velocidad de flujo de cloruro (abajo) medida en al menos 50 células por experimento. Media \pm SD de 3 experimentos; * P < 0,01 frente a $\Delta F508/\Delta F508$ cultivadas con medio ($\Delta F508/\Delta F508$: medio); ANOVA.

35 Figura 2 . La incubación previa con cistamina sostiene $\Delta F508$ -CFTR en la superficie epitelial de las vías respiratorias y permite la actividad de la genisteína para controlar los signos de inflamación constitutivos o inducidos por LPS más allá del lavado de cistamina en la mucosa nasal de pacientes con CF homocigotos $\Delta F508$ -CFTR.

40 (A, B) Biopsias de pólipos nasales de pacientes homocigotos $\Delta F508$ cultivados durante 18 horas con medio o cistamina, seguido de 36 horas de incubación con medio solo. (A) imágenes confocales de CFTR. Datos representativos de cinco pacientes. Barra de escala 10 μ m. (B) Imágenes confocales de detección *in situ* de la actividad de TG2 y fosfotirosina (Ab anti-PY-99). Datos representativos de cinco pacientes. Barra de escala 10 μ m. (C) Izquierda, biopsias de pólipos nasales de pacientes con $\Delta F508/\Delta F508$ (n = 5) pulsados durante 30 minutos con medio o genisteína (Gen) seguido por 4 horas de exposición a AP - LPS. Derecha, pulsos de 30 minutos con genisteína (Gen) seguido por 4 horas de exposición a AP-LPS en biopsias de pólipos nasales de pacientes con $\Delta F508/\Delta F508$ (n = 5) tratados previamente con cistamina durante 18 horas, luego se lavan y se mantienen en medio solo durante 24 horas. Imágenes de microscopía confocal de fosfotirosina (Ab anti-PY-99). Al menos 30 campos fueron muestreados aleatoriamente en tres portaobjetos de cada paciente. Barra de escala, 10 μ m.

45 Figura 3 . El tratamiento previo con cistamina permite la actividad de la genisteína para controlar la inflamación pulmonar en ratones homocigotos Cfr^{F508del} más allá del lavado de la cistamina.

50 (A, B) Se trataron ratones Cfr^{F508del} por vía intraperitoneal (i.p.) durante 7 días con PBS o cistamina, seguido de 10 días de PBS (n = 7 ratones por cada grupo de tratamiento). (A) Imágenes de microscopía confocal de CFTR (clon H182). (B) análisis de PCR cuantitativa de los niveles de expresión de TNF- α en homogeneizados de pulmón (izquierda), detección por ELISA de niveles de proteína MIP-2 en homogeneizados de pulmón (centro) y número de macrófagos CD68⁺ (por mm² de tejido pulmonar) contados en 15-20 campos diferentes seleccionados aleatoriamente por pulmón por ratón para cada grupo experimental (derecha). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 en comparación con ratones tratados con PBS (ANOVA). (C) Ratones Cfr^{F508del} (n = 5 ratones por grupo de

tratamiento) tratados con cistamina en aerosol o vehículo durante 7 días seguido por PBS en aerosol durante 10 días y luego pulsados una vez con genisteína intraperitoneal (Gen) seguido por exposición a PA-LPS en aerosol. La expresión de TNF- α y el recuento de macrófagos CD68⁺ medidos como en (B). Los datos representan dos experimentos combinados (n = 5 ratones por grupo). #P <0,05, ##P <0,01, frente a ratones tratados con PBS, respectivamente; §P <0,05; ANOVA.

Ejemplo 1: la cistamina y los antioxidantes inducen y mantienen la función de canal del Δ F508-CFTR rescatado en células epiteliales nasales cepilladas primarias de pacientes Δ F508/ Δ F508

Se examinó si la cistamina o EUK-134 (Luciani A, 2010) inducirían y sostendrían la expresión funcional de Δ F508-CFTR en células epiteliales nasales recién cepilladas aisladas de pacientes Δ F508/ Δ F508 (Tabla 1A). Se usaron células epiteliales nasales primarias recién obtenidas de pacientes homocigotos Δ F508-CFTR, para probar directamente la eficacia de estas estrategias de rescate de autofagia sobre la función de CFTR en las vías respiratorias humanas. Se utilizó un ensayo de flujo de haluro SPQ basado en fluorescencia (Silvis MR, 2009) para probar la respuesta a un pulso corto de forskolina (FSK) agregado junto con dos potenciadores de CFTR diferentes, genisteína o VX-532 (Van Goor F, 2010) y se analizaron al menos 50 células nasales cepilladas para el grupo de tratamiento en cada paciente. Las células epiteliales nasales cepilladas recién aisladas se incubaron durante 18 horas con cistamina o EUK-134 o con los correctores de CFTR conocidos Corr-4a y VRT-325. Los ensayos de flujo de haluro SPQ revelaron que, a diferencia de Corr-4a y VRT-325, que solo tenían escasos efectos, la exposición transitoria (18 horas, seguida de lavado y nuevo cultivo durante 24 horas con medio) a cistamina y EUK-134 volvieron a las células capaces de conservar la respuesta de Δ F508-CFTR a un pulso corto de forskolina (FSK) añadida junto con cualquiera de los dos potenciadores de CFTR, genisteína o VX-532 (Figura 1).

Métodos

Muestras humanas: células epiteliales nasales cepilladas.

Las células epiteliales nasales recién aisladas por cepillado nasal de 5 pacientes con Fc portadores de las mutaciones de Δ F508/ Δ F508-CFTR (véase la Tabla 1A) y 5 controles de la misma edad y género sin CF (3F, edad media 12,5 años) se sumergieron en solución de lavado (PBS, DTT 2 mM, EDTA 10 mM) a 37°C durante 1 hora en un agitador térmico, se centrifugaron a 2.300 x g durante 20 minutos y se lavaron en PBS. Las células aisladas se mantuvieron en 1 mL de medio de MEN-sal de Earl-L-glutamina complementado con 10% de FBS y la cantidad apropiada de penicilina/estreptomicina³¹. Se cultivaron células nasales cepilladas durante 18 horas con medio, Vrx-325, Corr-4a (10 μ M hasta 50 μ M) (proporcionadas gentilmente por Cystic Fibrosis Foundation, EE. UU.), cistamina (250 μ M, Sigma-Aldrich), EUK-134 (50 μ g mL⁻¹, Vinci Biochem), seguido de 24 horas de incubación con medio solo.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos y el comité de ética de la Universidad de Nápoles Federico II aprobó el estudio (No. 290/09).

Tabla 1A. Características clínicas de pacientes con fibrosis quística

Pacientes #	1	2	3	4	5
Género;	F	M	F	M	F
Edad*	11,2	13,2	12	15	10,1
Edad al momento del diagnóstico*	1,2	0,9	2,4	0,8	1,6
Genotipo	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508
Insuficiencia Pancreática	Si	Si	Si	Si	Si
infección respiratoria crónica (PA)	Si	No	Si	Si	No
FEV1 media, % predicho	78	72	73	69	70
# número del paciente * (años, meses)					

35 Eflujo de yoduro. El indicador fluorescente sensible al yoduro, SPQ (Molecular Probes, Eugene, OR) (Silvis MR, 2009) se introdujo en las células en una solución hipotónica de regulador de yoduro (en mM: 130 NaI, 4 KNO₃, 1 Ca(NO₃)₂, 1 Mg(NO₃)₂, 10 glucosa y 20 HEPES, pH 7,4) diluido 1:1 con agua y que contiene una concentración final

de SPQ 10 μM . Las células se cargaron durante 20 minutos a 37°C en una cámara humidificada con 5% de CO_2 . Las células cargadas con SPQ se montaron luego en un microscopio confocal LSM510 Meta con una platina calentada a 37°C y se perfundieron con regulador de yoduro. Los cambios en fluorescencia de SPQ mediados por CFTR se controlaron a una longitud de onda de 445 nm en respuesta a la excitación a 340 nm durante la perfusión a 37°C en regulador de nitrato (NaI reemplazado con NaNO_3 130 mM) durante 10 min con forskolina 20 μM más genisteína 50 μM o forskolina 20 μM más VRX-532 20 μM (gentilmente proporcionados por Cystic Fibrosis Foundation, EE. UU.). La tasa máxima de flujo de yoduro (generalmente 12 min después de la forskolina más genisteína o forskolina más Vrx-532) de las células tratadas o no tratadas se calculó de acuerdo con la relación de Stern-Volmer de la siguiente manera:

$$(F_o/F) - 1 = KC_Q$$

en donde F es la fluorescencia observada, F_o es la fluorescencia en ausencia de un anión de extinción, C_Q es la concentración del anión de extinción, y K es la constante de extinción de Stern-Volmer. Las tasas se calcularon usando SigmaPlot versión 7.1 para cada traza de fluorescencia media generada a partir de las 50 células examinadas por población por cubreobjetos.

Análisis estadístico. Los datos se informan como la media aritmética \pm SD. La distribución de los datos se analizó para normalidad y el análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican en las figuras. Todos los datos se obtuvieron a partir de mediciones independientes. Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS 13. La significancia estadística se definió como el valor P de $<0,05$.

Ejemplo 2: la cistamina restablece la expresión de $\Delta\text{F508-CFTR}$ en la mucosa del pólipo nasal humano de pacientes con CF

Para traducir estos hallazgos a las vías aéreas con CF humanas, se utilizó un modelo *ex vivo* de biopsias de pólipos nasales cultivados pertenecientes a pacientes con CF, una herramienta útil para probar estrategias potenciales de modulación de la respuesta de la mucosa a desencadenantes ambientales dentro de su entorno natural (Raia V, 2005, Maiuri L, 2008).

Las biopsias de pólipos nasales de cinco pacientes $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ (Tabla 1B) se trataron con cistamina durante 18 horas, se lavaron y luego se cultivaron durante otras 36 horas en ausencia de cistamina. La microscopía confocal reveló que el rescate de CFTR mediado por cistamina en la superficie epitelial persistió durante 36 horas después de la extracción de cistamina. Por otra parte, la reducción de los signos de inflamación de la mucosa inducida por la cistamina, como la activación de TG2 y la fosforilación de la proteína tirosina, persistió después de 36 horas de lavado (Figura 2).

A continuación, las biopsias de pólipos nasales de $\Delta\text{F508}/\Delta\text{F508}$ se pulsaron durante 30 min con genisteína seguido de 4 horas de incubación con PA-LPS. La genisteína no fue efectiva para reducir la fosforilación de la proteína epitelial. Para examinar si el pretratamiento con cistamina fue eficaz para permitir la acción de la genisteína en las vías respiratorias humanas, las biopsias de pólipos nasales se incubaron con cistamina o medio durante 18 horas, luego se lavaron y mantuvieron en medio solo durante 24 h y finalmente se pulsaron durante 30 min con genisteína seguida de 4 h con PA-LPS. En este contexto experimental, se observó un efecto sinérgico del tratamiento secuencial con cisteína más genisteína (Figura 2).

Nuestros resultados indican que en nuestro sistema la genisteína no tiene ningún efecto por sí misma, sino que potencia la actividad de $\Delta\text{F508-CFTR}$ que todavía reside en la superficie epitelial mucho más allá del lavado después del pretratamiento con cistamina.

Métodos

Muestras humanas: cultivos *ex vivo* de biopsias de mucosa de pólipo nasal. Las biopsias de pólipos nasales de 5 pacientes homocigotos ΔF508 sometidos a tratamiento quirúrgico para poliposis nasal no alérgica (véase la Tabla 1B) se cultivaron como se describió previamente, 7,19, 32 durante 18 horas con medio, cistamina o EUK-134, seguido de 36 horas de incubación con medio solo, y luego se pulsó durante 30 min con medio o genisteína seguido de 4 horas de exposición a PA-LPS.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos y el comité de ética de la Universidad de Nápoles Federico II aprobó el estudio (No. 290/09).

Tabla 1B. Características clínicas de pacientes con fibrosis quística

Pacientes #	1	2	3	4	5
Género;	F	F	M	M	M
Edad*	13,5	12,7	13,3	11,8	9,7

Edad al momento del diagnóstico*	0,5	6,3	1,6	0,4	0,6
Genotipo	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508	Δ F508/ Δ F508
Insuficiencia Pancreática	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
infección respiratoria crónica (PA)	Sí	No	Sí	Sí	Sí
FEV1 media, % predicho	72	68	80	74	83
# número del paciente * (años, meses)					

Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los procedimientos se realizaron como se describió previamente.

5 Secciones de tejido humano: se fijaron secciones de tejido de pulmón humano congelado de 5 micrómetros en acetona durante 10 minutos. Las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos indicados (Ab). Las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los Ab primarios. Los Ab primarios fueron: CFTR 1:100 (CF3, Abcam), CFTR 1:100 (H-182, Santa Cruz Biotechnology) (utilizado en tejido de ratón), fosfotirosina 1:200 (Santa Cruz Biotechnology), página 62 1:300 (Sigma). Estos fueron seguidos por incubación con Alexa 488 o 546 anticuerpos secundarios (Molecular Probe, Invitrogen). Los datos se analizaron mediante examen de fluorescencia por una unidad de barrido con láser confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Alemania).

10 Detección *in situ* de la actividad de la Exzyme TG2. La actividad de TG2 en muestras de tejido se detectó incubando secciones no fijadas con monodansilcadaverina biotinilada durante 1 ha 37°C. La incorporación del sustrato marcado se visualizó mediante incubación con estreptavidina conjugada con Alexa 546 (1:100; Molecular Probes, Invitrogen) durante 30 minutos.

15 Análisis estadístico. Los datos se reportaron como la media aritmética \pm SD. La distribución de los datos se analizó para la normalidad y el análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía. Las diferencias significativas se indican en las figuras. Todos los datos se obtuvieron a partir de mediciones independientes. Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS 13. La significancia estadística se definió como el valor P de <0,05.

20 Ejemplo 3: la cistamina restablece la expresión funcional de Δ F508-CFTR en ratones Cfr^{F508del} y asegura un control prolongado de la inflamación pulmonar mucho más allá del lavado del fármaco

25 Aquí se examinó si la restauración farmacológica previa de la autofagia por cistamina podría anular la falta de eficacia informada de los potenciadores de CFTR *in vivo* en las vías aéreas homocigóticas Δ F508-CFTR. Primero, para probar si la cistamina podría prolongar la expresión de Δ F508-CFTR en la superficie del epitelio pulmonar más allá del lavado del fármaco, se les administró a ratones Cfr^{F508del} por vía intraperitoneal (i.p.) durante 7 días con vehículo solo o cistamina, un régimen que puede mejorar la inflamación pulmonar *in vivo*, o con cistamina (7 días) seguido de 10 días de vehículo solamente. En este modelo experimental, los efectos de la cistamina en el mantenimiento de la reubicación de la proteína F508 en la superficie epitelial respiratoria y en la reducción de la inflamación pulmonar persistieron durante 10 días después de la eliminación de la cistamina y fueron anulados por el tratamiento intraperitoneal con 3-MA durante la fase de eliminación. (Figura 3)

30 A continuación, nos preguntamos si estos efectos prolongados de la cistamina podrían permitir la acción beneficiosa de los potenciadores en las vías aéreas homocigóticas Δ F508-CFTR. Para abordar esta hipótesis, otro grupo de 5 ratones Cfr^{F508del} se trató con inhalaciones diarias de cistamina en aerosol (0,2 mg/ratón/día) durante una semana, un régimen que redujo la inflamación pulmonar, se mantuvo durante otra semana sin tratamiento, y luego secuencialmente pulsado con genisteína y PA-LPS en aerosol, como se detalló anteriormente. La genisteína mejoró aún más los efectos del tratamiento previo con cistamina y, por lo tanto, redujo significativamente los signos de inflamación pulmonar, pero no tuvo efecto por sí mismo en ratones que no habían sido tratados previamente con cistamina (Figura 3). La cistamina y la genisteína no fueron efectivas en los compañeros de camada de tipo silvestre. Estos resultados indican que el restablecimiento previo de proteostasis y la restauración de la autofagia pueden crear las condiciones en las cuales los potenciadores de CFTR se vuelven capaces de aliviar la inflamación pulmonar.

Métodos

Ratones y tratamientos. Se utilizaron ratones con CF homocigóticos para la mutación Δ F508-CFTR (abreviado Cfr^{F508del})^{7,29,30} en el emparejamiento de la progenie 129/FVB (Cfr^{trm1EUR}, F508del, FVB/129).

- Estos estudios y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para Bienestar Animal local (IACUC No. 382) y se ajustaron a las normas de la Comunidad Europea para el uso de animales en investigación (CEE No. 86/609). Los ratones homocigotos Cfr^{F508del} anestesiados se trataron con inyecciones intraperitoneales diarias de cistamina (100 µL de 0,01 M en PBS) o PBS durante 7 días o con cistamina (7 días) seguidos por 10 días de PBS solamente (n = 7 ratones por grupo). Otros grupos de ratones Cfr^{F508del} se trataron mediante administración intraperitoneal o inhalación de cistamina nebulizada (0,2 mg/ratón/día) o vehículo durante una semana y 7 días después de la retirada de cistamina se pulsaron con una sola administración intraperitoneal de genisteína (50 mg kg⁻¹) seguido por una exposición a PA-LPS en aerosol (10 µg/20 g de peso corporal) (n = 7 ratones por grupo).
- 5
- Análisis de PCR de transcripción inversa en tiempo real. Se extrajo el ARN total con el Kit RNeasy Mini (Qiagen). Se transcribió de forma inversa el ARNm con un sistema de síntesis de primera cadena SuperScript^{MR} III (Invitrogen). Se realizó RT-PCR cuantitativa con un Detector de PCR en tiempo real iCycler iQ Multicolor (Bio-Rad) con la súper mezcla iQ^{MR} SYBR Green (Bio-Rad). Los niveles de expresión de los genes se normalizaron a los niveles de GAPDH en la misma muestra. Las cantidades relativas de ARNm se calcularon usando el método comparativo Ct. Se realizaron análisis de RT-PCR en tiempo real para evaluar la eficacia de TNF-α. Las secuencias de los cebadores de TNFα fueron: directo: CCACCACGCTCTTCTGTCTA; inverso: AGGGTCTGGCCATAGAACT.
- 10
- 15
- ELISA. Se midió la secreción de MIP-2 de ratón usando el kit II de ELISA MIP-2 BD OptEIA^{MR} (BD Biosciences). Los valores se normalizaron para 10⁶ células; los resultados se expresan como la media ± SD.
- Determinación del número de macrófagos. Se prepararon secciones de criostato (5 µm) a partir de tejidos de pulmón de ratones Cfr^{F508del}. Se fijó la sección sobre portaobjetos de vidrio con acetona, se lavó con PBS-Tween (0,2%) y luego se incubó durante la noche a 4°C con una dilución 1:50 de CD68 de rata monoclonal (Acris) en PBS. Esto fue seguido de incubación con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa-488 (1:100, Molecular Probes) y contratinción nuclear con DAPI (Invitrogen). Luego se examinaron en un microscopio confocal LSM 510 (Zeiss). El análisis del número de macrófagos se realizó mediante el software Image J y cada punto de datos se expresó como la media ± SD por triplicado de tres experimentos independientes.
- 20
- 25
- Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Los procedimientos se realizaron como se describió previamente (Luciani A, 2010).
- Tejidos de pulmón de ratones: se fijaron secciones de tejido de pulmón congelado de siete micrómetros de cada ratón en acetona durante 10 minutos. Las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los Ab primarios. Los Ab primarios fueron: CFTR 1:100 (CF3, Abcam), CFTR 1:100 (H-182, Santa Cruz Biotecnología) (utilizado en tejido del ratón), fosfotirosina 1:200 (Santa Cruz Biotecnology), página 62 1:300 (Sigma). Estos fueron seguidos por incubación con anticuerpos secundarios Alexa 488 o 546 (Molecular Probe, Invitrogen). Los datos se analizaron bajo examen de fluorescencia mediante una unidad de barrido láser confocal LSM510 Zeiss (Carl Zeiss, Alemania).
- 30
- Detección *in situ* de la actividad de Exzyme TG2. La actividad de TG2 en muestras de tejido se detectó incubando secciones no fijadas con monodansilcaverina biotinilada durante 1 h a 37°C. La incorporación del sustrato marcado se visualizó mediante incubación con estreptavidina conjugada con Alexa 546 (1:100; Molecular Probes, Invitrogen) durante 30 minutos.
- 35
- Análisis de inmunotransferencia. La proteína de los homogeneizados de pulmón se obtuvo de ratones tratados y no tratados y las cantidades de proteínas se determinaron mediante un ensayo de proteína Bio-Rad para garantizar una carga igual de proteína antes del análisis de transferencia de Western. Se cargaron 50 microgramos de proteína en cada carril. Se usaron anticuerpos contra p62, 1:1.000 (Sigma) y αβ-tubulina, 1:1.000 (Cell Signaling Technology) como anticuerpos primarios. El análisis densitométrico se realizó con el software Image J; cada punto de datos se expresa como la media ± SD por triplicado de tres experimentos independientes.
- 40
- Referencias
- 45
- O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet 2009; 373: 189-04.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. N Engl J Med 2005; 352: 1992-01.
- Accurso FJ. Update in cystic fibrosis 2005. Am J Respir Crit CareMed 2006; 173: 944-47.
- Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science 1992; 256: 774-779.
- Park HW, Nam JH, Kim JY, Namkung W, Yoon JS, Lee JS et al. Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by [Cl⁻]_i and its role in pancreatic bicarbonate secretion. Gastroenterology 2010; 139: 620-631.
- 50
- Okiyonedá T, Barrière HORAS, Bagdany M, Rabeh WM, Du K, Hohfeld J, et al. Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. Science 2010; 329: 805-10.
- Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevínek P, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. N Engl J Med. 2011; 365: 1663-72.

- Dauids PB. Therapy for cystic fibrosis--the end of the beginning? N Engl J Med. 2011; 365: 1734-5.
- Lukacs GL, Verkman AS. CFTR: folding, misfolding and correcting the $\Delta F508$ conformational defect Trends Mol Med 2012; 18: 81-91.
- 5 Belcher CN, Vij N. Protein processing and inflammatory signaling in Cystic Fibrosis: challenges and therapeutic strategies. Current Mol Med 2010;10: 82-94.
- Clancy JP, et al, Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. Thorax 2012; 67: 12-8.
- Elborn S. Fixing cystic fibrosis CFTR with correctors and potentiators. Off to a good start. Thorax 2012; 67: 4-5.
- 10 Maiuri L, et al. Tissue transglutaminase activation modulates inflammation in cystic fibrosis via PPAR γ downregulation. J Immunol. 2008; 180: 7697-705.
- Luciani A, al. SUMOylation of tissue transglutaminase as link between oxidative stress and inflammation. J Immunol. 2009; 183: 2775-84.
- Luciani A, et al. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROSmediated autophagy inhibition. Nat Cell Biol. 2010; 12: 863-75.
- 15 Luciani A, et al. Cystic fibrosis: a disorder with defective autophagy. Autophagy 2011; 7: 104-6.
- Abdulrahman BA, et al. Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by Burkholderia cenocepacia in a model of cystic fibrosis. Autophagy. 2011; 7: 1359-70.
- Varga K, et al., Biochem. J. 2008; 410, 555.
- 20 Silvis MR, et al. Rab11b regulates the apical recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in polarized intestinal epithelial cells. Mol Biol Cell. 2009; 20: 2337-50.
- Van Goor F et al. Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. AJP - Lung Physiol. 2006; 260: L1117-L1130.
- Raia V, et al. Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase controls airway inflammation in cystic fibrosis Thorax 2005; 60, 773-80.
- 25 Listado de secuencias
- <110> I.E.R.F.C. EUROPEAN INSTITUTE FOR CYSTIC FIBROSIS RESEARCH
- <120> Terapia combinada para fibrosis quística
- <130> 2636EUR
- <160> 2
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Desconocido
- 35 <220>
- <223> cebador artificial
- <400> 1
- ccaccacgct cttctgtcta 20
- <210> 2
- 40 <211> 20
- <212> ADN

ES 2 656 321 T3

<213> Desconocido

<220>

<223> cebador artificial

<400> 2

5 aggtctggg ccatagaact 20

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de:
- a) un inhibidor de transglutaminasa tisular TG2 que se selecciona del grupo que consiste en cistamina, cisteamina, ácido lipoico, tiopronina, acetilcisteína, carboximetilcisteína, erdosteína, moguisteína, mesna y glutatión (GSH)
- 5 y
- b) un activador de canal (potenciador) del regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR), para uso en un método de tratamiento de un paciente con fibrosis quística que porta la mutación $\Delta F508$ -CFTR, que comprende la administración a dicho paciente del inhibidor de transglutaminasa tisular TG2 seguido por el potenciador
- 10 2. Una combinación para uso en un método como se define en la reivindicación 1, en la que dicho inhibidor de TG2 es cistamina.
3. Una combinación para uso en un método como se define en la reivindicación 1, en la que el potenciador es el compuesto VX-770.
- 15 4. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en la reivindicación 1, en la que el inhibidor de TG2 se administra durante un período de 1 a 4 semanas.
5. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en la reivindicación 1, en la que el inhibidor de TG2 se administra por un período de 1 a 2 semanas.
- 20 6. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en las reivindicaciones 1 y 4-5, en la que al final de dicho período de tiempo, se detiene la administración del inhibidor de TG2 y se inicia la administración del potenciador.
7. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en las reivindicaciones 1 y 6, en la que la administración del inhibidor de TG2 se reanuda a intervalos de 4 a 6 semanas durante la administración del potenciador.
- 25 8. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en las reivindicaciones 1 y 7, en la que dicha administración reanudada de inhibidor de TG2 se lleva a cabo durante un período de 1 a 2 semanas.
9. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el inhibidor de TG2 y el potenciador se administran a través de vías oral, respiratoria o parenteral.
- 30 10. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la administración conjunta, en concomitancia con el inhibidor de TG2 o el potenciador, de un compuesto seleccionado de quercetina, silibina, genisteína, apigenina, catequina, epigallocatequina y antocianidinas.
- 35 11. Una combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en un método de tratamiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el sujeto que necesita tratamiento es genéticamente diagnosticado como positivo para fibrosis quística $\Delta F508$ o es positivo para la prueba de sudor
12. Una composición farmacéutica que contiene un inhibidor de TG2 y/o un potenciador como se define en la reivindicación 2 o la reivindicación 3 junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para uso en un método para el tratamiento de la fibrosis quística $\Delta F508$ como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

40

FIGURA 1

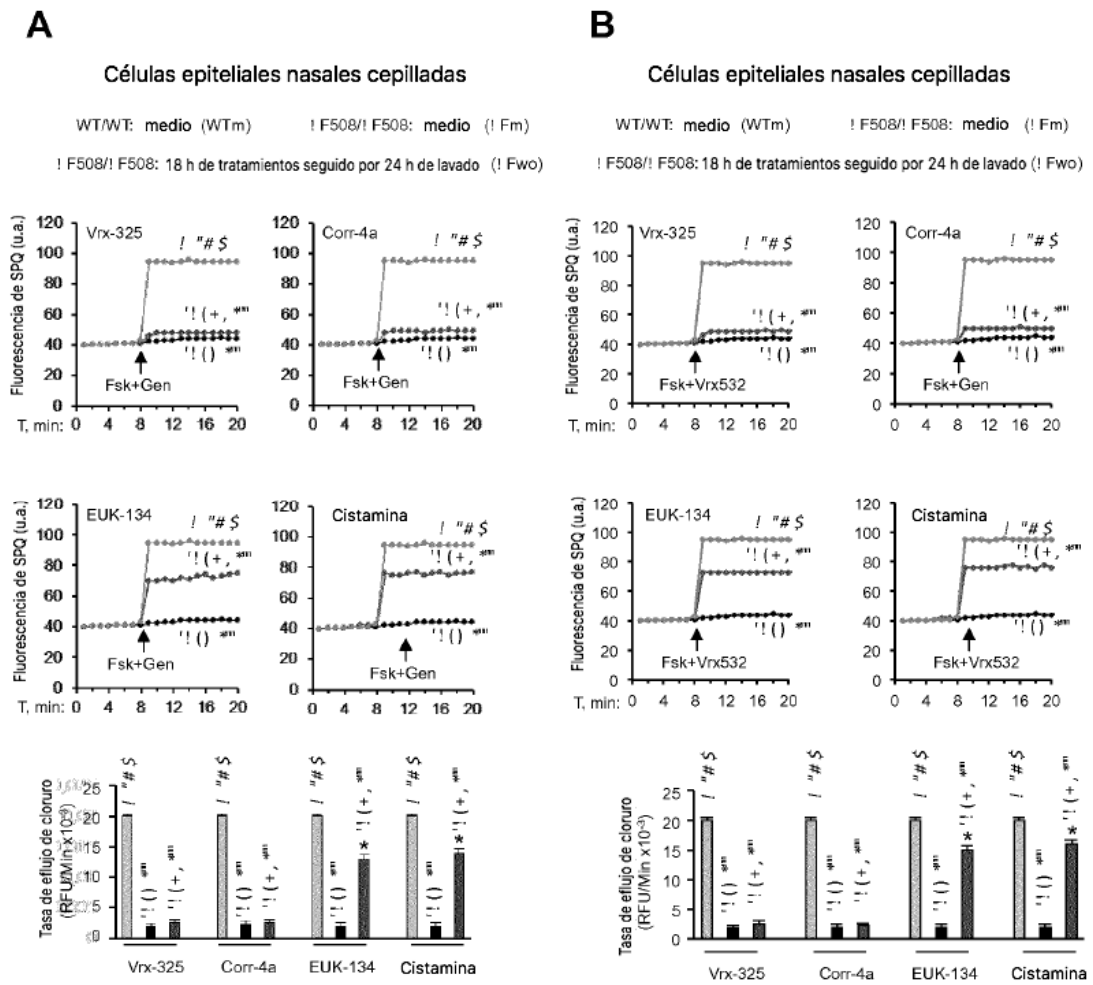


FIGURA 2

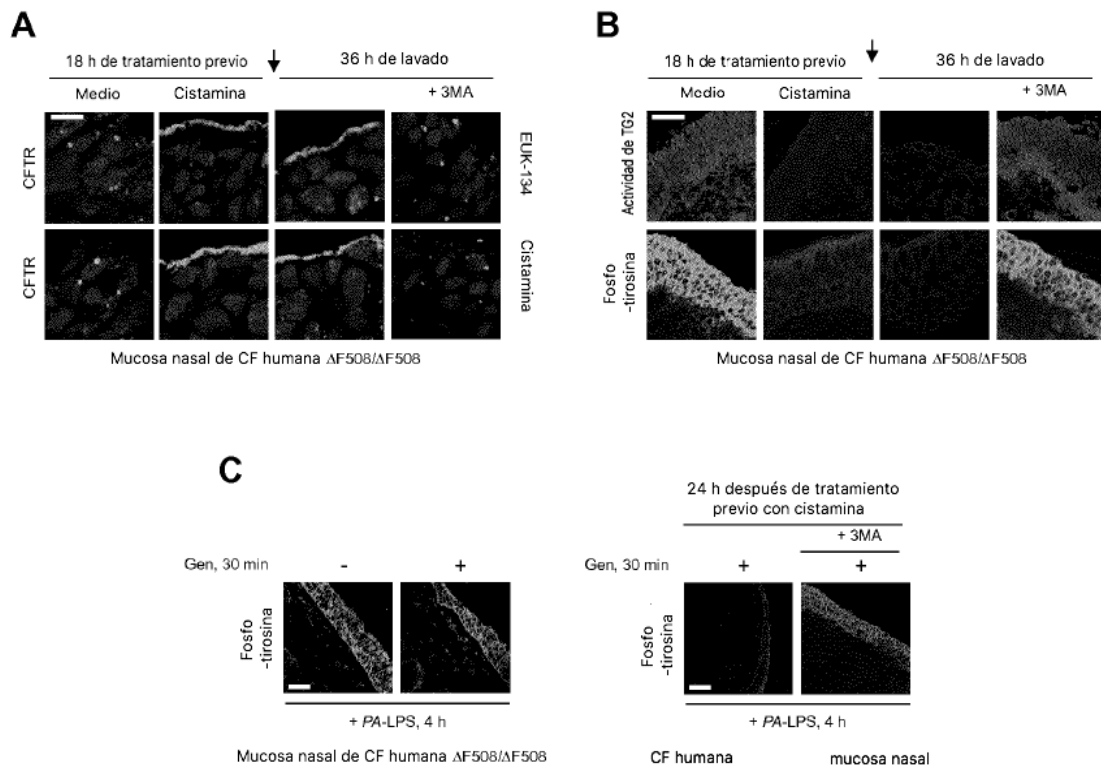


FIGURA 3

