

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 105**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2015 PCT/GB2015/051377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15173551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2015 E 15724354 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 3142701**

54 Título: **Nuevo tratamiento**

30 Prioridad:

12.05.2014 GB 201408384

07.10.2014 GB 201417719

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

18.09.2018

73 Titular/es:

VERONA PHARMA PLC (100.0%)

One Central Square

CardiffCF10 1FS, GB

72 Inventor/es:

ABBOTT-BANNER, KATHARINE;

HANRAHAN, JOHN y

THOMAS, DAVID

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 682 105 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

Nuevo tratamiento

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de la fibrosis quística (FQ).

10 **Antecedentes de la invención**

El CFTR controla la conductancia transmembrana y la secreción de Cl⁻ en células epiteliales. Por tanto, controla el movimiento de fluidos a través de las membranas. La actividad deficiente del CFTR puede conducir a fluidos insuficientes en las vías respiratorias u otros órganos, que es indeseable.

15 Varias enfermedades se asocian a disfunciones del CFTR, la más importante la fibrosis quística. La fibrosis quística es el trastorno genético fatal más común en seres humanos de herencia europea y se estima que entre 1 en 2000 y 1 en 3000 recién nacidos en la Unión Europea se ven afectados de FQ.

20 RPL554 (9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimid[6,1-a]isoquinolin-4-ona) es un inhibidor doble de PDE3/PDE4 y se describe en el documento WO 00/58308. Como inhibidor combinado de PDE3/PDE4, se sabe que RPL554 tiene actividad tanto antiinflamatoria como broncodilatadora. El documento WO 00/58308 sugiere el uso de varios compuestos, incluyendo RPL554, como fármacos antiinflamatorios para tratar los síntomas de varias enfermedades, incluyendo la FQ.

25 Aunque los fármacos antiinflamatorios con frecuencia son útiles en el tratamiento de los síntomas de algunas afecciones mediadas por una disfunción del CFTR, sigue existiendo una necesidad médica de tratamientos que sean capaces de abordar la etiología subyacente de dichas afecciones, mediante la modulación de la actividad del CFTR. A este respecto, se están desarrollando varios fármacos modificadores de la enfermedad para la fibrosis quística. Un ejemplo es ivacaftor (VX770), que se desvela en el documento WO 2011/0722241.

30 Los fármacos modificadores de la enfermedad para la fibrosis quística son una categoría de fármacos diferente de los antiinflamatorios. Adicionalmente, la inhibición de PDE3/PDE4 no se asocia necesariamente a la activación satisfactoria de CFTR. Por ejemplo, se descubrió que el inhibidor de la PDE4 (fosfodiesterasa 4) roflumilast no tiene ningún efecto sobre la secreción de Cl⁻ en células colónicas humanas T84 (Liu et al., *JPET*, (2005), 314: 846-854). No se ha observado ningún efecto sobre la secreción de Cl⁻ para la milrinona (un inhibidor de la PDE 3) después de la administración nasal a sujetos con CFTR de tipo silvestre (TS), CFTR con la mutación ΔF508 o CFTR con la mutación G551D (Smith et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1999), 20: 129-134). Se descubrió que el rolipram y Ro 20-1724 (ambos inhibidores de la PDE 4) no tienen ningún efecto sobre CFTR TS en células CHO (Chappe et al., *British Journal of Pharmacology*, (1998), 123: 683-693).

40 Cuando se descubre que los fármacos activan el CFTR, con frecuencia provocan diarrea como efecto secundario que es resultado de un mayor transporte de fluidos en el colon.

45 **Sumario de la invención**

Es un hallazgo sorprendente de la presente invención que RPL554 es activo en la modulación de la actividad de CFTR. Se ha descubierto que RPL554 activa el CFTR en células epiteliales bronquiales humanas primarias y también en monocapas de CFBE (estirpe celular epitelial humana CF inmortalizada) que expresan establemente CFTR TS. Además, RPL554 no tiene el efecto secundario de la diarrea habitualmente asociado a otros fármacos activos en CFTR.

También es un hallazgo de la invención que RPL554 puede interactuar sinérgicamente con antagonistas del receptor de leucotrienos para activar CFTR, aumentando la corriente de Cl⁻.

55 RPL554 es, por tanto, activo como un agente modificador de la enfermedad para el tratamiento de la fibrosis quística y otras enfermedades mediadas por la disfunción del CFTR.

60 En consecuencia, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis quística en un paciente mediante la modulación de la actividad del CFTR, cuyo compuesto es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimid[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

65 Los pacientes con fibrosis quística tienen una transferencia deficiente de fluidos a las vías respiratorias, lo que conduce a mucosidad viscosa, que es indeseable. La presente invención, por tanto, también proporciona un compuesto para su uso en el aumento de la movilidad de la mucosidad y/o en la reducción de la viscosidad de la mucosidad o para su uso en la facilitación del aclaramiento de la membrana mucosa de las vías respiratorias, en un

paciente que padece fibrosis quística, compuesto que es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirrido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

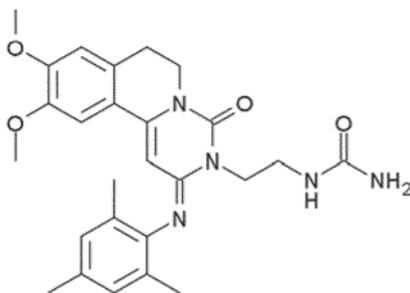
5 Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra los resultados de ensayos para la activación del CFTR de tipo silvestre (TS) en monocapas de células epiteliales bronquiales de fibrosis quística (CFBE, por sus siglas en inglés) en cámaras Ussing mediante RPL554 y forskolina.
- 15 La Figura 2 muestra los cursos temporales para la activación del CFTR TS en monocapas de células CFBE mediante RPL554, genisteína y forskolina.
- La Figura 3 muestra los cursos temporales para la activación del CFTR TS en células epiteliales bronquiales humanas (HBE, por sus siglas en inglés) primarias.
- 20 La Figura 4 muestra la concentración-respuesta de la forskolina (Fsk) para la corriente del CFTR en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés).
- La Figura 5 muestra la sensibilidad del CFTR en células CHO al inhibidor del CFTR Inh-172.
- La Figura 6 muestra la dependencia de la concentración de RPL554 como potenciador del CFTR en células CHO.
- 25 La Figura 7 muestra el curso temporal de activación del CFTR mediante RPL554 y de inhibición mediante Inh-172.
- La Figura 8 muestra la comparación de los efectos de RPL554 y VX770 sobre CFTR TS en células CHO durante la estimulación de forskolina submáxima.
- 30 La Figura 9 muestra los resultados de la actividad potenciadora para RPL554 en células CFBE que expresan CFTR $\Delta F508$.
- La Figura 10 muestra la potenciación del CFTR TS en células CFBE TS después de forskolina 1 μM .
- 35 La Figura 11 muestra los cursos temporales para la potenciación por RPL554 de CFTR-TS en células CFBE TS después de la estimulación con forskolina.
- La Figura 12 muestra la estimulación de corrientes de Cl^- mediante inhibidor de MRP4 (MK571) en células CFBE CFTR- $\Delta F508$ corregidas a baja temperatura.
- 40 La Figura 13 muestra la activación mediante RPL554 de corrientes de Cl^- mediante RPL554 en células CFBE CFTR- $\Delta F508$ corregidas a baja temperatura.
- 45 La Figura 14 muestra los resultados para MK571 (MRP4inh) + estimulación para DMSO, RPL554 e IBMX.
- La Figura 15 muestra los resultados después del pretratamiento con MK571 (MRP4inh) para DMSO, RPL554 e IBMX.
- 50 La Figura 16 muestra los cursos temporales para la activación y potenciación del CFTR en células HBE de un paciente $\Delta F508/R117H$.
- La Figura 17 muestra la comparación de la activación total del CFTR en células HBE de un paciente $\Delta F508/R117H$ con tratamiento con RPL554 y VX770 (Ivacaftor) después de un control, adenosina y forskolina a concentraciones bajas y altas.
- 55 La Figura 18 muestra el efecto sobre el I_{sc} medido de RPL554 solo ("control") o en combinación con Lumacaftor ("Lumacaftor") después de la estimulación con forskolina.
- 60 La Figura 19 muestra un curso temporal para la potenciación por RPL554 del CFTR en células HBE después de la estimulación con forskolina.

Descripción detallada de la invención

65 RPL554

La 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimid[6,1-a]isoquinolin-4-ona puede denominarse RPL554. RPL554 tiene la siguiente estructura:



- 5 Los nombres sistemáticos para RPL554 incluyen 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimid[6,1-a]isoquinolin-4-ona y N-{2-[(2E)-2-(mesitilimino)-9,10-dimetoxi-4-oxo-6,7-dihidro-2H-pirimid[6,1-a]isoquinolin-3(4H)-il]etil}urea.
- 10 El compuesto utilizado en el tratamiento de la invención puede ser RPL554 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable es una sal con un ácido farmacéuticamente aceptable.
- 15 Para evitar dudas, el RPL554 puede usarse, si se desea, en forma de solvato. Adicionalmente, para evitar dudas, el RPL554 puede usarse en cualquier forma tautomérica.

Enfermedades y afecciones

- 20 RPL554 puede activar, potenciar y mejorar el CFTR. RPL554 puede, por tanto, tratar la fibrosis quística mediante la modulación de la actividad del CFTR. El CFTR se expresa en varios tipos celulares y, en particular, en células epiteliales. Una función del CFTR es proporcionar un canal de cloruro a través de la membrana de células que producen mucosidad, sudor, saliva y lágrimas. Estos canales son vitales para la función de varios órganos, incluyendo los pulmones, el páncreas y el sistema digestivo.
- 25 Preferentemente, la modulación de la actividad del CFTR comprende la activación del CFTR, la potenciación del CFTR o la mejora del CFTR. Más preferentemente, la modulación de la actividad del CFTR comprende la activación del CFTR.
- 30 El compuesto puede usarse para aumentar la movilidad de la mucosidad o reducir la viscosidad de la mucosidad en un paciente que padece fibrosis quística. El compuesto puede usarse para facilitar el aclaramiento de la membrana mucosa de las vías respiratorias en un paciente que padece fibrosis quística.

Pacientes

- 35 RPL554 pueden modular la actividad del CFTR de tipo silvestre o el CFTR mutante. Normalmente, el paciente tiene una mutación del CFTR. Se ha detectado una gran cantidad de mutaciones del CFTR en individuos que padecen FQ y otros trastornos relacionados con el CFTR. Los ejemplos de mutaciones comunes incluyen F508del (Δ F508), G542X, G551D, N1303K, W1282X, R117H, R553X, P537H, G85E, 1717-1G->A, 621+1G->T, 2789+5G->A, 3849+10kbC->T, R1162X, G85E, 3120+1G->A, I507del (Δ I507), 1898+1G->A, 1898+5G->T, 3659delC, R347P, R560T, R334W, A455E, 2184delA, 3898insC, 3120+1kdel8.6kb y 711+1G->T. Dichas mutaciones pueden clasificarse por su efecto. Existen 6 clases de mutaciones del CFTR. Normalmente, la mutación del CFTR es una mutación de clase III o clase IV. Por ejemplo, la mutación puede ser una mutación de compuerta. Una mutación de compuerta es una mutación que disminuye la apertura del canal en las proteínas CFTR en la membrana. La mutación del CFTR puede ser Δ F508, R117H, G542X, G551D, N1303K o W1282X. Preferentemente, la mutación del CFTR es Δ F508, R117H o G551D, por ejemplo, Δ F508. Por ejemplo, el paciente puede tener la mutación Δ F508 o la mutación R117H o ambas, las mutaciones Δ F508 y R117H.
- 45 Se ha demostrado que RPL554 es particularmente eficaz en la modulación de la mutación R117H en el CFTR, que provoca anomalías en la conductancia y la compuerta. Las mutaciones del CFTR que provocan defectos en la compuerta pueden clasificarse como mutaciones de clase III. Los ejemplos de mutaciones de clase III incluyen G551D, G178R, G551S, S549N y G1349D. Las mutaciones del CFTR que dan como resultado defectos en la conductancia se clasifican como mutaciones de clase IV. Los ejemplos de mutaciones de clase IV incluyen R117H, R347P, R117C y R334W. Por tanto, el paciente puede tener una mutación del CFTR seleccionada entre G551D, G178R, G551S, S549N, G1349D, R117H, R117C, R347P y R334W. Estos son ejemplos de mutaciones de compuerta del CFTR. Normalmente, el paciente tiene una mutación del CFTR que es R117H o G551D.
- 50
- 55

Otras mutaciones del CFTR se clasifican como mutaciones del CFTR de clase I, clase II, clase V y clase VI. Para las mutaciones de clase I, no se produce CFTR. Los ejemplos de mutaciones de clase I incluyen G542X, W1282X, R553X y 621+1G→T. Para pacientes que tienen una mutación del CFTR de clase II, existe un defecto en el tráfico de la proteína CFTR a la membrana plasmática. Los ejemplos de mutaciones de clase II incluyen F508del (ΔF508), N1303K, I507del (AI507) y R560T. Para las mutaciones de clase V, la síntesis del CFTR se reduce. Los ejemplos de mutaciones de clase V incluyen 3849+10kbC→T, 2789+5G→A, 3120+1G→A y 5T. Para pacientes que tienen una mutación del CFTR de clase VI, existe una disminución en la estabilidad de la proteína CFTR producida. Los ejemplos de mutaciones de clase VI incluyen 4326delTC, Q1412X y 4279insA.

10 El paciente puede tener una mutación del CFTR homocigótica o heterocigótica. Con frecuencia, el paciente es homocigótico o heterocigótico con una mutación de clase III o clase IV. Normalmente, el paciente es homocigótico con dos copias de una mutación de clase III o clase IV o heterocigótico con una copia de una mutación de clase III o clase IV y una copia de una mutación de clase I, II, V o VI.

15 El paciente puede ser heterocigótico de clase III/clase I, heterocigótico de clase IV/clase I, heterocigótico de clase III/clase II, heterocigótico de clase IV/clase II heterocigótico de clase III/clase V, heterocigótico de clase IV/clase V, heterocigótico de clase III/clase VI o heterocigótico de clase IV/clase VI, donde heterocigótico de clase X/clase Y significa que un alelo lleva una mutación del CFTR de clase X y el otro alelo lleva una mutación de clase Y. Por ejemplo, el paciente puede ser heterocigótico con un alelo que muestra la mutación del CFTR R117H y el otro alelo que muestra la mutación del CFTR ΔF508. Como alternativa, el paciente puede ser heterocigótico con un alelo que muestra la mutación del CFTR G551D y el otro alelo que muestra la mutación del CFTR ΔF508.

25 Como se ha mencionado anteriormente, un efecto secundario observado con el uso de algunos fármacos activos en la modulación del CFTR es la diarrea. La diarrea es un efecto secundario desagradable que puede limitar el uso de un fármaco en el tratamiento de una enfermedad o afección, ya que un paciente puede no querer o ser incapaz de tomar el fármaco en vista de este efecto secundario. Este es particularmente el caso de los pacientes que ya padecen o son susceptibles a la diarrea.

30 Los estudios clínicos muestran que RPL554 no provoca diarrea en los pacientes. En consecuencia, RPL554 puede usarse para tratar a un paciente que es susceptible o padece diarrea. La susceptibilidad a la diarrea puede deberse a una de varias causas, por ejemplo, una susceptibilidad hereditaria a la diarrea, susceptibilidad a la diarrea debido a factores ambientales o una susceptibilidad a la diarrea provocada por una afección preexistente. Una afección preexistente de este tipo es normalmente una afección del sistema digestivo.

35 Normalmente, dicho paciente que padece o es susceptible a la diarrea es un paciente que padece colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis microscópica, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, malabsorción de ácidos biliares o diverticulitis. La diarrea puede estar provocada por varias afecciones tales como infecciones víricas, infecciones bacterianas, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis microscópica, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, malabsorción de ácidos biliares, diverticulitis o alergias.

40 *Composición farmacéutica*

45 RPL554 puede estar presente en una composición farmacéutica. Normalmente, la composición farmacéutica puede comprender RPL554 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede ser como se describe a continuación.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto mediante cualquier vía de administración aceptable incluyendo, pero no limitada a, modos de administración inhalados, orales, nasales, tópicos (incluyendo transdérmicos) y parenterales. Se prefiere la administración por inhalación. Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden administrarse en múltiples dosis por día, en una sola dosis diaria o una única dosis semanal. Se entenderá que cualquier forma de los agentes activos utilizados en la composición de la invención (es decir, base libre, sal farmacéuticamente aceptable, solvato, etc.) que sea adecuada para el modo particular de administración puede usarse en las composiciones farmacéuticas analizadas en el presente documento.

55 Las composiciones farmacéuticas normalmente contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo. Los expertos en la materia reconocerán, sin embargo, que una composición farmacéutica puede contener más que una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, composiciones a granel, o menos que una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para la administración múltiple para conseguir una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, la composición contendrá aproximadamente el 0,01-95 % en peso de agente activo, incluyendo, aproximadamente el 0,01-30 % en peso, tal como aproximadamente el 0,01-10 % en peso, dependiendo la cantidad real de la propia formulación, de la vía de administración, de la frecuencia de dosificación, etc. En otra realización, una composición adecuada para inhalación, por ejemplo, comprende de aproximadamente el 0,01 al 30 % en peso de agente activo con otra realización más que comprende aproximadamente el 0,01-10 % en peso de agente activo.

65 Puede usarse cualquier vehículo o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas. La elección de un

- vehículo o excipiente particular, o combinaciones de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración que se usa para tratar un sujeto particular o tipo de afección médica o patología. A este respecto, la preparación de una composición adecuada para un modo particular de administración está dentro del alcance de los expertos en las técnicas farmacéuticas. Adicionalmente, los vehículos o excipientes utilizados en dichas composiciones están disponibles en el mercado. A modo de ilustración adicional, se describen técnicas de formulación convencionales en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, MD (2000); y H. C. Ansel y et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, MD (1999).
- Los ejemplos representativos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, tal como celulosa microcristalina y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón de fosfato; gases propulsores comprimidos, tales como clorofluorocarbonos e hidrofurocarbonos; y otras sustancias compatibles atóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas se preparan normalmente mezclando o combinando exhaustiva e íntimamente el agente activo/principio activo con un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. La mezcla resultante uniformemente mezclada puede conformarse o cargarse en comprimidos, cápsulas, píldoras, botes, cartuchos, dispensadores y similares usando procedimientos y equipos convencionales.
- Normalmente, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración por inhalación. La composición farmacéutica puede ser para la administración por nebulizador, inhalador de polvo seco (IPS) o inhalador de dosis medida (IDM).
- Las composiciones adecuadas para la administración por inhalación normalmente estarán en forma de un aerosol o un polvo, por ejemplo, una composición de polvo seco. Dichas composiciones se administran generalmente usando dispositivos de administración bien conocidos, tales como un inhalador nebulizador, un inhalador de polvo seco o un inhalador de dosis medida, ejemplos de los cuales se describen a continuación.
- Como alternativa, una composición que comprende el o los agentes activos/principios activos puede administrarse por inhalación usando un inhalador nebulizador. Dichos dispositivos nebulizadores normalmente producen una corriente de aire a alta velocidad que provoca que la composición se pulverice como una bruma que se lleva dentro del tracto respiratorio de un sujeto. En consecuencia, cuando se formula para su uso en un inhalador nebulizador, el o los agentes activos/principios activos se disuelven normalmente en un vehículo adecuado para formar una solución. Como alternativa, el o los agentes activos/principios activos pueden micronizarse y combinarse con un vehículo adecuado para formar una suspensión de partículas micronizadas de tamaño respirable, donde micronizado se define normalmente como que tiene partículas en las que al menos aproximadamente el 90 por ciento de las partículas tienen una mediana de diámetro en masa de menos de aproximadamente 10 µm. La expresión "mediana de diámetro en masa" significa el diámetro de manera que la mitad de la masa de las partículas está contenida en partículas con un diámetro mayor y la mitad está contenida en partículas con un diámetro menor.
- Los dispositivos nebulizadores adecuados incluyen el inhalador Respimat^{RTM} Soft MistTM (Boehringer Ingelheim), el Sistema de Administración Pulmonar AERx^{RTM} (Aradigm Corp.) y el Nebulizador Reutilizable PARI LC Plus (Pari GmbH). Una composición ejemplar para su uso en un inhalador nebulizador comprende una solución acuosa isotónica que comprende de aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de RPL554 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, dicha solución tiene un pH de aproximadamente 3,5 a 6,0.
- Como alternativa, una composición que comprende el o los agentes activos/principios activos puede administrarse por inhalación usando un inhalador de polvo seco (IPS). Dichos IPS normalmente administran el agente activo como un polvo de flujo libre que se dispersa en la corriente de aire de un sujeto durante la inspiración. Con el fin de conseguir un polvo de flujo libre, el o los agentes activos/principios activos se formulan normalmente con un excipiente adecuado tal como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico, polilactida-glicolida y combinaciones de los mismos. Normalmente, el o los agentes activos/principios activos se micronizan y combinan con un excipiente para formar una mezcla adecuada para la inhalación. En consecuencia, en una realización de la invención, el o los agentes activos/principios activos se encuentran en forma micronizada. Por ejemplo, una composición representativa para su uso en un IPS comprende lactosa seca que tiene un tamaño de partícula de entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 100 µm (por ejemplo, lactosa molida seca) y partículas micronizadas del agente activo. Una formulación de polvo seco de este tipo puede prepararse, por ejemplo, combinando lactosa con el agente activo y después mezclando en seco los componentes. Como alternativa, si se desea, el agente activo puede formularse sin un excipiente. La composición se carga normalmente en un IPS o en

cartuchos o cápsulas de inhalación para su uso con un IPS. Los IPS son bien conocidos por los expertos en la materia y muchos de estos dispositivos están disponibles en el mercado, con dispositivos representativos incluyendo Aerolizer^{RTM} (Novartis), AirmaxTM (IVAX), ClickHaler^{RTM} (Innovata Biomed), Diskhaler^{RTM} (GlaxoSmithKline), Diskus^{RTM} o Accuhaler (GlaxoSmithKline), Easyhaler^{RTM} (Orion Pharma), EclipseTM (Aventis), FlowCaps^{RTM} (Hovione), Handihaler^{RTM} (Boehringer Ingelheim), Pulvinal^{RTM} (Chiesi), Rotahaler^{RTM} (GlaxoSmithKline), SkyeHalerTM o CertihalerTM (SkyePharma), Twisthaler (ScheringPlough), Turbuhaler^{RTM} (AstraZeneca), Ultrahaler^{RTM} (Aventis) y similares.

Como alternativa, la composición que comprende el agente activo puede administrarse por inhalación usando un inhalador de dosis medida (IDM). Dichos IDM normalmente descargan una cantidad medida del agente activo usando gas propulsor comprimido. Las formulaciones de dosis medida, por tanto, normalmente comprenden una solución o suspensión del agente activo en un propulsor licuado, tal como un clorofluorocarbono tal como CCl₃F o un hidrofluoroalcano (HFA) tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano (HFA 227), aunque generalmente se prefieren los HFA debido a las preocupaciones acerca de que los clorofluorocarbonos afectan a la capa de ozono. Los componentes opcionales adicionales de las formulaciones de HFA incluyen codisolventes, tales como etanol o pentano y tensioactivos, tales como trioleato de sorbitano, ácido oleico, lecitina y glicerina. Véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.225.183 de Purewal et al., el documento EP 0717987 A2 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) y el documento WO 92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company). Una composición representativa para su uso en un IDM comprende aproximadamente el 01-5 % en peso de agente activo; aproximadamente el 0-20 % en peso de etanol; y aproximadamente el 0-5 % en peso de tensioactivo; siendo el resto un propulsor de HFA. Dichas composiciones se preparan normalmente añadiendo un hidrofluoroalcano frío o presurizado a un recipiente adecuado que contiene el agente activo, etanol (si está presente) y el tensioactivo (si está presente). Para preparar una suspensión, el agente activo se microniza y después se combina con el propelente. Después, la formulación se carga en un bote de aerosol, que forma una porción del IDM. Los IDM son bien conocidos por los expertos en la materia y muchos de estos dispositivos están disponibles en el mercado, incluyendo los dispositivos representativos el Sistema Inhalador AeroBid (Forest Pharmaceuticals), Aerosol de Inhalación Atrovent (Boehringer Ingelheim), Flovent^{RTM} (GlaxoSmithKline), Inhalador Maxair (3M), Inhalador Proventil^{RTM} (Schering), Aerosol de Inhalación Serevent^{RTM} (GlaxoSmithKline) y similares. Como alternativa, puede prepararse una formulación de suspensión secando por pulverización un recubrimiento de tensioactivo sobre partículas micronizadas del agente activo. Véanse, por ejemplo, el documento WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) y el documento WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.).

Se describen ejemplos adicionales de procesos de preparación de partículas respirables, y formulaciones y dispositivos adecuados para la dosificación por inhalación en la Patente de los EE.UU. N.º 5.874.063 de Briggner et al.; 5.983.956 de Trofast; 6.221.398 de Jakupovic et al.; 6.268.533 de Gao et al.; 6.475.524 de Bisrat et al.; y 6.613.307 de Cooper.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para la administración oral. Las composiciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, sellos, grageas, polvos, gránulos; soluciones o suspensiones en un líquido acuoso o no acuoso; emulsiones líquidas de aceite en agua o agua en aceite; elixires o jarabes; y similares; conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del agente activo.

Cuando se destina para la administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras y similares), la composición normalmente comprenderá el agente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio. Las formas de dosificación sólidas también pueden comprender: cargas o diluyentes, tales como almidones, celulosa microcristalina, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y/o carbonato de sodio; agentes retardantes de la solución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y/o arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y/o mezclas de los mismos; agentes colorantes; y agentes tamponantes.

También puede haber presentes en las composiciones farmacéuticas agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los ejemplos de agentes de recubrimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, incluyen los utilizados para recubrimientos entéricos, tales como ftalato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de polivinilo, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico, trimelitato de acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa y similares. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético,

sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones también pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables u otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener agentes opacificantes y pueden formularse de manera que liberen el agente activo solamente, o preferentemente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de forma retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación líquidas normalmente comprenden el agente activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ejemplo, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agaragar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Cuando se destinan a la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden envasarse en una forma de dosificación unitaria. La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente individual adecuada para dosificar un sujeto, es decir, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de los agentes activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea sola o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitarias pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

Las composiciones también pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal). Para dicha administración, los agentes activos se proporcionan en una solución, suspensión o emulsión estéril. Los disolventes de ejemplo para la preparación de dichas formulaciones incluyen agua, solución salina, alcoholes de bajo peso molecular tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites, gelatina, ésteres de ácidos grasos tales como oleato de etilo y similares. Una formulación parenteral normal es una solución acuosa estéril de pH 4-7 de los agentes activos. Las formulaciones parenterales también pueden contener uno o más solubilizantes, estabilizantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes y agentes dispersantes. Estas formulaciones pueden convertirse en estériles mediante el uso de un medio inyectable estéril, un agente esterilizante, filtración, irradiación o calor.

Las composiciones también pueden administrarse por vía transdérmica usando sistemas y excipientes de entrega transdérmica conocidos. Por ejemplo, los agentes activos pueden mezclarse con potenciadores de la permeación, tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacicloalcan-2-onas y similares, y pueden incorporarse en un parche o sistema de entrega similar. Si se desea, pueden usarse excipientes adicionales incluyendo agentes gelificantes, emulsionantes y tampones, en dichas composiciones transdérmicas.

Dosificación

Se administra a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se describe en el presente documento. En los tratamientos de acuerdo con la invención, puede proporcionarse RPL554 o la sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo en cualquier dosificación adecuada. Una dosis normal es de 0,1 µg a 100 mg de acuerdo con la actividad del compuesto específico, la edad, el peso y las condiciones del sujeto que se trata, el tipo y la gravedad de la enfermedad y la frecuencia y la vía de administración. La cantidad de RPL554 presente en una sola dosis puede ser de 1 µg a 50 mg, de 1 µg a 10 mg, de 1 µg a 1 mg, de 1 µg a 500 µg, de 1 µg a 100 µg o de 1 µg a 50 µg (es decir, de 0,001 mg a 0,050 mg). Como alternativa, la cantidad de RPL554 presente en una sola dosis puede ser de 1 µg a 50 mg, de 10 µg a 50 mg, de 100 µg a 50 mg o de 250 µg a 50 mg. La dosis de RPL554 puede ser de 1 µg/kg a 500 µg/kg o de 50 µg/kg a 250 µg/kg (kg como peso del paciente). Una dosis puede administrarse con la frecuencia requerida. Esto puede ser como y cuando se requiera una dosis, o puede seguir una rutina tal como tres o más veces al día, dos veces al día, una vez al día, tres o más veces a la semana, dos veces a la semana o una vez a la semana.

Preferentemente, el agente activo para modular CFTR se administra por inhalación.

El tratamiento con un compuesto activo como se describe en el presente documento normalmente comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo o los compuestos activos.

Combinación

Es un hallazgo de la invención que RPL554 y los antagonistas del receptor de leucotrienos tienen un efecto aditivo o

sinérgico en la activación del CFTR. Son particularmente útiles combinaciones de fármacos en las que los principios activos funcionen a través de diferentes vías fisiológicas y aun así conseguir una actividad aditiva o sinérgica. Frecuentemente, la ventaja terapéutica surge porque la combinación puede conseguir un efecto terapéuticamente útil usando concentraciones más bajas de cada componente activo. Esto permite minimizar los efectos secundarios de la medicación. Por tanto, la combinación puede formularse de manera que cada principio activo esté presente a una concentración que sea subclínica en células distintas de las células diana con la enfermedad. Sin embargo, la combinación es terapéuticamente eficaz en células diana que responden a ambos ingredientes.

También se describe una composición que comprende RPL554 y un antagonista del receptor de leucotrienos. El antagonista del receptor de leucotrienos es normalmente un antagonista del receptor de leucotrienos D4. Preferentemente, el antagonista del receptor de leucotrienos es un inhibidor de la proteína 4 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP4).

El antagonista del receptor de leucotrienos puede ser MK-571, MK-886, montelukast, zafirlukast o pranlukast.

La composición que comprende los dos principios activos como se define en el presente documento puede ser una composición farmacéutica. La composición puede comprender adicionalmente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser como se definen en el presente documento. La composición puede administrarse como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la composición puede administrarse por inhalación.

Los dos principios activos pueden estar en una combinación fija o libre. Preferentemente, los dos principios activos están en una combinación fija. Por ejemplo, pueden estar entremezclados.

También se describe una composición como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en un paciente como se define en el presente documento mediante la modulación de la actividad del CFTR.

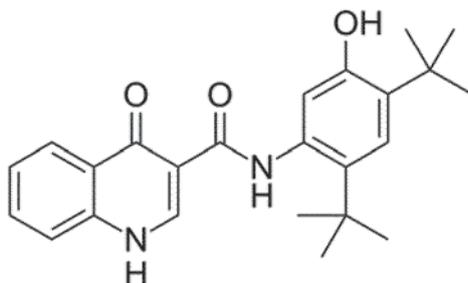
La dosis de cada uno de los principios activos puede ser independientemente como se ha descrito anteriormente para RPL554. La combinación de los dos principios activos o de cada principio activo solo, puede administrarse por inhalación como se define en el presente documento.

También es un hallazgo de la invención que (i) RPL554 y (ii) un potenciador del CFTR o corrector del CFTR tiene un efecto aditivo o sinérgico en la activación o la potenciación del CFTR. También se describe una composición que comprende RPL554 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo y un potenciador del CFTR. También se describe una composición que comprende RPL554 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo y un corrector del CFTR.

La composición que comprende los dos principios activos como se definen en el presente documento puede ser una composición farmacéutica. La composición puede comprender adicionalmente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser como se definen en el presente documento. La composición puede administrarse como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la composición puede administrarse por inhalación.

Los dos principios activos pueden estar en una combinación fija o libre. Preferentemente, los dos principios activos están en una combinación fija. Por ejemplo, pueden estar entremezclados.

El potenciador del CFTR puede ser cualquier potenciador adecuado del CFTR. Por ejemplo, el potenciador del CFTR puede ser VX770 (Ivacaftor), QBW251, NPPB (5-nitro-2-(3fenilpropilamino)-benzoato), VRT532 (4-metil-2-(5-fenil-1H-pirazol-3-il)fenol), PG-01 (N-metil-N-[2-[[4-(1-metiletil)fenil]amino]-2-1H-indol-3-acetamida) o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos. Se prefiere VX-770 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo. El fármaco conocido VX-770 (Ivacaftor, Kalydeco®) está aprobado para el tratamiento de la fibrosis quística en pacientes con la mutación G551D y tiene la estructura



y la fórmula N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida.

El corrector del CFTR puede ser cualquier corrector del CFTR adecuado o cualquier sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, el corrector del CFTR es normalmente VX809 (Lumacaftor, ácido 3-{6-[[1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)ciclopropanocarbonil]amino]-3-metilpiridin-2-il}benzoico), VX661 (1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-N-[1-[(2R)-2,3-dihidroxiopropil]-6-fluoro-2-(2-hidroxi)-1,1-dimetiletil]-1H-indol-5-il]-ciclopropanocarboxamida), Corr-4a (N-{2-[(5-cloro-2-metoxifenil)amino]-4'-metil-4,5'-bi-1,3-tiazol-2'-il}benzamida), VRT532 (4-metil-2-(5-fenil-1H-pirazol-3-il)fenol) o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos. Se prefiere Lumacaftor o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describe una composición que comprende (i) RPL554 o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo y (ii) un potenciador del CFTR o un corrector del CFTR. Normalmente, el componente (ii) es un potenciador del CFTR.

También se describe un producto que comprende (a) 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma y (b) un potenciador del CFTR o un corrector del CFTR para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección como se define en el presente un paciente como se define en el presente documento mediante la modulación de la actividad del CFTR.

Normalmente, el producto comprende (a) 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma y (b) N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en un paciente como se define en el presente documento mediante la modulación de la actividad del CFTR.

También se describe 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en un paciente como se define en el presente documento mediante la modulación de la actividad del CFTR en combinación con un potenciador del CFTR o un corrector del CFTR.

También se describe un potenciador del CFTR o un corrector del CFTR para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección como se define en el presente documento en un paciente como se define en el presente documento mediante la modulación de la actividad del CFTR en combinación con 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

El paciente que se ha de tratar mediante la combinación de RPL554 y un potenciador o corrector del CFTR normalmente tiene una mutación del CFTR que puede ser una mutación del CFTR de clase III o clase IV. Como se ha analizado anteriormente, RPL554 es particularmente eficaz en la modulación de la actividad del CFTR resultado de mutaciones de compuerta o conductancia tales como mutaciones del CFTR de clase III y clase IV, respectivamente. Los potenciadores del CFTR y los correctores del CFTR pueden ser eficaces para corregir o potenciar la actividad del CFTR resultado de mutaciones distintas de las mutaciones de compuerta y conductancia, por ejemplo, mutaciones de clase I, II, V o VI, como se ha definido anteriormente. Los correctores del CFTR pueden ser particularmente eficaces para corregir la actividad del CFTR resultado de mutaciones del CFTR de clase II.

Los pacientes que padecen fibrosis quística y otros trastornos relacionados con el CFTR pueden ser portadores homocigóticos o heterocigóticos de genes del CFTR defectuosos. Con frecuencia, los pacientes que padecen fibrosis quística son portadores homocigóticos de la mutación $\Delta F508$. La combinación de RPL554 y un potenciador o corrector del CFTR puede ser particularmente eficaz en el tratamiento de pacientes que son portadores heterocigóticos de mutaciones del CFTR. En particular, los pacientes heterocigóticos que tienen una mutación de compuerta o conductancia en un alelo y una mutación del CFTR diferente (no de compuerta o no de conductancia) en el otro alelo pueden tratarse usando esta combinación debido a que el corrector del CFTR corrige los defectos de tráfico y RPL554 modula la actividad de defectos que surgen de mutaciones de compuerta o conductancia. Por ejemplo, el paciente puede ser heterocigótico con un alelo que muestra una mutación del CFTR de clase III o clase IV y el otro alelo que muestra una mutación del CFTR de clase II. El paciente puede ser heterocigótico de clase III/clase I, heterocigótico de clase IV/clase I, heterocigótico de clase III/clase II, heterocigótico de clase IV/clase II, heterocigótico de clase III/clase V, heterocigótico de clase IV/clase V, heterocigótico de clase III/clase VI o heterocigótico de clase IV/clase VI, donde heterocigótico de clase X/clase Y significa que un alelo lleva una mutación del CFTR de clase X y el otro alelo lleva una mutación de clase Y. Por ejemplo, el paciente puede ser heterocigótico con un alelo que muestra la mutación del CFTR R117H y el otro alelo que muestra la mutación del CFTR $\Delta F508$. Como alternativa, el paciente puede ser heterocigótico con un alelo que muestra la mutación del CFTR G551D y el otro alelo que muestra la mutación del CFTR $\Delta F508$.

La dosis de cada uno de los principios activos puede ser independientemente como se ha descrito anteriormente para RPL554. La combinación de los dos principios activos, o cada ingrediente solo, puede administrarse por

inhalación como se define en el presente documento.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

5 Ejemplos

Ejemplo 1 - Ensayo de actividad activadora sobre CFTR TS en monocapas de CFBE

10 Se añadió RPL554 de forma aguda a tres concentraciones diferentes (0,1, 1,0, 10 μM) a monocapas del epitelio bronquial de fibrosis quística (CFBE) que expresaba CFTR TS. Se usó DMSO (dimetilsulfóxido) como control negativo. Se usaron genisteína (50 μM) y forskolina (10 μM) como controles positivos. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2 que demuestran que RPL554 solo puede activar los canales del CFTR TS en monocapas de CFBE.

15 Ejemplo 2 - Ensayo de actividad activadora sobre CFTR TS en células HBE primarias

Después del pretratamiento con amilorida 100 nM para inhibir corrientes ENaC, se añadió RPL554 o forskolina (10 μM ; apical), seguido secuencialmente de genisteína (50 μM ; apical), CFTRinh-172 y ATP (100 μM). Los resultados se muestran en la Figura 3 que demuestran que RPL554 solo puede activar los canales del CFTR TS en monocapas de células HBE primarias altamente diferenciadas.

Ejemplo 3 - RPL554 sometido a ensayo como potenciador del CFTR TS en células CHO usando la técnica de pinzamiento zonal de células enteras

25 Se determinó una concentración de forskolina (Fsk) que proporcionaba una respuesta submáxima. Las corrientes estimuladas por forskolina se midieron a concentraciones de entre 100 nM y 50 μM y se ajustaron para determinar la CE50 (Figura 4). Luego se confirmó que la corriente se debió a CFTR.

30 Para determinar si la corriente inducida por forskolina 2 μM se llevaba realmente por los canales del CFTR, se examinó la sensibilidad de la corriente a +40 mV al inhibidor del CFTR CFTRinh-172 (Inh 172) (Figura 5).

Después, se evaluó la capacidad de RPL554 para potenciar la respuesta del CFTR TS a la forskolina 2 μM en zonas de células enteras. Para examinar el efecto de RPL554 sobre la actividad del CFTR durante la estimulación submáxima, las células CHO se estimularon con forskolina 2 μM y después se expusieron de forma aguda a RPL554. La dependencia de la concentración de RPL554 como potenciador del CFTR se muestra en la Figura 6.

40 El curso temporal de activación del CFTR por RPL554 e inhibición por Inh 172 (corriente a +40 mV normalizada a la de forskolina 2 μM) en la Figura 7 muestra la respuesta a RPL554 en estas condiciones. La sensibilidad a CFTRinh-172 confirma que está mediada por canales del CFTR.

Ejemplo 4 - Comparación de la modulación de la actividad del CFTR TS en células CHO por RPL554 y un potenciador aprobado (VX770, Kalydeco®)

45 Los efectos sobre CFTR TS en células CHO durante la estimulación submáxima por forskolina se compararon para RPL554 y VX770 (Figura 8). RPL554 potencia la actividad del canal del CFTR TS en células CHO y esta respuesta es >50 % la de VX770.

Ejemplo 5 - Potenciación de células CFBE CFTR- ΔF508

50 Se incubaron células CFBE CFTR- ΔF508 a 29 °C durante 24 horas para rescatar parcialmente el CFTR. Las células se estimularon con forskolina 10 μM en el lado apical y después con RPL554 a 100 nM, 300 nM, 1 μM , 3 μM y 10 μM , usando DMSO como control. Los resultados se muestran en la Figura 9 lo que demuestra que RPL554 potencia las células CFBE CFTR- ΔF508 .

55 Ejemplo 6 - Potenciación de la activación de CFTR-TS en células CFBE por RPL554

Se cultivaron células CFBE en ALI durante una semana hasta que se polarizaron. Las células se estimularon apicalmente con forskolina, después con RPL554 y genisteína como se muestra en las Figuras 10 y 11. RPL554 actúa como un potenciador de CFTR-TS.

60

Ejemplo 7 - RPL554 y un antagonista del receptor de leucotrienos en células CFBE CFTR- ΔF508

65 Se estimularon células CFBE CFTR- ΔF508 con el agonista del receptor de leucotrienos D4 (inhibidor de MRP4) MK571 (20 μM) y esto aumentó la I_{CC} dependiente del CFTR en 6 veces (Figura 12) y potenció la respuesta a RPL554. Esto implica que hay una liberación significativa de AMPc desde las células epiteliales de las vías respiratorias en condiciones basales. Los resultados para RPL554 en ausencia de pretratamiento con MRP4inh se

muestran en la Figura 13. MK571 y RPL554 interactúan sinérgicamente cuando se usan juntos (Figura 14). MK571 y RPL554 (3 μM) provocaron aumentos aditivos en la actividad del CFTR cuando se añadieron secuencialmente (Figura 15).

- 5 Estos resultados sugieren que RPL554 solo o en combinación con antagonistas del receptor de leucotrienos (por ejemplo, bloqueadores de MRP4) puede ser útil como terapia complementaria en la FQ.

Ejemplo 8 - RPL554 y VX-770 en células HBE de un paciente $\Delta\text{F508/R117H}$

- 10 Se cultivaron células HBE primarias de un paciente F508del/R117H en la interfaz aire-líquido (IAL) hasta que se diferenciaron bien (4 semanas), después se montaron en cámaras Ussing con un gradiente de Cl^- de basolateral a apical. Las monocapas se expusieron secuencialmente a adenosina apical (10 μM) o forskolina (1 o 10 μM , bilateralmente), después a RPL554 apical (10 μM) y finalmente a VX-770 (100 nM) como se indica. Los resultados a lo largo del tiempo para cada tratamiento se muestran en la Figura 16. Las concentraciones de los agentes utilizados
 15 fueron las siguientes: amilorida 100 μM , adenosina 10 μM , forskolina μM o 10 μM , RPL554 10 μM , VX-770 100 nM, CFTRinh172 10 μM y ATP 100 μM . La comparación de la activación total se muestra en la Figura 17.

- Se ha demostrado que RPL554 provoca una mejora significativa de la activación del CFTR en estas mutaciones de CF en condiciones de control (sin agonista) y durante la estimulación con adenosina fisiológica. El efecto relativo de RPL554 disminuye progresivamente al aumentar las concentraciones de forskolina, confirmando el efecto de inhibición de la PDE de RPL554.
 20

Ejemplo 9 - Efecto de RPL554 solo y en combinación con Lumacaftor

- 25 Se obtuvieron células epiteliales bronquiales humanas (HBE) primarias de dos pacientes heterocigóticos R117H/ ΔF508 (pacientes 1 y 2). El efecto de RPL554 sobre las células HBE de cada uno de estos pacientes se evaluó usando una cámara Ussing midiendo la corriente de cortocircuito (I_{cc}) de transporte de Cl^- dependiente del CFTR. RPL554 se usó con pre-estimulación con forskolina, sola o en combinación con el corrector del CFTR Lumacaftor. Todos los experimentos usaron forskolina 2 μM , RPL554 10 μM y Lumacaftor 10 μM .
 30

- La resistencia de las células HBE obtenidas del paciente 1 fue de aproximadamente 550 $\Omega \text{ cm}^{-2}$. El efecto sobre la I_{cc} medida de RPL554 solo ("control") o en combinación con Lumacaftor ("Lumacaftor") después de la estimulación con forskolina para células HBE del paciente 1 se muestra en la Figura 18. Los resultados mostrados son la respuesta media con $n = 4$.
 35

La resistencia de las células HBE obtenidas del paciente 2 fue de aproximadamente 850 $\Omega \text{ cm}^{-2}$. La Figura 19 muestra un curso temporal para la potenciación por RPL554 del CFTR en células HBE del paciente 2 después de la estimulación con forskolina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto para su uso en el tratamiento o la prevención de la fibrosis quística en un paciente mediante la modulación de la actividad del CFTR, compuesto que es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paciente tiene una mutación del CFTR.
- 10 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la mutación del CFTR es una mutación del CFTR de clase III o una mutación del CFTR de clase IV.
4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que la mutación del CFTR es G551D, G178R, G551S, S549N, G1349D, R117H, R117C, R347P o R334W.
- 15 5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la mutación del CFTR es R117H.
- 20 6. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente es heterocigótico con (i) un alelo que muestra una mutación del CFTR de clase III o clase IV y (ii) el otro alelo que muestra una mutación del CFTR de clase II.
7. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente es susceptible a, o padece, diarrea.
- 25 8. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente padece colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis microscópica, enfermedad celíaca, síndrome del intestino irritable, malabsorción de ácidos biliares o diverticulitis.
- 30 9. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuyo compuesto es para la administración por inhalación.
- 35 10. Un compuesto para su uso en el aumento de la movilidad de la mucosidad y/o la reducción de la viscosidad de la mucosidad, o para su uso en la facilitación del aclaramiento de la membrana mucosa de las vías respiratorias, en un paciente que padece fibrosis quística, compuesto que es 9,10-dimetoxi-2-(2,4,6-trimetilfenilimino)-3-(N-carbamoil-2-aminoetil)-3,4,6,7-tetrahidro-2H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma.

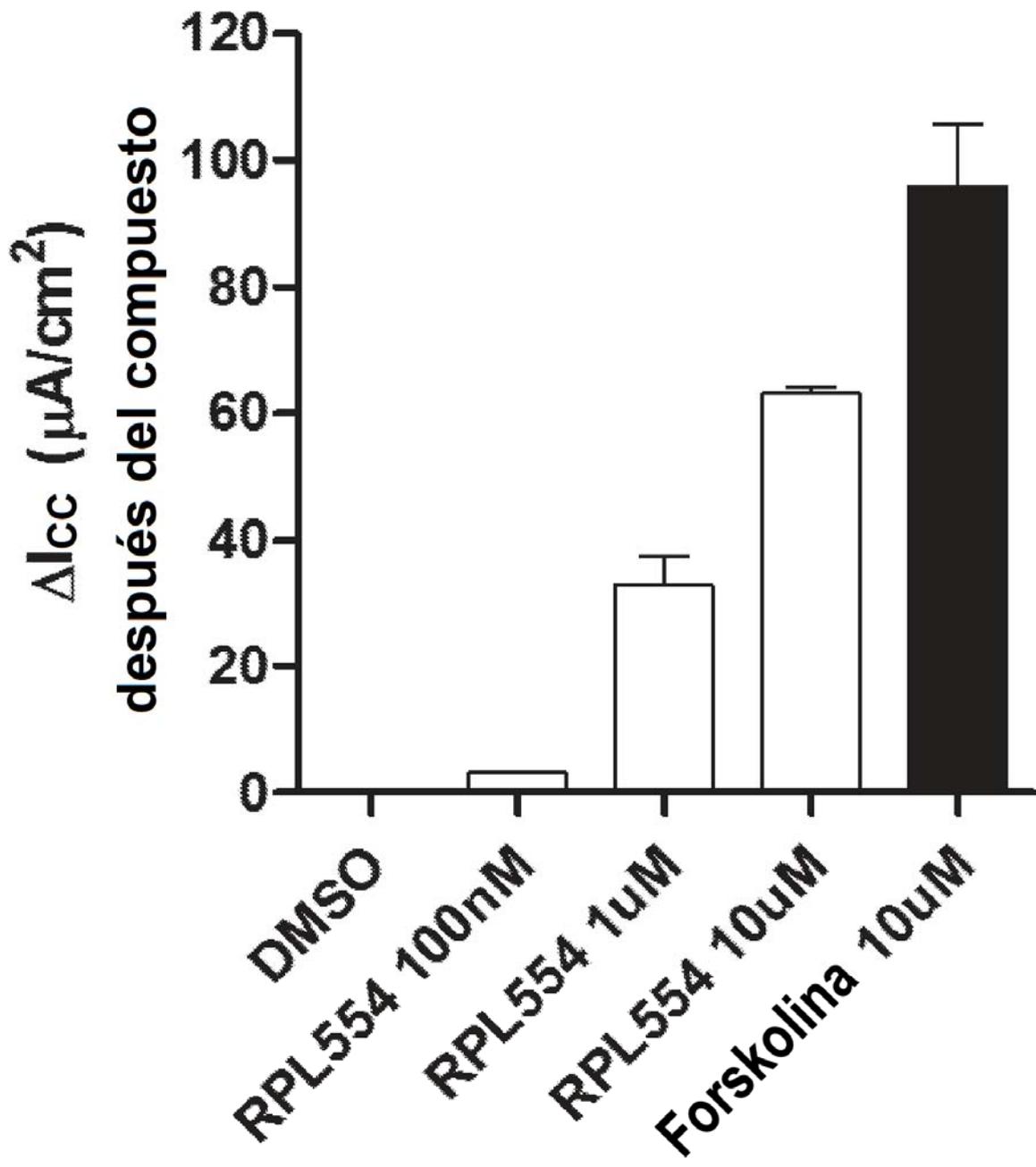


Figura 1

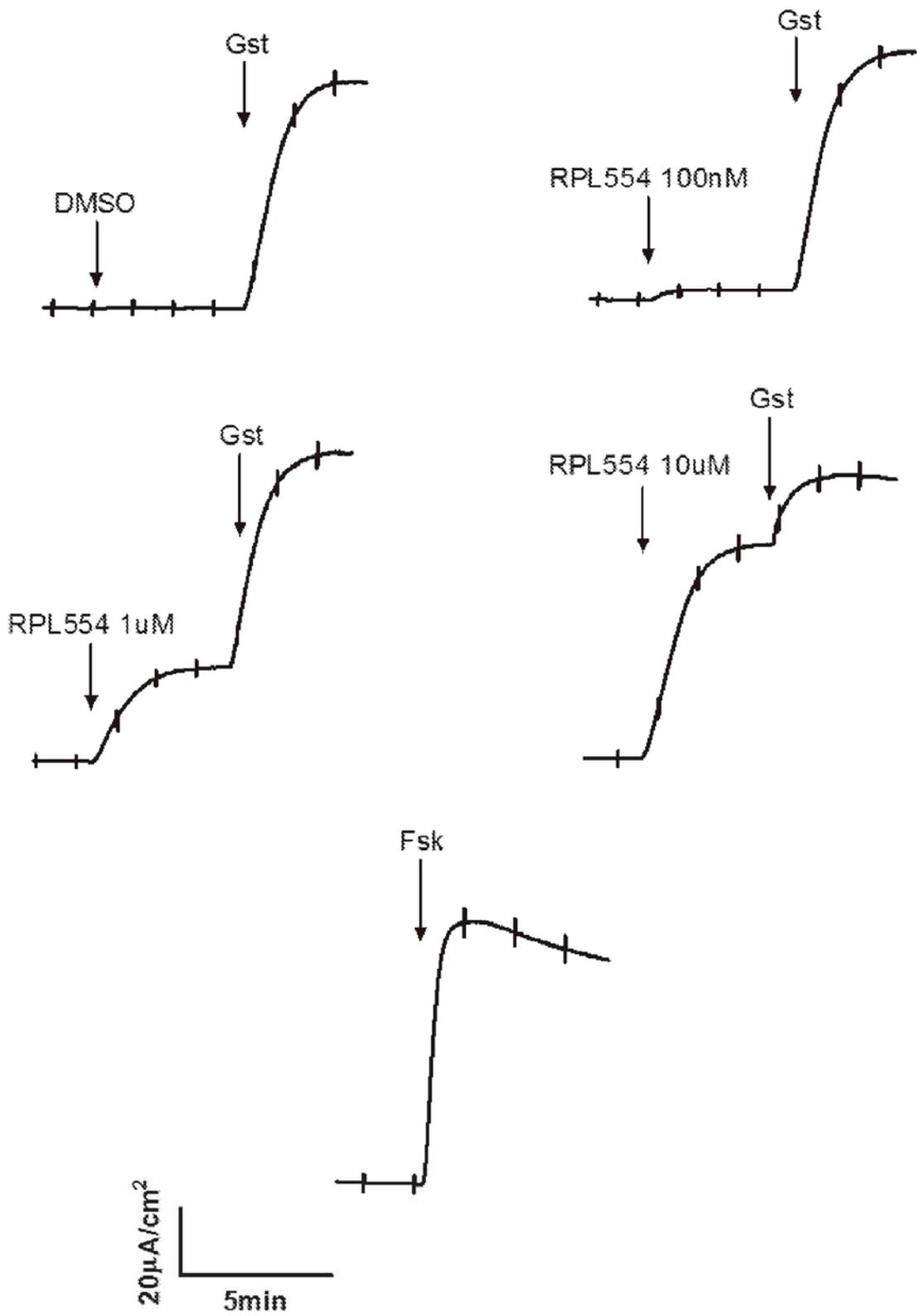


Figura 2

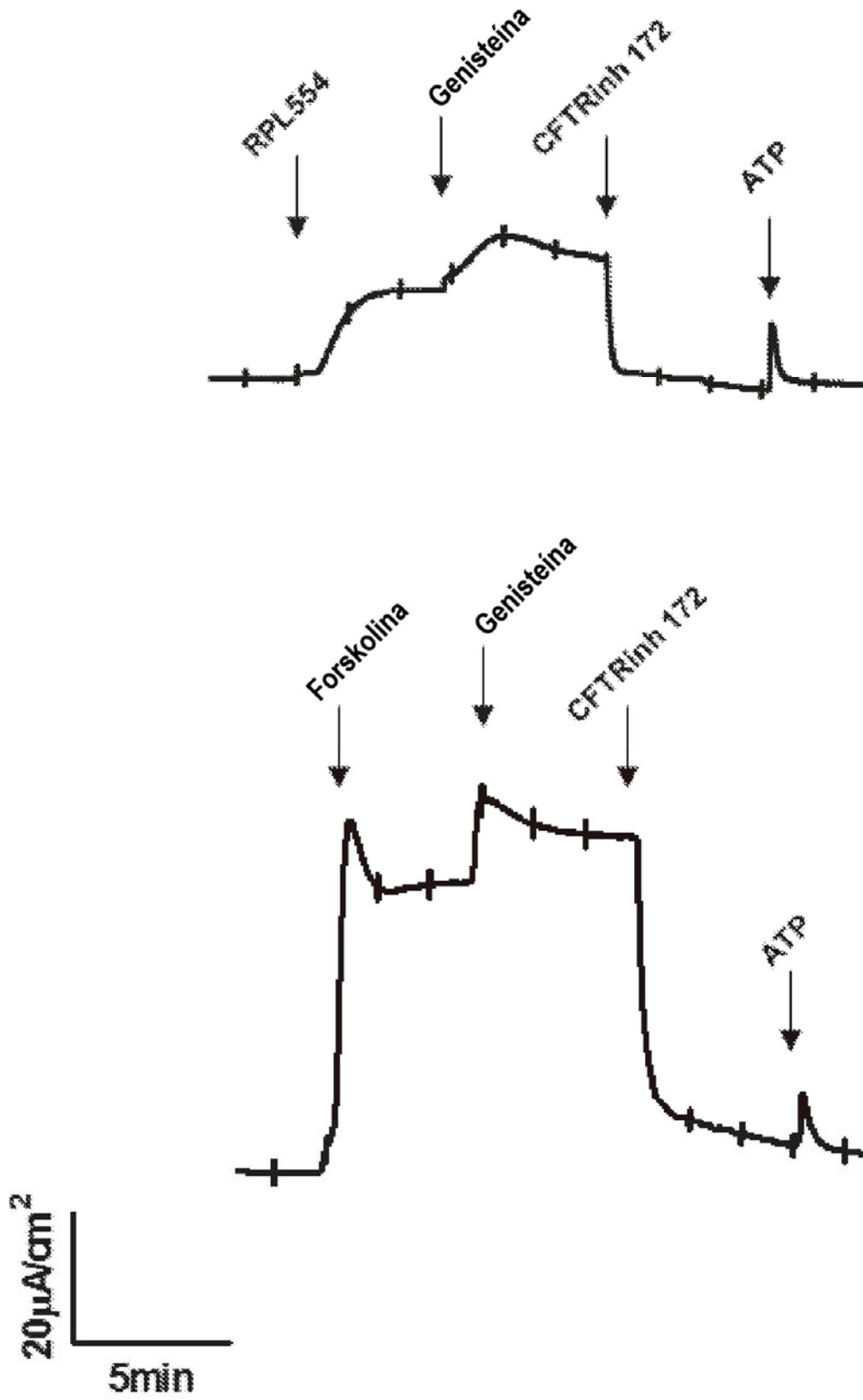


Figura 3

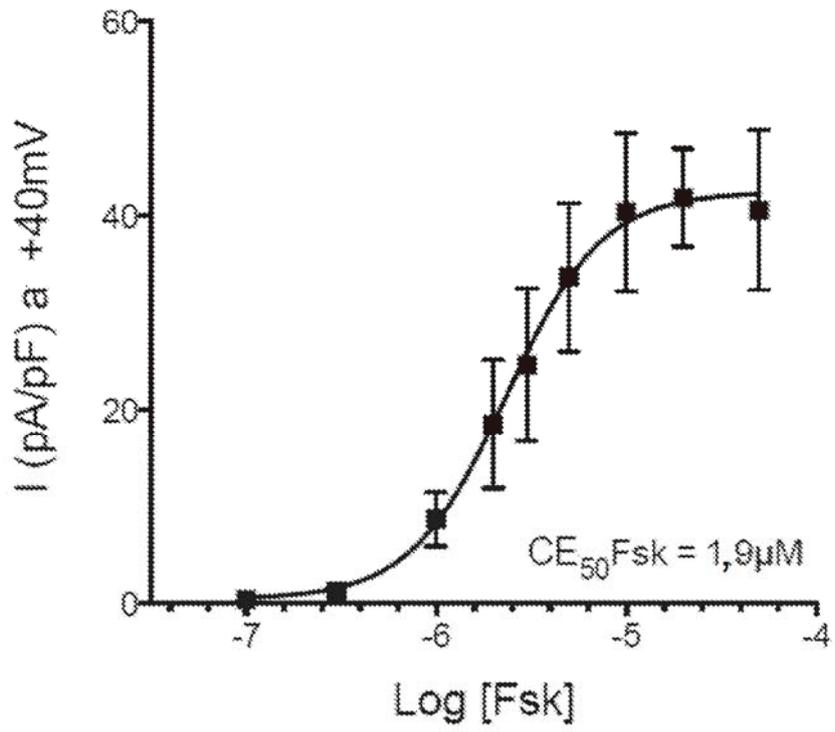


Figura 4

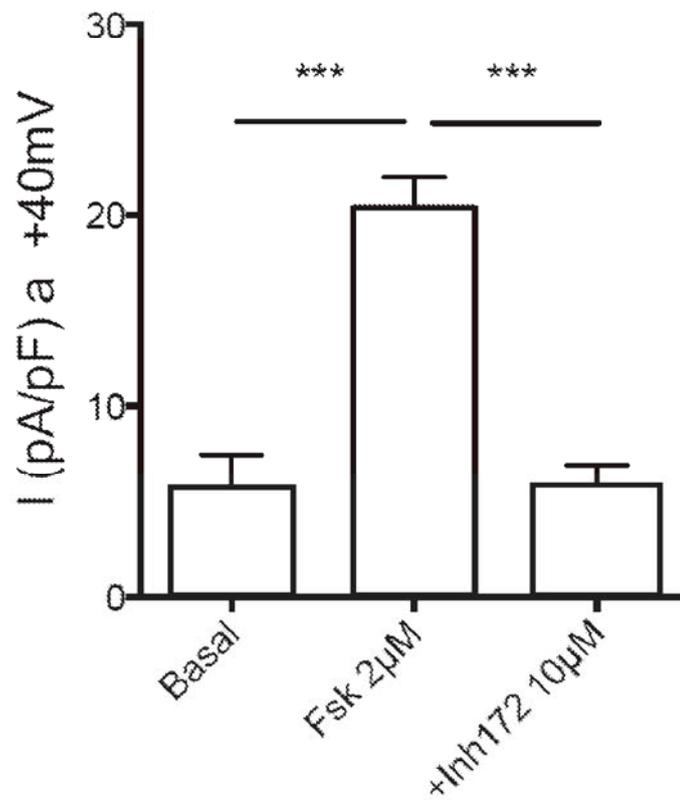


Figura 5

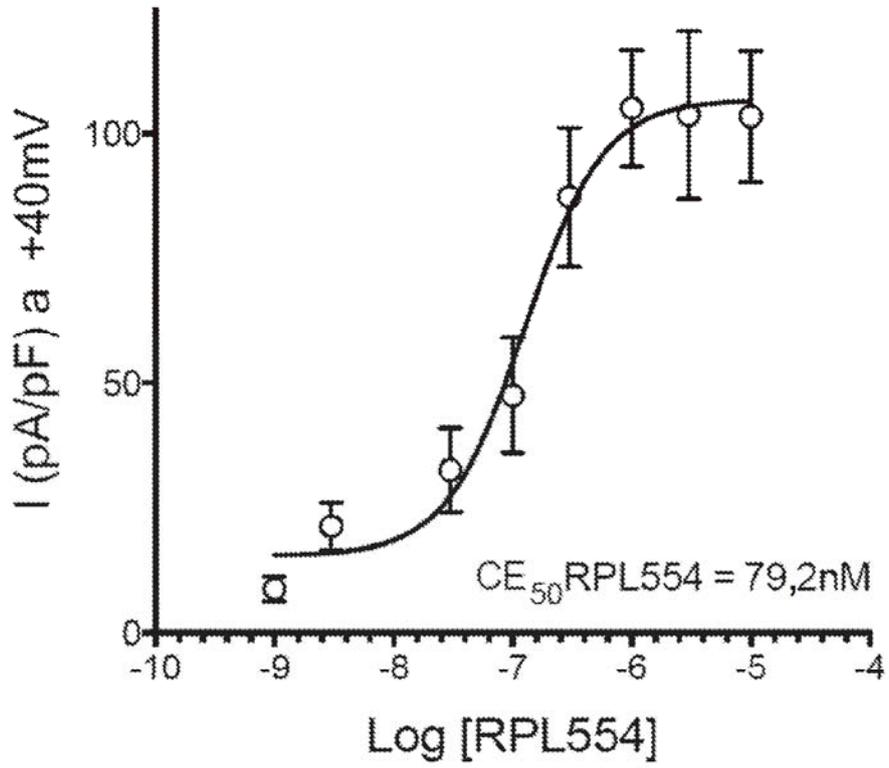


Figura 6

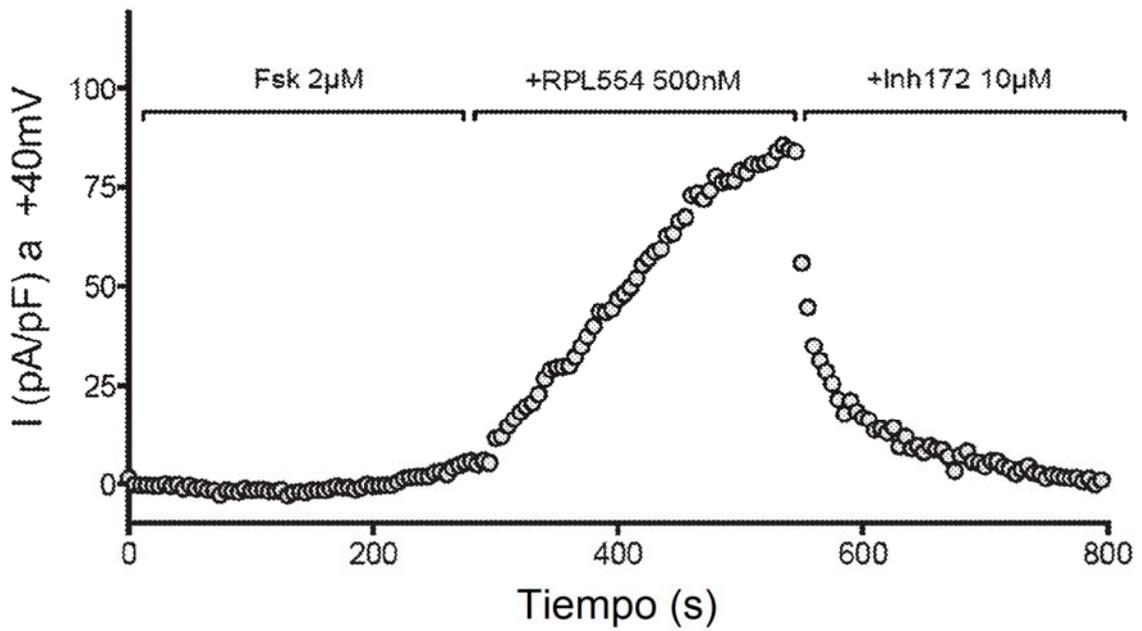


Figura 7

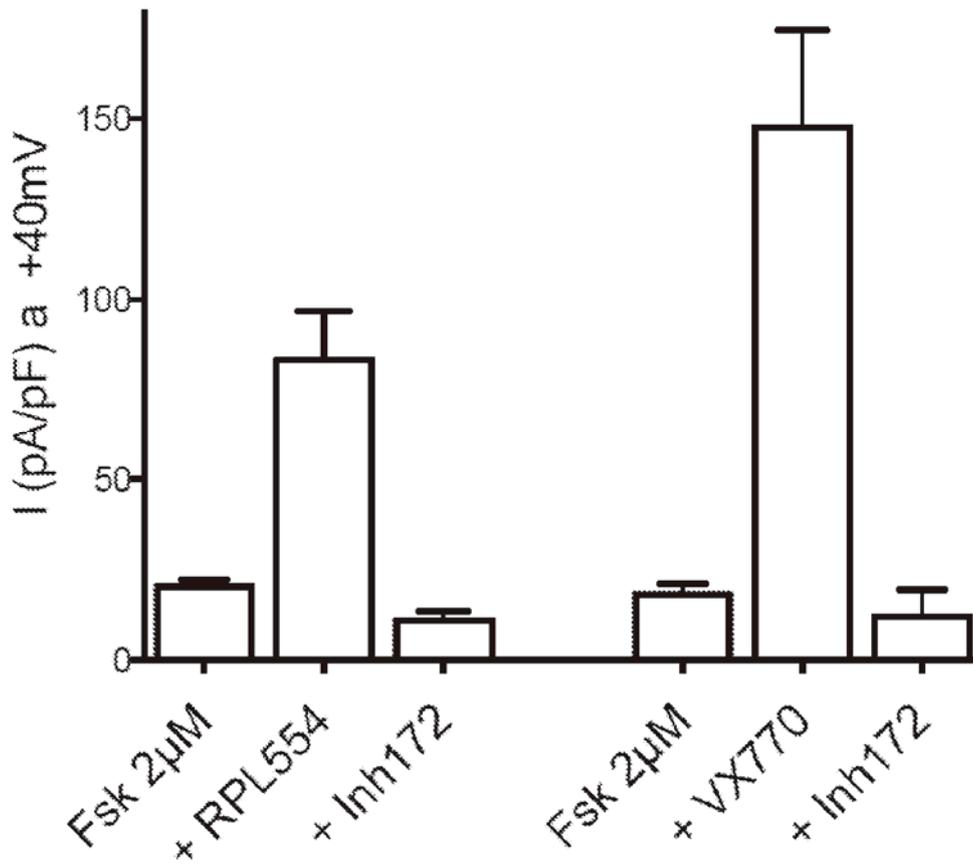


Figura 8

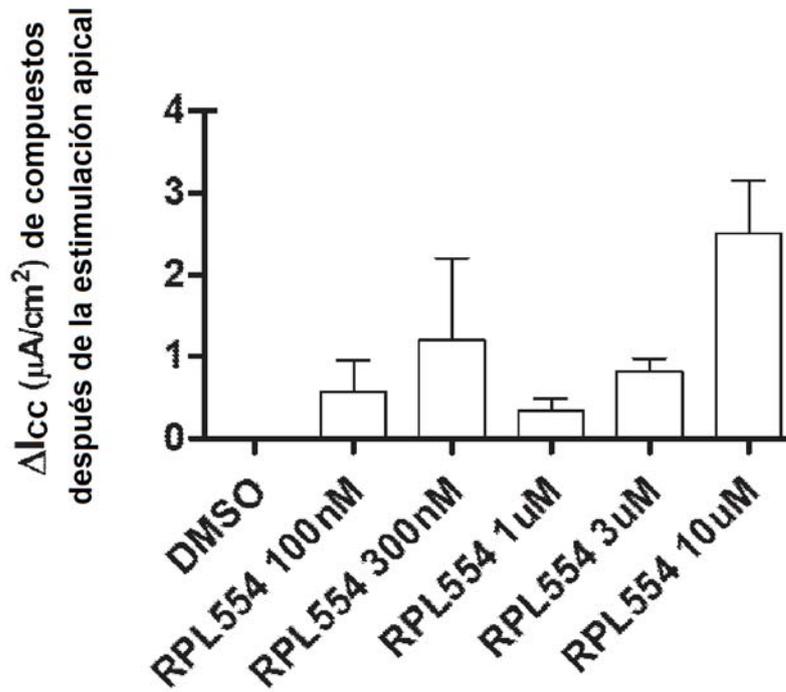


Figura 9

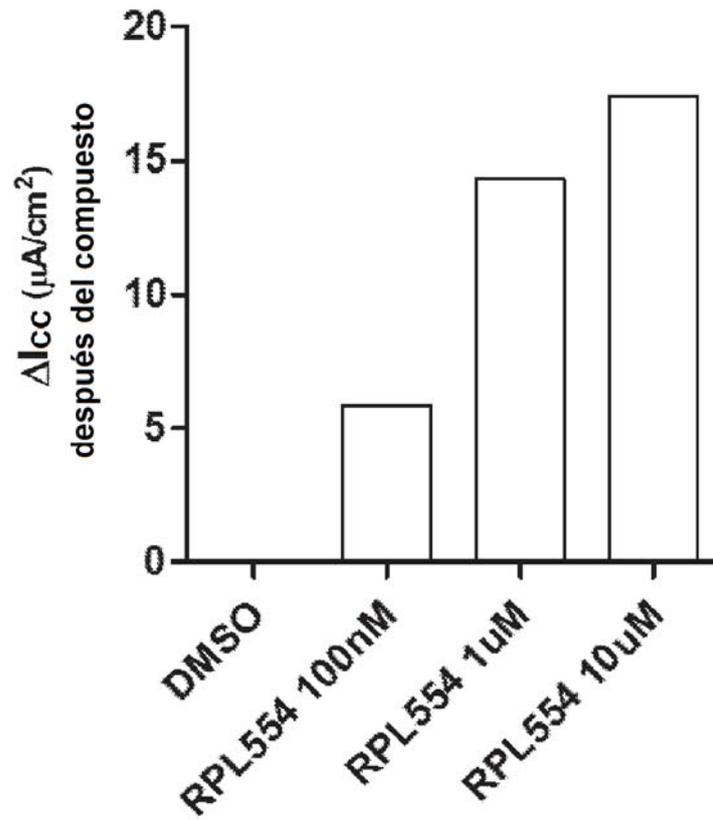


Figura 10

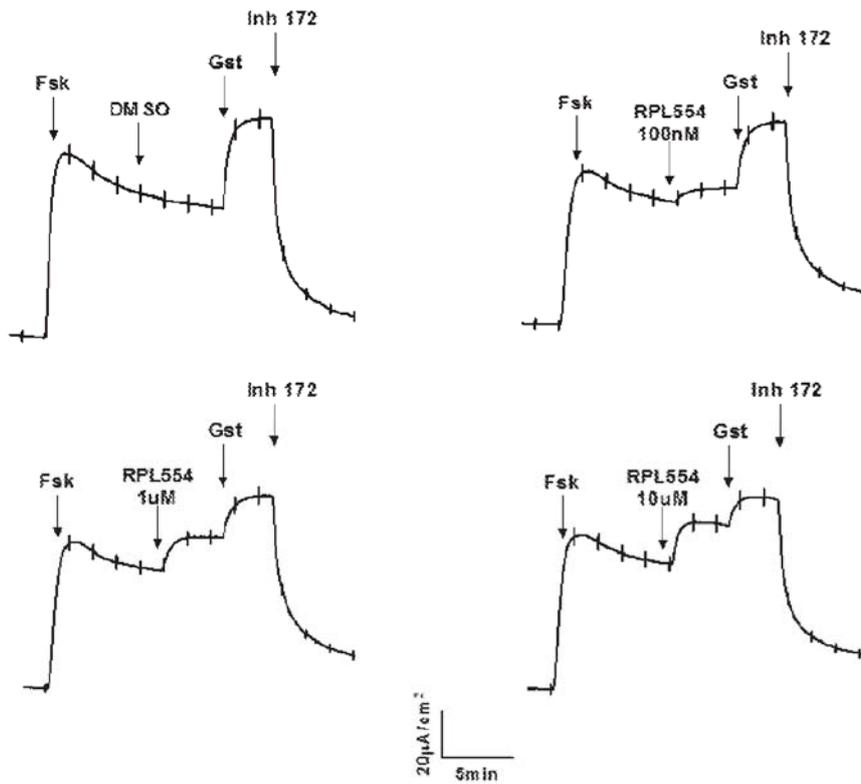


Figura 11

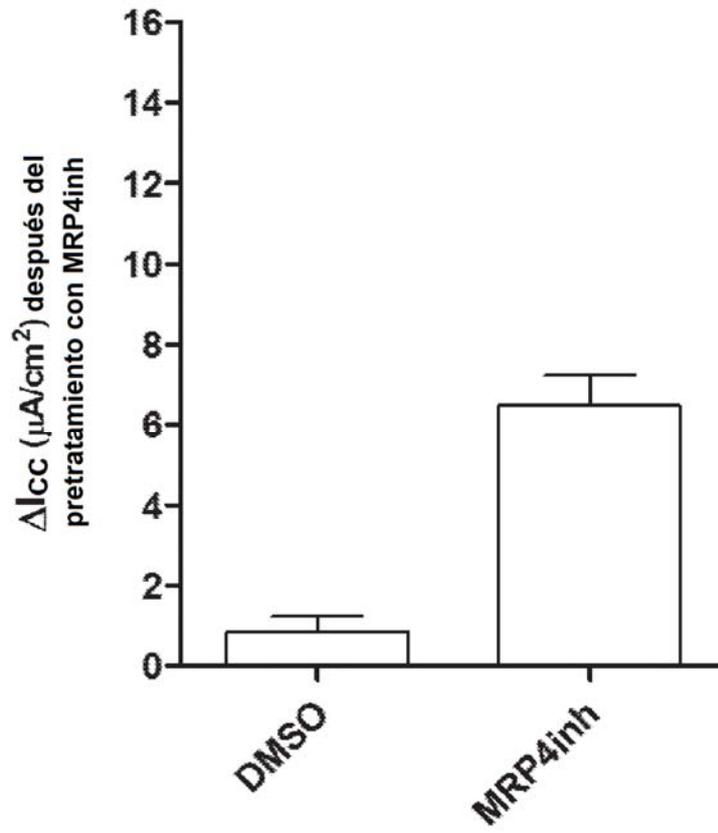


Figura 12

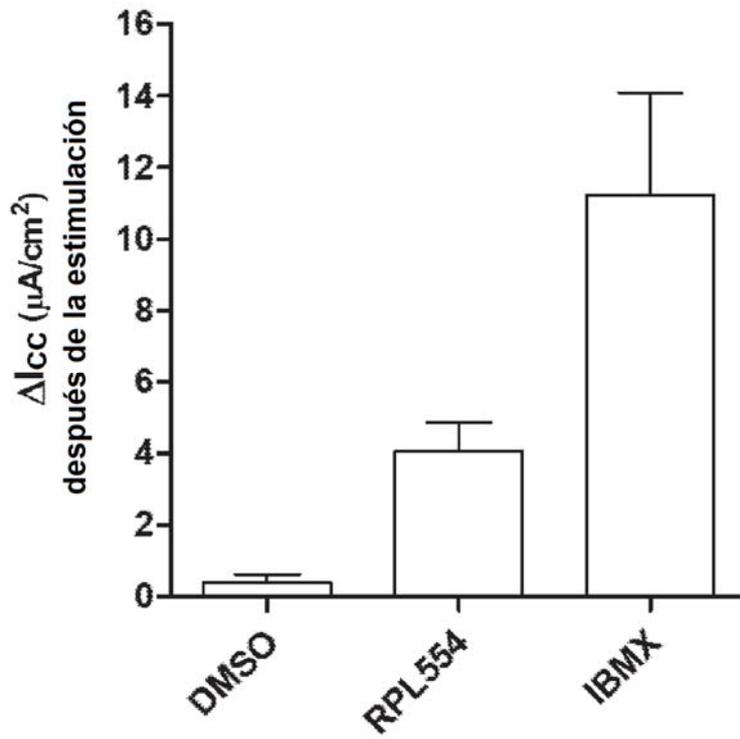


Figura 13

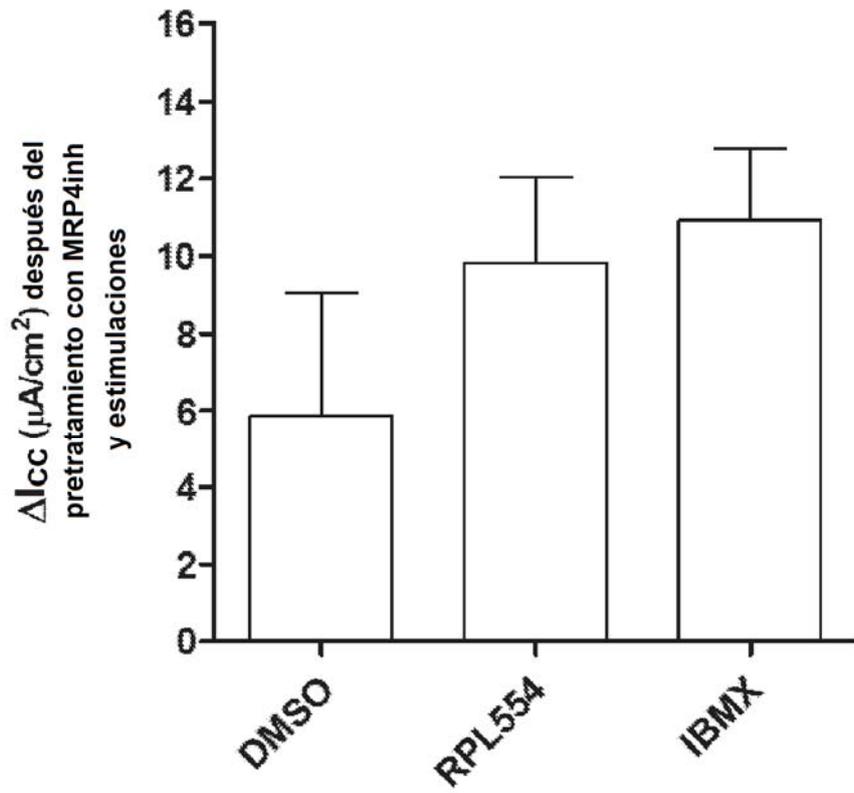


Figura 14

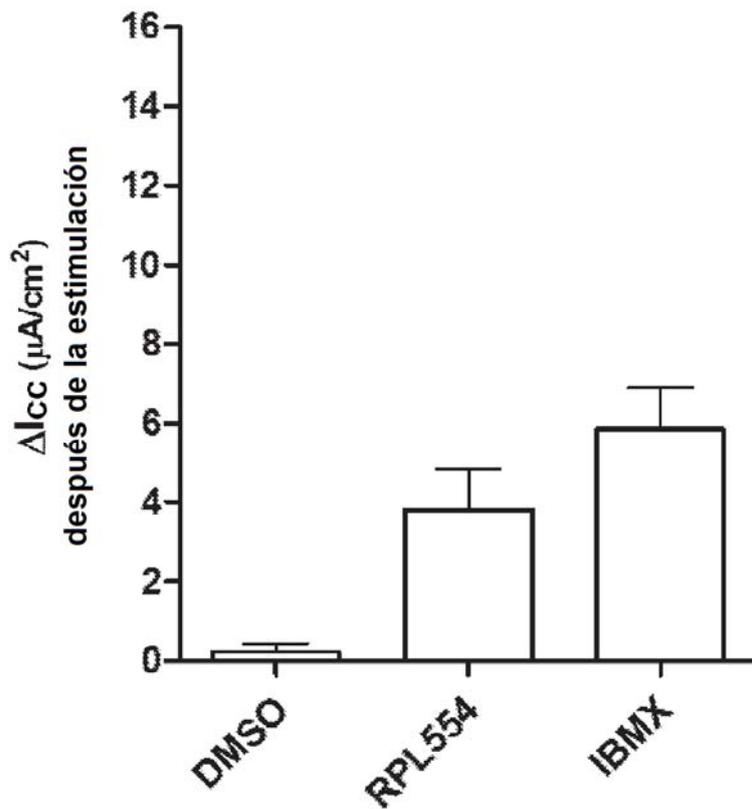


Figura 15

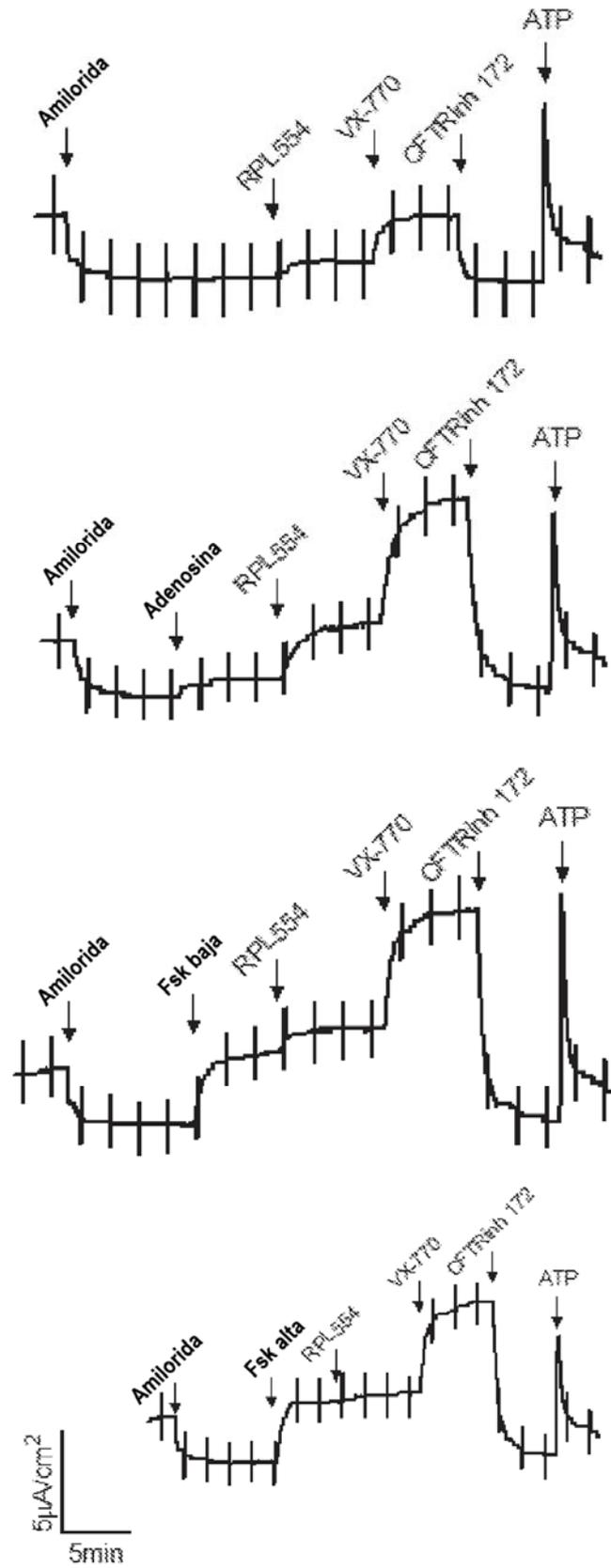


Figura 16

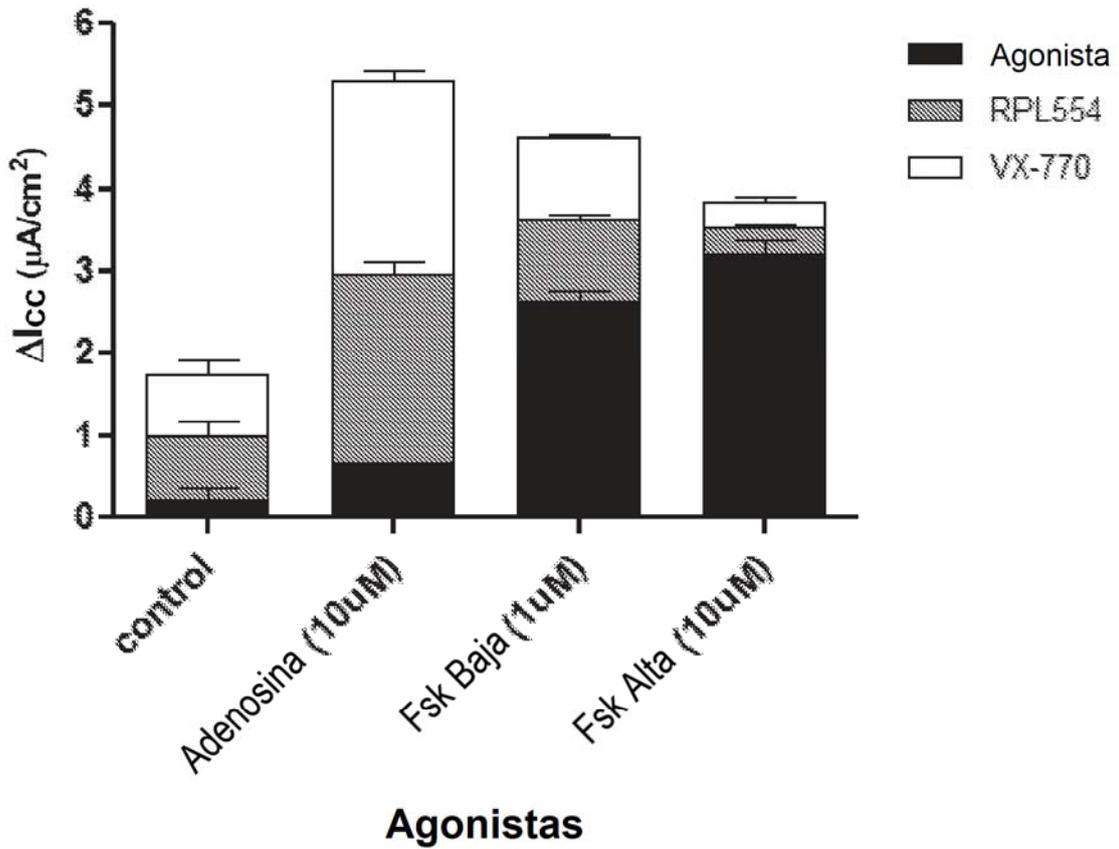


Figura 17

Efecto del agonista después de la forskolina

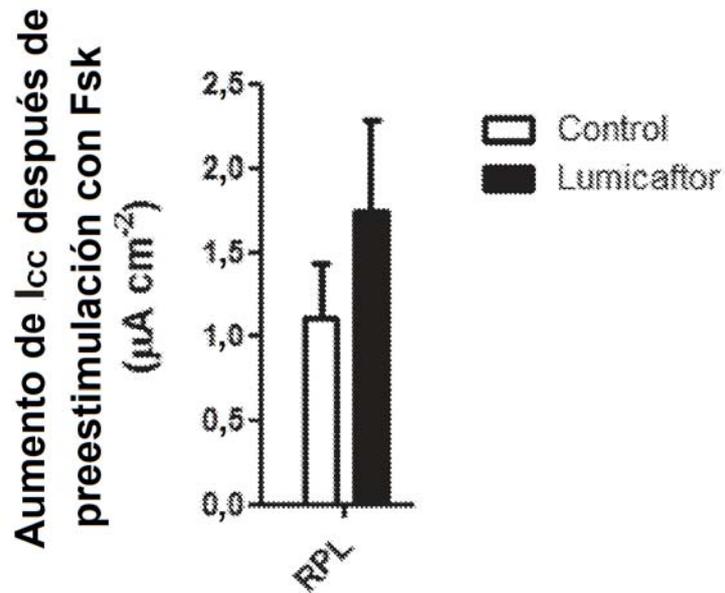


Figura 18

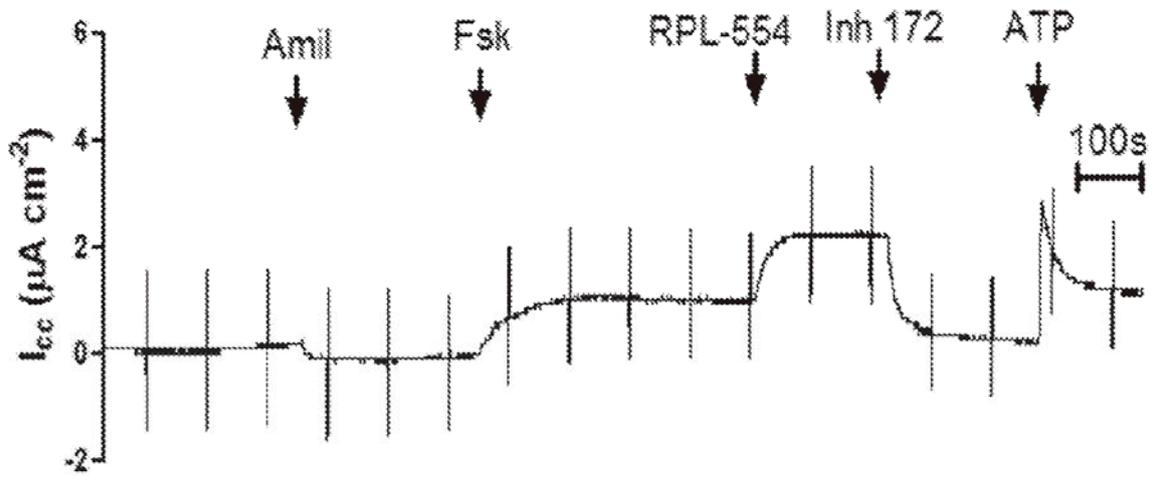


Figura 19