

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 062**

51 Int. Cl.:

A61K 31/215 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2007** **E 15160222 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2921172**

54 Título: **Combinación de un inhibidor de HMG-CoA reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfatasa sintasa para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la persistencia y/o acumulación de proteínas preniladas**

30 Prioridad:

05.07.2006 FR 0606097

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (25.0%)
Jardin Pharo, 58 boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cedex 13, FR;
ASSOCIATION FRANCAISE CONTRE LES
MYOPATHIES (AFM) (25.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE
MARSEILLE (25.0%) y
UNIVERSIDAD DE OVIEDO (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LEVY, NICOLAS;
CAU, PIERRE y
LÓPEZ-OTIN, CARLOS**

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

ES 2 702 062 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

Combinación de un inhibidor de HMG-CoA reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfatasa sintasa para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la persistencia y/o acumulación de proteínas preniladas

5 La presente invención se encuentra en el campo del tratamiento de afecciones, patológicas o no, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de proteínas preniladas.

10 El núcleo de las células eucariotas se delimita por una doble membrana con poros, la envoltura nuclear, que controla los intercambios moleculares entre los dos compartimentos nuclear y citoplasmático. Esta envoltura aísla parcialmente el contenido del núcleo, es decir, el material genético y toda la maquinaria enzimática necesaria para las funciones del genoma nuclear.

15 La envoltura del núcleo consiste en dos membranas concéntricas, la membrana externa, en continuidad con el retículo endoplasmático, y la membrana interna. La última está bordeada en su cara interna por una densa malla fibrilar denominada la lámina nuclear. Ésta es una red proteica compuesta básicamente por polímeros de láminas y proteínas asociadas. En los vertebrados, hay dos sub-clases de láminas: láminas de tipo A (láminas A y C), y láminas de tipo B (láminas B1, B2 y B3), que participan en la producción de la lámina. Esta última se mantiene en su lugar por la asociación con otras proteínas, fijadas a la membrana interna de la envoltura nuclear (para revisión, Gruenbaum y col. 2005).

25 Las láminas son proteínas en forma de filamentos que pertenecen a la familia de los filamentos intermedios (tipo V), que tienen una estructura en común: un segmento globular N-terminal corto (la cabeza) separado de otro segmento globular C-terminal (la cola) por un dominio central largo organizado en varias hélices alfa (el *rod domain*). La cola globular contiene, en particular, una señal de localización nuclear (NLS) que permite el direccionamiento del núcleo después de la síntesis. El dominio central permite la asociación de dos moléculas de lámina paralelas y su organización en filamentos mediante la organización de dímeros en orientaciones opuestas. Esta estructura confiere propiedades mecánicas muy resistentes en ellos.

30 Únicamente la lámina de tipo A y las láminas de tipo B experimentan la maduración después de la síntesis de un precursor (para revisión, Gruenbaum y col. 2000). La lámina de tipo C se sintetiza directamente en su forma madura.

35 El precursor de la lámina de tipo A y las láminas de tipo B termina en una unidad *CaaX* característica (*C* es una cisteína, *a* un aminoácido con una cadena alifática no cargada, y *X* cualquier aminoácido, aquí una metionina, para revisión, Levy & Cau 2003).

40 La unidad *CaaX* C-terminal permite la fijación de un ácido graso (en general, un ácido graso C15, farnesilo) en virtud de una farnesil-transferasa. Esta prenilación (la unidad farnesilo se obtiene a partir de una unidad alifática base C5 denominada isopreno) permite que la prelamina se inserte en la membrana del retículo endoplasmático después de su síntesis en el citosol. Aquí, experimentan la acción de una endoproteasa, insertada en la membrana de la envoltura del retículo y cuyo sitio activo es citosólico. La endoproteasa específica de la prelamina A es Face1 (o ZMPSTE24 (homólogo de Metallo-Proteasa de zinc (*Zinc Metallo-Protease*)) de levadura STE24), mientras que Face2 (o Rce1, enzima convertidora de Ras (*Ras-converting enzyme*)) es específica para las prelaminas B. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de la unión peptídica entre la cisteína y el siguiente aminoácido (alifático), que acorta las prelaminas en 3 aminoácidos. Después, el extremo carboxilo de la cisteína farnesilada se reconoce por una isoprenilcisteína-carboximetil transferasa (ICMT), que fija un grupo metilo al mismo por esterificación.

50 Únicamente la maduración de la prelamina A continúa con una segunda escisión endoproteolítica por Face1, que libera un péptido farnesilo de 15 aminoácidos y una lámina A madura. Esta lámina A, que ya no incluye el ácido graso, se vuelve soluble, y se importa al núcleo en virtud de su señal de localización nuclear, y se sitúa en la propia lámina nuclear, así como en el resto del compartimento del núcleo, constituyendo un auténtico esqueleto nuclear (Gruenbaum y col. 2005). Por otro lado, la lámina B madura B aún tiene en el extremo C-terminal su cisteína farnesilada y metil esterificada. Por lo tanto, permanece insertada en la membrana de envoltura del retículo, y después en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear, y tiene su ubicación exclusiva en la lámina del núcleo, y bajo la membrana interna de la envoltura nuclear donde se ancla.

60 El término prenilación debería interpretarse como la fijación al grupo tiol de una cisteína cualquiera de una cadena farnesilo de 15 átomos de carbono, y después se habla de farnesilación, o una cadena de geranylgeranilo de 20 átomos de carbono, geranylgeranilación (Reid y col. 2004), o de cualquier otro derivado de isopreno.

La farnesilación, catalizada por la farnesil-transferasa (FTasa), que reconoce la secuencia consenso C-terminal (*CaaX*), fija preferiblemente un grupo farnesilo al residuo de cisteína de la unidad.

65 La geranylgeranilación es la fijación mediante geranylgeranil-transferasa (GGTasa) de un grupo geranylgeranilo al residuo de cisteína de la unidad.

Estos ácidos grasos son resultado del método de biosíntesis que, usando hidroximetil-glutaril-Coenzima A, se usa por las células para fabricar, en particular, colesterol, esteroides, el grupo hemo de la hemoglobina y ubiquinonas (Hampton y col. 1996).

5 La familia de las proteínas preniladas comprende aproximadamente 300 miembros en el genoma humano, la mayor parte de las cuales puede identificarse por la unidad C-terminal *CaaX* (Reid y col. 2004). Las proteínas de las familias *Ras*, *Rho*, *Rab* (Leung y col. 2006), ciertas proteínas que cumplen una importante función para la mitocondria (HDJ2), algunas proteínas mitóticas (CENPE, CENPF) están particularmente preniladas (Winter-Vann y Casey 2005). En general, si en la unidad *CaaX* X es una serina, una metionina, una cisteína, una alanina o un glutamato, el isoprenoide preferiblemente injertado es farnesilo. Si X es una leucina, la unidad *CaaL* se reconocerá preferiblemente por la GGTasa, que catalizará la transferencia de un grupo geranylgeranilo (Basso y col. 2006). Es probable que otros grupos obtenidos a partir de isopreno puedan fijarse también a esta cisteína, aunque no se describe en la bibliografía.

15 En los seres humanos, existen tres genes lámina. El gen *LMNA*, situado en 1q21.2-q21.3 (Wydner y col. 1996), proporciona las láminas A y C mediante empalme alternativo. El gen *LMNA* está compuesto por 12 exones. El inicio del exón 1 codifica el extremo globular N-terminal común a las láminas A y C; el final del exón 1 y hasta el inicio del exón 7 codifican la parte helicoidal central; finalmente, los demás exones codifican el extremo globular C-terminal (Levy y Cau 2003).

20 De hecho, el gen codifica 4 productos empalmados de forma diferente, cuyas láminas C y prelamina A son los dos principales (Lin y Worman 1993). La producción diferencial de las láminas A y C se hace mediante el uso de un sitio de empalme alternativo en el exón 10 del pre-mensajero, de manera que la lámina C se codifique por los exones de 1 a 10 y la lámina A se codifique por los exones de 1 a 9, los primeros 90 pares de bases del exón 10, y los exones 25 11 y 12 (lámina A específica).

Por consiguiente, los péptidos prelamina A y lámina C son idénticos en los primeros 566 aminoácidos, conteniendo los extremos C-terminal de las láminas C y la prelamina A siguiente respectivamente 6 y 98 aminoácidos específicos.

30 Las láminas de tipo B comprenden tres proteínas diferentes (Shelton y col. 1981): las láminas B1, B2 (las dos isoformas más representadas) y B3. El gen *LMNB1* se sitúa en 5q23.3-q31.1 y comprende 11 exones que codifican la lámina B1 (Lin y Worman 1995). El gen *LMNB2* se sitúa en 19p13.3 y codifica las láminas B2 y B3 mediante un mecanismo de empalme alternativo (Biamonti y col. 1992).

35 Las láminas de tipo B se expresan constitutivamente en todas las células desde las primeras fases de desarrollo, mientras las láminas de tipo A en general están ausentes en las células de cepas embrionarias (Rober y col. 1989, Stewart y col. 1987) y se expresan en todas las células somáticas diferenciadas. Su expresión se somete a las regulaciones de acuerdo con el tejido y durante la vida (Duque y col. 2006). Parece que su expresión no es necesaria, puesto que los ratones en los que se ha bloqueado la expresión de la lámina A, pero que expresan todos la misma lámina C y las demás láminas, no tienen ningún fenotipo aparente (Fong y col. 2006).

45 Las láminas interactúan con un número muy elevado de compañeros proteicos que tienen funciones muy diversas; en consecuencia, están implicados en un gran número de procesos nucleares, incluyendo la replicación y la reparación del ADN, el control de la transcripción y el empalme, la organización de la estructura de la cromatina (para revisión, véase Shumaker y col. 2003, Zastrow y col. 2004, Hutchison y col. 2004, Gruenbaum y col. 2005). Las alteraciones de la estructura de la lámina dan lugar a numerosas patologías hereditarias humanas. Se deben a mutaciones de los genes que codifican las láminas, u otras proteínas de la lámina. Estas patologías se han agrupado todas en el término genérico laminopatías (Broers y col. 2006, Mattout y col. 2006). Recientemente, se han identificado mutaciones en los genes de las enzimas responsables de la maduración de las láminas (Face1 en particular), dando lugar a patologías que también pertenecen al grupo de las laminopatías (Navarro y col. 2004 y 50 2005).

55 En la actualidad, la única patología en seres humanos relacionada con mutaciones de los genes *LMNB1* o *2* es una leucodistrofia causada por una duplicación completa del gen *LMNB1* (Padiath y col. 2006). Sigue existiendo la duda acerca de la implicación potencial de las variaciones de secuencias encontradas en *LMNB2* en pacientes que padecen el síndrome de Barraquer-Simon (Hegele y col. 2006). Sin embargo, se ha demostrado *in vitro* mediante experimentos de ARNi (ARN-interferencia) (Harborth y col. 2001), y en el modelo murino (Vergnes y col. 2004), que las láminas de tipo B son esenciales para el desarrollo y la integridad celular. Esto se debe a que una deficiencia en la lámina B1 provoca mortalidad perinatal en ratones. Además, los núcleos de los fibroblastos embrionarios de los mismos ratones deficientes en *LMNB1* muestran alteraciones notables en la morfología nuclear, cercanas a las observadas en pacientes portadores de mutaciones del gen *LMNA*. Además, recientemente se ha mostrado que las láminas de tipo B son necesarias para la formación del huso de división durante la mitosis, lo que tiende a demostrar que su función es dinámica y múltiple durante el ciclo celular, no sólo restringido al mantenimiento de la arquitectura del núcleo (Tsai y col. 2006). Acerca de esta última función, un artículo reciente demuestra la función estructural de las láminas de tipo B: Las células privadas artificialmente de láminas de tipo B1 tienen un núcleo "flotante" en la 65

célula, que gira sobre sí mismo (Li y col. 2007). La redundancia funcional existente entre las dos láminas B1 y B2 es también sin duda un reflejo directo de su indispensabilidad, ejerciendo una fuerte presión de selección y enmascarando el efecto de cualquier mutación de la secuencia de los genes correspondientes.

- 5 Las alteraciones funcionales en las láminas A/C, debidas a mutaciones del gen *LMNA*, dan lugar a al menos 15 trastornos que incluyen patologías muy diversas en el espectro clínico que varían de formas leves, que afectan a un tejido de forma aislada, a formas sistémicas que son mortales en el periodo perinatal.

10 Muchas mutaciones del gen *LMNA* modifican de forma apreciable el conjunto de proteínas en la envoltura nuclear y perturban su funcionamiento. En las células de diversos tejidos, la morfología de los núcleos está alterada: con frecuencia tienen hernias que extruyen material genético en el citoplasma (Goldman y col. 2004).

15 Las proteínas asociadas normalmente a la envoltura nuclear, las láminas B, ciertas proteínas de los poros nucleares y las proteínas LAP2, están ausentes de la periferia de estas hernias.

Estas anomalías morfológicas están seguidas de alteraciones funcionales, que finalizan causando muertes celulares. Entre todas las patologías agrupadas bajo el término de laminopatías, únicamente se hace referencia por la presente invención a las relacionadas con la acumulación anormal de una forma prenilada de proteína.

- 20 Estas son principalmente el síndrome de Hutchinson-Gilford, o Progeria (De Sandre-Giovannoli y col. 2003, Eriksson y col. 2003), y la dermatopatía restrictiva (Navarro y col. 2004). En estos 2 síndromes, la causa fisiopatológica es una acumulación y persistencia en las células de los pacientes de prelamina farnesilada no madura.

25 La dermatopatía restrictiva, letal alrededor del periodo natal, se caracteriza por signos clínicos que son casi todos la consecuencia de un déficit cutáneo que restringe los movimientos *in utero*. Esta patología es muy rara. La piel es rígida y tensa, y cede en algunos lugares, causando, por ejemplo, desgarros en las axilas o el cuello. Las pestañas, cejas y pelo de la piel están ausentes o muy escasos. A menudo está presente hidramnios, y se señala una reducción de movimientos fetales a partir del sexto mes de embarazo. A nivel esquelético, la radiografía revela contracciones en todas las articulaciones, pies deformados, clavículas finas, displásicos y bipartidas, costillas en forma de cinta, huesos largos tubulares de los brazos y desmineralización en el cráneo. La transmisión de la dermatopatía restrictiva mortal es recesiva autosómica.

35 Se han indicado las mutaciones de *LMNA* y *ZMPSTE24/Face1* para esta patología (Navarro y col. 2004). En ambos casos, el mecanismo fisiopatológico es el mismo: la prelamina A no puede madurar (mutación nula de *Face1* o desaparición del sitio de escisión por la mutación de la prelamina A), y permanece farnesilada y, por lo tanto, insertada en la membrana nuclear. La acumulación y persistencia en las células de estos precursores anormales, que probablemente impiden una interacción normal de las láminas B y C con sus compañeros, provoca la muerte de las células y, muy pronto, del paciente. Se ha demostrado claramente que, de hecho, es la persistencia del grupo farnesilado en lugar de la ausencia de la lámina A madura, como podría haberse pensado en primer lugar, la responsable de la toxicidad celular (Fong y col. 2004).

45 En abril de 2003, a partir de una verificación cruzada de los síntomas comunes a la displasia acromandibular y algunas enfermedades que se traducen en un envejecimiento prematuro, los inventores mostraron que la Progeria, la forma más típica y más grave de envejecimiento prematuro, es resultado de una mutación del gen *LMNA* (De Sandre-Giovannoli y col. 2003). Los niños afectados por esta enfermedad, también denominada como síndrome de Hutchinson-Gilford, padecen envejecimiento acelerado, hasta diez veces más rápido que el de un individuo normal, y tienen una esperanza de vida que no excede los 13 años. En Francia, uno niño de aproximadamente seis millones se ve afectado. Los síntomas son envejecimiento cutáneo, calvicie, reducción del tamaño de la mandíbula y problemas relacionados con la vejez, por ejemplo, rigidez en las articulaciones y trastornos cardiovasculares. Los últimos, tales como infarto de miocardio o arteriosclerosis son a menudo la causa de la muerte.

50 El documento EP 1 127 573 29 describe unas composiciones y métodos de tratamiento de la osteoporosis. En particular, describe una composición que comprende conjuntamente una estatina y un polifosfonato para disminuir la tasa de colesterol en los conejos. Esta composición se describe como susceptible de ser utilizada en el tratamiento de una pérdida ósea (por ejemplo, osteoporosis) y/o el tratamiento de la aterosclerosis.

60 La mutación implicada, situada en el exón 11 del gen *LMNA*, activa un sitio de empalme críptico del pre-ARNm, que conduce a un ARNm borrado de 150 nucleótidos (De Sandre-Giovannoli y col. 2003, Eriksson y col. 2003). Este ARNm borrado se traduce en una prelamina A anormal, la progerina, que no puede madurar en la lámina A normal: La ausencia de 50 aminoácidos del exón 11 que comprende el sitio de reconocimiento de la proteasa bloquea la segunda escisión de la progerina, cuyo extremo C-terminal conserva su grupo farnesilado. Por lo tanto, permanece insertado en la cara nucleoplásmica de la envoltura nuclear, que tiene unas alteraciones características, hernias del nucleoplasma en el citosol y anomalías en la distribución de la heterocromatina periférica (Goldman y col. 2004). Aquí también, es la persistencia del grupo farnesilado, además necesario para el anclaje a la membrana de la envoltura del retículo en la que se sitúan algunas de las enzimas responsables de la maduración (escisión, metilación) que es responsable de la toxicidad celular de la progerina (Fong y col. 2004).

Estas patologías sistémicas tienen la particularidad de estar relacionadas con la aparición prematura de signos relacionados normalmente con el envejecimiento. Su característica fisiopatológica común es generar una lámina prenilada, con las consecuencias descritas.

5 Dos estudios recientes han mostrado que una reducción de la acumulación intranuclear de la prelamina farnesilada, truncada o no, previene de forma eficaz la aparición del fenotipo celular. El primero se realizó en el modelo murino progeroide deficiente en proteasa Face1 (Pendas y col. 2002). Cuando se cruzan con ratones que expresan la mitad menos de la lámina A (ratón *LMNA +/-*), los efectos de la ausencia de Face1 son menores (Verela y col. 2005). El segundo estudio muestra que el tratamiento de las células de pacientes HGPS con morfolino (oligonucleótidos antisentido) dirigido al sitio de empalme críptico elimina el fenotipo mutante (Scaffidi y Mistelli 2005).

15 Varios estudios recientes (Scaffidi y Mistelli 2006, Cao y col. 2007) muestran la implicación de la lámina A en el proceso de envejecimiento fisiológico. En particular, se ha demostrado que, durante el envejecimiento fisiológico, se acumula con el tiempo una lámina A aberrante en la periferia del núcleo celular. Esta lámina aberrante es de hecho progerina, la célula, que usa accidentalmente cada cierto tiempo durante su vida y funcionamiento normales el sitio de empalme críptico del exón 11, acumulándose poco a poco la progerina producida bajo la lámina. Finalmente, la célula de edad "normal" puede presentar hernias características de una laminopatía causada por estos eventos de empalme accidentales, que causan su muerte.

20 Parece que los mecanismos moleculares idénticos son responsables en primer lugar de los signos de envejecimiento prematuro en individuos que padecen Progeria y, en segundo lugar, a un nivel muy inferior, están implicados en el envejecimiento fisiológico de los individuos no portadores de mutaciones.

25 Existen en la técnica anterior dos enfoques terapéuticos descritos para mejorar el fenotipo celular causado por la producción patológica de progerina. La primera de estas soluciones es bastante sencilla para prevenir el uso por parte del espliceosoma de este sitio de empalme críptico en el exón 11, "enmascarándolo" mediante tratamiento con un oligonucleótido antisentido (Scaffidi y Mistelli 2005), o con un retrovirus que produce un ARNsi (Huang y col. 2005). Los resultados son prometedores *in vitro*, pero se trata aquí de un caso de terapia "génica", y el desarrollo de una medicación en torno a este enfoque es necesariamente largo y complicado, con todos los inconvenientes relacionados con la vectorización del OAS para obtener un efecto *in vivo*. La segunda solución consiste en inhibir la farnesil-transferasa, la enzima que cataliza la transferencia del grupo farnesilo en las prelaminas de farnesil-pirofosfato. Cuando se usan dichos inhibidores (FTI), únicamente se restaura parcialmente una envoltura nuclear "normal" en las células HGPS (Progeria) en cultivo, y la supervivencia de los ratones RD (KO ZMPSTE24) mejora (Glynn & Glover 2005, Capell y col. 2005, Toth y col. 2005, Fong y col. 2006).

35 Sin embargo, el bloqueo y la farnesilación pueden causar una geranilgeranilación compensatoria (Bishop y col. 2003).

40 Además, se ha indicado recientemente que los FTI provocan una detención del ciclo celular bloqueando el proteasoma (Demyanets y col. 2006, Efué & Keyomarsi 2006). Por lo tanto, sin duda, el tratamiento provoca una acumulación en el nucleoplasma de progerina probablemente ubiquitinilada no degradada por el proteasoma.

45 Además, trabajos recientes informan que la reducción en el nivel de farnesilación de la progerina *in vivo* es muy bajo, aproximadamente el 5% (Young y col. 2006), lo que no es suficiente para explicar la restauración de la morfología nuclear observada *in vitro*.

Finalmente, los FTI son específicos de únicamente una de las rutas de prenilación de proteínas y no pueden contemplarse como inhibidores globales de prenilaciones de post-traducción.

50 Además, se indica que la ausencia total de una de las enzimas de esta ruta, la mevalonato-cinasa, es mortal durante la infancia (mutación homocigota, pérdida de la función del gen codificante de esta enzima, un síndrome indicado por Hoffmann y col. 2003).

55 Después de una laboriosa investigación, los inventores han demostrado que la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (familia de las estatinas) y un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa (familia de los amino-bifosfonatos, NBP), o de una de sus sales fisiológicamente aceptables, es un tratamiento eficaz para afecciones, patológicas o de otro modo, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de proteínas preniladas, en el sentido en que bloquea la totalidad del canal de prenilación de proteínas, tanto C15 como C20, o en las formas no caracterizadas. Los inventores también han descubierto que la asociación de un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa tiene un efecto sinérgico en la restauración del fenotipo normal en los fibroblastos de pacientes afectados con Progeria. El efecto de la asociación es notablemente mayor que el efecto de uno u otro de los inhibidores usados individualmente.

65 El uso de la asociación en las células de pacientes que padecen Progeria conduce a una inhibición de la prenilación de proteínas y, por lo tanto, a la aparición de prelamina A no farnesilada y la mejora de los síntomas nucleares.

5 Los resultados hacen posible contemplar el uso de un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, en la preparación de una composición, en particular de una composición farmacéutica, destinada para el tratamiento de afecciones, patológicas o de otro modo, relacionadas con la acumulación y/o persistencia de proteínas preniladas en las células.

10 Por lo tanto, un objeto de la invención es una composición que comprende un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, para su uso en el tratamiento de afecciones patológicas que implican signos de envejecimiento, ya sea natural, prematuro o acelerado elegidos entre el deterioro del endotelio vascular, el envejecimiento de la piel, y la lisis ósea, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina y/o de prelamina A farnesilada.

15 También se encuentra dentro del alcance de la invención usar compuestos que son tanto inhibidores de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa como inhibidores de la farnesil-pirofosfato sintasa. La invención tiene igualmente como objeto el uso no terapéutico de la composición que comprende un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y de un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa, o de una de sus sales fisiológicamente aceptable, en el tratamiento de situaciones no patológicas que implican signos de envejecimiento natural elegidos entre el deterioro del endotelio vascular y el envejecimiento de la piel, relacionados con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina y/o de prelamina A farnesilada.

20 En la presente, también se describe que la composición según la invención puede estar destinada para el tratamiento de afecciones, patológicas o de otro modo, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina, incluso aún más particularmente, con el tratamiento de afecciones relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de prelamina A farnesilada, ya esté o no truncada o modificada.

25 Especialmente, puesto que se admite que el envejecimiento fisiológico hace intervenir la acumulación de progerina en las células en el transcurso de la vida y que la progerina se concentra en particular en las células mesenquimales, la composición según la invención puede estar destinada a prevenir los efectos del envejecimiento celular, a nivel de la piel y/o del endotelio vascular.

30 La composición de acuerdo con la invención puede estar destinada para el tratamiento de cualquier ser vivo, humano o animal, particularmente para la prevención de los efectos del envejecimiento celular. Por lo tanto, la composición encuentra una aplicación tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

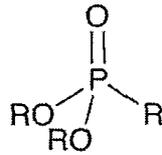
35 De acuerdo con la invención, cualquier inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, puede usarse en la preparación de la composición de acuerdo con la invención.

40 Las sales fisiológicamente aceptables pueden ser, por ejemplo, sales formadas con ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico o fosfórico, ácidos carboxílicos, tales como, por ejemplo, ácidos acético, fórmico, propiónico, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tártrico, cítrico, oxálico, glioxílico o aspártico, alcanosulfónicos, tales como ácidos metano o etano sulfónicos, o arilsulfónico, tales como ácidos benceno o paratolueno sulfónicos.

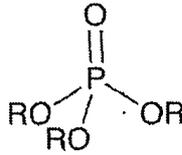
45 Particularmente, el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa puede ser uno de los miembros de la familia de los polifosfonatos, particularmente aminobisfosfonatos (NBP), o una de sus sales fisiológicamente aceptables.

Los polifosfonatos son moléculas sintéticas muy usadas en el tratamiento de la osteoporosis y la regeneración ósea.

El término fosfonato se aplica a las moléculas muy similares al fosfato:



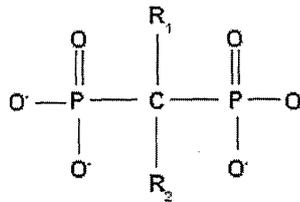
Fosfonato



Fosfato

El núcleo de los bisfosfonatos (BP) es equivalente a un enlace P-O-P como en ATP, por ejemplo, pero donde el oxígeno se reemplaza por un carbono. Esto confiere especial estabilidad a estas moléculas.

5 Un simple bisfosfonato será equivalente a ADP, reemplazándose los dos grupos fosfato ($\text{O}_3\text{P}-$) por el grupo bisfosfonato.

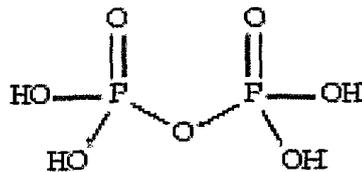


10 El carbono central, a diferencia del oxígeno en los fosfatos, también puede estar implicado en dos enlaces, y es la naturaleza de los grupos injertados sobre este carbono la que hace la especificidad de los bisfosfonatos.

15 Cuando las cadenas "laterales" (R_1 y R_2) comprenden una función amina (NH), o más generalmente uno o más átomos de nitrógeno, se habla de amino bisfosfonato, o NBP.

Naturalmente, pueden fijarse otros sustituyentes a los oxígenos.

Se usa ácido pirofosfórico, o pirofosfonato en solución (PPi)



20 Ácido pirofosfórico

en muchas reacciones metabólicas como un transportador de sustratos, y se restaura al final de la reacción. Una de las rutas metabólicas que usa moléculas acopladas a pirofosfato es la de la prenilación de proteínas.

25 El injerto de isopentenil-PP (unidad de base en C5) en un geranil-PP (C10) para dar farnesil-PP, una reacción catalizada por la enzima farnesil-pirofosfato sintasa (FPS), libera un PPi.

Es esta etapa la que se inhibe específicamente por los NBP.

30 A este respecto, y a modo de ejemplo, el aminobisfosfonato (inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa) puede escogerse entre

- ácido alendrónico o su forma iónica, alendronato;
- ácido ibandrónico o su forma iónica, ibandronato;
- 35 - ácido neridrónico o su forma iónica, neridronato;
- ácido olpadrónico o su forma iónica, olpadronato;

- ácido pamidrónico o su forma iónica, pamidronato;
 - ácido risedrónico o su forma iónica, risedronato;
 - ácido zoledrónico o su forma iónica, zoledronato;
 - ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico o su forma iónica, dimetilaminometanodifosfonato;
- 5 - α -amino-(4-hidroxibencilideno) difosfonato.

Preferiblemente, de acuerdo con la invención, se prefiere usar ácido zoledrónico (también denominado ácido zolendrónico) o su forma iónica, zoledronato (también denominado zolendronato).

- 10 De acuerdo con la invención, puede usarse cualquier inhibidor de la HMG-CoA reductasa, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, en la preparación de la composición.

En particular, el inhibidor de HMG-CoA reductasa puede ser una molécula de la familia de las estatinas, ya sea liposoluble o hidrosoluble, o una de sus sales fisiológicamente aceptables.

- 15 Las estatinas se han revelado en los champiñones. Tienen una actividad inhibidora para HMG-CoA reductasa, una enzima clave en la biosíntesis de colesterol y esteroides, que cataliza la reducción del hidroximetilglutarato acoplado a la coenzima A en ácido mevalónico (mevalonato en solución). Esta inhibición se proporciona por su analogía estructural con la estructura del hidroximetilglutarato. La ruta metabólica implicada es ciertamente la de la biosíntesis de colesterol, pero también es la de la síntesis de los grupos prenilo, los polímeros de la unidad de base con 5 carbonos de isopreno usados para modificar aproximadamente 300 proteínas en las células y fijarlas a una cola lipófila, permitiendo, en particular, su anclaje en las membranas.

- 20 Los poliprenos principales, todos procedentes de piruvato y HMG-CoA, son geranilo (C10), farnesilo (C15) y geranylgeranilo (C20).

- 25 Todas las estatinas son hepatoselectivas globalmente, pero no todas tienen el mismo modo de entrada en las células. Esto se debe a que la pravastatina y la rosuvastatina son ambas hidrófilas y, por lo tanto, hidrosolubles, a diferencia de las demás, que son lipófilas y, por lo tanto, pueden difundirse libremente a través de las membranas plasmáticas (bicapas lipídicas), lo que sin duda explica su elevada toxicidad. Las estatinas hidrosolubles necesitan un transportador específico para entrar en la célula, transportador para aniones orgánicos 3 (*Organic Anion Transporter 3*), o OAT3, o SLC22A8 (Takeda y col. 2004).

- 30 Se usan mucho para el tratamiento de hipercolesterolemia, y sus efectos secundarios, que son raros, están bien caracterizados. Estos son, en particular, casos de rhabdomiolisis (del 1 % al 7 % de los casos según la molécula usada, Evans y col. 2002), cuya señal precursora, dolor muscular en el paciente que se trata, da lugar a la detención inmediata del tratamiento.

- 35 A este respecto, y a modo de ejemplo, una estatina puede escogerse entre atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina (o compactina), fludostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, lovastatina, pitavastatina, o una de sus sales fisiológicamente aceptables.

- 40 La lovastatina, pravastatina y simvastatina son moléculas obtenidas a partir de metabolitos fúngicos, mientras que las demás (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitavastatina y rosuvastatina) son completamente sintéticas. Preferiblemente, de acuerdo con la invención, se usa pravastatina, una estatina hidrosoluble semi-natural.

Naturalmente, es posible de acuerdo con la invención usar uno o incluso dos o más inhibidores de la farnesil-pirofosfato sintasa asociados a uno o incluso dos o más inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

- 45 50 En la presente, se describe igualmente que la composición puede estar destinada para el tratamiento de afecciones patológicas que requieren la inhibición de la prenilación de proteínas. Estas patologías pueden etiquetarse o no, por ejemplo, síndrome de Costello o Noonan, síndrome cardio-fascio-cutáneo, o enfermedades relacionadas con una prenilación anormal o persistente de Ras y proteínas de transducción de señal.

- 55 De acuerdo con la invención, la composición puede estar destinada para el tratamiento de afecciones patológicas que presentan signos de envejecimiento, ya sea natural, prematuro o acelerado seleccionadas entre el deterioro del endotelio vascular (protección del endotelio vascular) de envejecimiento de la piel y de lisis ósea, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina y/o de prelamina A farnesilada.

- 60 En la presente, se describe igualmente que la composición de acuerdo con la invención es una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la Progeria (HGPS, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford) y dermatopatía restrictiva (RD).

- 65 De acuerdo con la invención, el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa y el inhibidor de la HMG-CoA reductasa están presentes ventajosamente en la composición en dosis fisiológicamente eficaces.

En términos generales, las dosis que se van a administrar pueden adaptarse por los expertos en la técnica según el paciente, la patología, el modo de administración, etc. Naturalmente, pueden realizarse administraciones repetidas, posiblemente en combinación con otros principios activos o cualquier vehículo aceptable a un nivel fisiológico (tampones, soluciones salinas, soluciones isotónicas, con estabilizadores, etc.).

5 En general, la dosis diaria de los inhibidores será la dosis mínima para obtener el efecto terapéutico requerido.

Las composiciones que usan un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa de acuerdo con la invención pueden formularse para la ruta digestiva o parenteral.

10 Dichas composiciones también pueden comprender al menos un principio activo diferente, en particular otro principio terapéuticamente activo, para su uso simultáneo o separado o uso por etapas en el tiempo.

15 De acuerdo con la invención, el inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa pueden usarse en la composición, en una mezcla con uno o más excipientes o en vehículos inertes, es decir, fisiológicamente inactivos y no tóxicos. Por ejemplo, pueden citarse soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas, tamponadas, etc. compatibles con un uso fisiológico y conocidas por los expertos en la materia.

20 Las composiciones pueden contener uno o más agentes o vehículos escogidos entre dispersantes, agentes solubilizantes, estabilizadores, conservantes, etc. Los agentes o vehículos que pueden usarse en las formulaciones (líquidos y/o inyectables y/o sólidos) son, en particular, metil celulosa, hidroximetil celulosa, carboximetil celulosa, ciclodextrinas, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales o animales, acacia, etc.

25 Las composiciones pueden formularse en forma de suspensión inyectable, geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, cápsulas duras, cápsulas, etc., posiblemente por medio de formas galénicas o dispositivos que proporcionan una liberación prolongada y/o retardada. Para este tipo de formulación, se usa ventajosamente un agente tal como celulosa, carbonatos o almidones.

30 La administración puede conseguirse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, preferiblemente por vía oral o inyección, típicamente por vía intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.

Se prefiere la administración por vía oral.

35 En el caso de un tratamiento a largo plazo, el método de administración preferido será sublingual, oral o transcutáneo.

La figura 1 ilustra los resultados obtenidos en la transferencia de Western en fibroblastos de referencia "normales" tratados con dosis en aumento de una estatina hidrosoluble (pravastatina P, de 20 a 100 μm), y un aminobisfosfonato (NBP zoledronato Z, de 20 a 100 μm) ((Rastros A a I, respectivamente P20/Z20, P20/Z60, P20/Z100, P60/Z20, P60/Z60, P60/Z100, P100/Z20, P100/Z60, P100/Z100)). El rastro J es un control positivo para la presencia de prelamina A (fibroblastos de pacientes DR), el rastro K es el control negativo, tratado con el disolvente en solitario (PBS).

40 La figura 2 ilustra los resultados obtenidos a dosis eficaces de cada uno de los productos.

45 La figura 3 ilustra el efecto superior obtenido cuando los 2 productos se administran juntos.

La figura 4 ilustra la acción de la asociación de los 2 productos en células maduras.

La figura 5 ilustra la acción de la asociación de los 2 productos en ratones modelo de Progeria (sin sintetizar la enzima Face1).

50 5a: Fotografía que representa ratones de 3 meses de edad y respectivamente sin tratar, Zmpste24^{-/-} y Zmpste24^{-/-} tratados.

5b: Peso del ratón sin tratar (n = 6), Zmpste24^{-/-} no tratado (n = 7) y tratado (n = 8), a los 3 meses.

5c: Curva de supervivencia (tipo Kaplan-Meier) que muestra la extensión significativa de la supervivencia de hembras tratadas (n = 7) (-o-) en comparación con ratones no tratados (n = 7) (-♦-).

55 5d: Imagen tomográfica, reconstituida en 3D, por un escáner μCT de las tibias de ratones tratados y no tratados (en la parte superior). En la parte inferior, la representación del volumen óseo (a la izquierda, a) y el número de trabéculas por milímetro cuadrado (a la derecha, b).

5e: Cuantificación de anomalías nucleares (%) en células hepáticas. A la izquierda, marcado fluorescente de los núcleos con DAPI, a la derecha, recuento del número de núcleos anormales.

60 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención sin limitarla en ningún modo.

EJEMPLO 1: Efecto sinérgico de la asociación de un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa soluble en agua y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa en cultivos de células normales y progeroides.

65

A) PROTOCOLOS

❖ Células y cultivo celular

- 5 Las líneas celulares son los fibroblastos de referencia AG16409 procedentes del Coriell Institute, o fibroblastos de biopsias de pacientes que padecen Dermopatía Restriictiva. Se cultivan a 37 °C en CO₂ al 5 % en una sala P2.

El medio de cultivo completo normal es

- 10 - RPMI (Invitrogen) complementado con
 - Suero fetal de ternero al 20 % (Invitrogen)
 - L-Glutamina 200 mm (Invitrogen)
 - Mezcla de penicilina/estreptomocina/Fungizona 1 x (Stock 100 x, Cambrex)

15 ❖ Recolección de células

Las células se recolectaron por tripsinización de la siguiente manera (protocolo para un matraz grande, 75 cm², BD Falcon):

- 20 El medio se aspira;
 Las células se lavan con 10 ml de PBS 1 x (Invitrogen), 10 ml;
 Se añaden 5 ml de una solución de tripsina/EDTA 1 x (Cambrex)
 El matraz se incuba durante un periodo de aproximadamente 6 minutos a 37 °C, tiempo durante el cual las células se desprenden;
 25 La tripsina se inhibe por dilución en 15 ml de medio completo;
 Las células se concentran por centrifugación durante 10 minutos a 1000 revoluciones por minuto a 16 °C;
 El concentrado se suspende de nuevo en 2 ml de PBS 1 x y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones;
 Las células se congelan para su uso posterior o se trasplantan a partir de este concentrado lavado.

30 ❖ Tratamientos

La solución de pravastatina (estatina soluble en agua) usada se prepara como se indica a continuación:
 Se recogen 40 mg de pravastatina (Sigma Aldrich, P4498) en agua estéril para formar una solución madre a 10 mM.

- 35 Las concentraciones finales ensayadas fueron 500 nM, 1, 5, 50 y 100 μM, obtenidas diluyendo la solución madre en medio completo.

La solución de zoledronato (NBP) usada se prepara como se indica a continuación:

- 40 Una solución madre de ácido (1-hidroxi-2-imidazol-1-il-fosfono-etil)fosfónico (0,8 mg/ml, Novartis) se ajusta a una concentración de 2 mM.

Las concentraciones ensayadas fueron 500 mM, 1, 5, 50 y 100 μM, obtenidas diluyendo la solución madre en medio completo.

45 ❖ Transferencia de Western

○ Preparación de las células

Para un experimento de transferencia de Western, las células se trataron como se indica a continuación:

- 50 Se siembran aproximadamente 7,5 x 10⁵ células en un matraz grande y se cultivan en las siguientes condiciones hasta que casi hay confluencia (4 días).

Al final de los 4 días, las células se lavan con PBS 1 x y se recogen en medio completo complementado con el tratamiento.

- 55 Las células se incuban durante el tiempo de procesamiento (de 6 a 72 horas, secuencial o simultáneamente) en la incubadora a 37 °C.

Al final del tratamiento, las células se tripsinizan (protocolo anterior) y el concentrado obtenido se almacena a -80 °C hasta que se extraen las proteínas.

- 60 ○ Extracción de las proteínas para transferencia de Western

El concentrado celular se recoge en 300 μl de tampón de lisis

- 65 Triton X100 1 %

ES 2 702 062 T3

SDS	0,1 %
Desoxicolato sódico	0,5 %
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
TrisHCl pH 7,4	20 mM
Inhibidor de proteasa (Roche 11697498001)	1 gránulo por 50 ml

Improvisadamente, se añaden

Ortovanadato sódico	1 mM
PMSF	1 mM

5 Las células se exponen a sonicación 2 veces durante 30 segundos (*Brandson Sonifier Cell Disruptor B15*).

Los desechos celulares se centrifugan durante 10 minutos a 10.000 revoluciones por minuto a 4 °C.

El sobrenadante proteico se almacena a -80 °C hasta su uso.

10

La dosificación de las proteínas se realiza en la descongelación.

○ Transferencia de Western

15 ■ Gel

Se usa convencionalmente un gel de acrilamida al 8% para detectar las diferentes formas de láminas de tipo A/C.

Acrilamida/bisacrilamida 37/1	8 %
TrisHCl pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

20 Un gel de concentración se vierte sobre el gel separador

Acrilamida/bisacrilamida 37,5/1	3 %
TrisHCl pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

La concentración proteica de las muestras se analiza, y las alícuotas se ajustan a 50 µg por tubo en tampón de lisis en qsp 15 µl.

25

Se añaden 5 µl de tampón de carga a cada muestra.

SDS	4 %
TrisHCl pH 6,8	100 mM
Glicerol	20 %
β-mercaptoetanol	20 %
Azul de bromofenoll	trazas

Las muestras se desnaturalizan mediante calentamiento durante 5 minutos a 95 °C y se depositan en los pocillos.

30

La migración tiene lugar a 50 y después a 100 voltios, en un tampón

Tris-base	0,3 %
Glicina	1,44 %
SDS	0,1 %

■ *Transferencia*

35

La membrana de transferencia (Hybon P, Amersham Biosciences) se prepara mediante remojo en etanol seguido de un baño de 5 minutos en agua estéril, y 10 minutos en el tampón de transferencia:

Tris-base	12 mM
-----------	-------

ES 2 702 062 T3

Glicina	96 mM
Etanol	20 %

El gel se humedece durante 20 minutos en el tampón de transferencia y después se monta la intercalación (sistema Miniprotean, Biorad).

5 La transferencia tiene lugar en general durante la noche, en una cámara fría, a 10 voltios.

La membrana se aclara en PBS 1 x, se almacena en humedad y se usa tal cual para la detección.

■ Detección

10

La membrana se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de saturación:

Caseína	10 %
Tween 20	0,1 %
PBS	1 x

Se aclara dos veces durante 10 minutos en un tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 %/PBS 1 x).

15

El anticuerpo primario se diluye en el tampón de saturación (detalles y dilución, véase a continuación inmunomarcado).

La membrana se incuba con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

20

Al final, se aclara 3 veces con tampón de lavado y después se lava 3 veces durante 15 minutos con el mismo tampón.

El anticuerpo secundario (sistema acoplado a peroxidasa, Jackson Immunoresearch) se diluye para dar 1/10000^o en un tampón de saturación.

25

La membrana se incuba con esta solución durante 30 a 45 minutos a temperatura ambiente en agitación.

Al final, se aclara 3 veces con tampón de lavado y después se lava 3 veces durante 15 minutos con el mismo tampón.

30

La detección se realiza con el kit ECL Plus Western Blotting System de Amersham Bioscience, de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

Después de la revelación, la membrana se expone en una película Biomax MR (Kodak), durante el tiempo necesario para tener una señal satisfactoria.

35

❖ Inmunomarcado

40

○ Preparación de las células

Un cultivo celular se tripsiniza y las células se cuentan en una célula de Neubauer.

Los pocillos de cultivo tipo Labtech (Nunc, ref. 177399) se siembran, a la velocidad de 5×10^4 células por pocillo.

45

El medio de cultivo completo se complementa por el tratamiento o tratamientos (estatina, NBP, o ambos), y las células se cultivan durante un tiempo *ad hoc*.

Al final, el medio de cultivo se aspira y los pocillos se desmontan.

50

Las placas se lavan en PBS 1 x.

Las células se fijan en una solución al 4 % de paraformaldehído (en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

55

Se realiza un lavado durante 10 minutos en PBS 1 x.

Las células se deshidratan mediante baños sucesivos de 3 minutos en soluciones con un porcentaje de etanol en aumento (70 %, 90 %, 100 %, repitiéndose el último baño).

60

Después del secado, las placas se almacenan a -80 °C hasta su uso.

○ Marcado

Después de la descongelación, las células se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda en 50 µl de una solución de permeabilización:

5	PBS	1 x
	Triton X100	0,5 %
	RNS	5 %
	(Suero Normal de Conejo, Vector S5000)	
	Inhibidor de proteasa	1 pastilla por 50 ml
	(Roche 11697498001)	

Se realizan 3 baños de preincubación cada uno de 15 minutos en 50 µl de la solución de incubación:

PBS	1 x
RNS	5 %
Inhibidor de proteasa	1 pastilla por 50 ml
(Roche 11697498001)	

10 El anticuerpo primario se diluye a 1/100^o en 50 µl de una solución de incubación y se pone en contacto con las células durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

Los anticuerpos primarios usados son de 2 tipos:

- 15
- Anti-lámina A/C de ratón (lado N-terminal), clon 4A7, donado por G Morris (Oswestry, Reino Unido)
 - Anti-prelamina A de cabra (15 aa extremo C-terminal), producto SC6214, Santa Cruz Biotechnology Inc.

Se realizan 3 aclarados en 50 µl de PBS 1 x cada uno durante 15 minutos.

20 La incubación con el anticuerpo secundario tiene lugar durante 1 hora en 50 ml de una solución de incubación a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios son de dos tipos:

- Burro anti-ratón, Jackson Immunoresearch, dilución a 1/100^o
- Burro anti-cabra, Jackson Immunoresearch, dilución a 1/200^o

25 Se realizan 3 aclarados en 50 µl de PBS 1 x cada uno durante 10 minutos.

Se realiza una incubación con 100 µl de una solución DAPI 50 ng/ml (SERVA, ref. 18860) durante 15 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

30 Se realizan 3 aclarados en PBS 1 x en bandejas portaobjetos cada uno durante 5 minutos.

Se realiza un aclarado final durante 5 minutos en una solución al 0,1 % de Tween20 en PBS.

35 ○ Montaje

Las células se sumergen en una gota de VectaShield (Vector), se cubren con un cubreobjetos y se observan en un microscopio de fluorescencia (Leica DMR, Leica Microsystems), equipado con un sistema de cámara coolSNAP (Princeton).

40 B) RESULTADOS

B.1) Transferencia de Western (figura 1)

45 Los fibroblastos de referencia "normales" se trataron con una estatina soluble en agua (pravastatina P, de 20 a 100 µM), y con un aminobisfosfonato (NBP zoledronato Z, de 20 a 100 µM) en asociación (rastros A a I, respectivamente P20/Z20, P20/Z60, P20/Z100, P60/Z20, P60/Z60, P60/Z100, P100/Z20, P100/Z60, P100/Z100). La transferencia de Western muestra la "aparición" de una banda correspondiente al tamaño de la prelamina A inmadura (no truncada) de acuerdo con el aumento de la concentración de las dos moléculas, lo que confirma que la farnesilación es necesaria para la maduración de la lámina A. Este resultado muestra que el bloqueo de la síntesis del farnesil-PP en 2 puntos en la ruta metabólica es más eficaz que un bloqueo en un único punto en la inhibición de la farnesilación de la prelamina A, al menos *ex vivo*.

50 B.2) Respuesta a la dosis y duración en inmunohistoquímica (figura 2)

55 Las curvas de respuesta a la dosis y respuesta a la duración hicieron posible determinar una eficacia máxima

mediendo 2 parámetros en las células de referencia sanas por un lado y después en las células de pacientes HGPS. La combinación más eficaz de pravastatina (soluble en agua)/zoledronato (NBP) se obtiene para 1 μ M de pravastatina durante 24 horas y después zoledronato durante 12 horas: En las células sanas no se observó toxicidad alguna, mientras que en las células HGPS (células con anomalías nucleares), el número de células "deformadas" cae del 75 % al 40 %. Al mismo tiempo, el nivel de prelamina A obtenido en las células sanas es máximo.

B.3) Efecto del tratamiento en inmunohistoquímica (figura 3)

La acción combinada de la pravastatina y zoledronato muestra una mejor eficacia ya que el nivel de prelamina A producido en las células sanas tratadas (calculado al 35 %) es mucho mayor en combinación que si las moléculas se añaden en solitario (respectivamente el 25 % y el 15 %). Por otro lado, el nivel de núcleos deformados (el signo de toxicidad en las células sanas) es mínimo (por debajo del 10 %), menos que en las células tratadas con pravastatina en solitario por ejemplo (aproximadamente el 12 %). Tratamiento: Pravastatina 100 μ M durante 12 horas, zoledronato 20 μ M durante 6 horas.

B.4) Acción sobre las células maduras en la inmunohistoquímica (figura 4)

De acuerdo con el número de "pases" (el número de subcultivos celulares) y, por lo tanto, la edad de las células, la proporción núcleos anormales aumenta, lo que es una característica de las células HGPS no tratadas. Si se tratan, esta proporción se mantiene, e incluso disminuye un poco (menos del 40 % contra más del 80 % en las células tratadas con un placebo). Tratamiento: Pravastatina 1 μ M durante 24 horas, Zoledronato 1 μ M durante 12 horas.

B.5) Conclusión

La combinación pravastatina/zoledronato es eficaz a dosis para las que apenas se observa efecto con las moléculas administradas por separado.

Por lo tanto, el efecto fisiológico del bloqueo del canal de prenilación se obtiene con dosis mucho menores que las usadas en un tratamiento único en los artículos publicados sobre cultivos celulares (Kusuyama y col. 2006, 10 μ M de pravastatina sola en células progenitoras de células vasculares; Flint y col. 1997, 25 μ M de pravastatina sola en células de músculo de rata neonatal).

EJEMPLO 2: Efecto de la combinación de un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa soluble en agua y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa en un modelo de ratón que tiene un síndrome progeroide (figura 5)

Los ratones KO *Zmpste24*^{-/-} usados aquí son los descritos en el artículo citado por Varela y col. 2005. Se crían en un criadero en una atmósfera controlada, en un ciclo de 12 horas día/12 horas noche, a una temperatura de 20 \pm 2 °C y una humedad del 50 % y con acceso cuando lo deseen a comida y agua. Las 2 moléculas (Zometa 100 μ g/kg/día y Pravastatina 100 μ g/kg/día) se disuelven en PBS 1 x y se inyectan por vía intraperitoneal, diariamente, en ratones con una edad de 1 mes hasta su muerte. Los controles son ratones sin tratar, o de tipo salvaje, de la misma camada, tratados con PBS 1 x en solitario. El peso se mide semanalmente, y la supervivencia de los ratones se presenta en una curva (figura 5b).

A la muerte de los ratones, las tibias se diseccionan y se analizan en tomografía por un escáner de μ CT. El número de trabéculas por milímetro se mide mediante el método descrito en Hildebrand y col. 1997 (figura 5d).

Las células hepáticas se muestrean, se fijan en paraformaldehído a 4 °C, se incluyen en parafina y se analizan bajo microscopía confocal después de marcar la cromatina con DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol). El porcentaje de núcleos anormales se calcula por recuento (figura 5e).

La supervivencia de los ratones tratados se mejora en gran medida, y es máxima en particular para las hembras, con una extensión de la duración de vida media en aproximadamente el 80 % (figura 5c). Cada uno de los síntomas clínicos de la enfermedad se reduce considerablemente en comparación con los individuos tratados con PBS solo.

Referencias

- Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR. Farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res* 47:15-31, 2006.
- Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Della Valle G, Saccone S, Riva S et al. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 12:3499-3506, 1992.
- Bishop WR, Kirschmeier P, Baun C. Farnesyl transferase inhibitors: mechanism of action, translational studies and clinical evaluation. *Cancer Biol Ther* 2:S96-104, 2003.

- Broers JL, Hutchinson CJ, Ramaekers FC. Laminopathies. *J Pathol* 204:478-488, 2004.
- Broers JLV, Ramaekers FCS, Bonne G, Ben Yaou R, Hutchinson CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature aging. *Physiol Rev* 86:967-1008,2006.
- 5 • Cadinanos J, Varela I, Lopez-Otin C, Freije JM. From immature lamin to premature aging: molecular pathways and therapeutic opportunities. *Cell Cycle* 4:1732-1735, 2005.
- Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12879-12884, 2005.
- 10 • De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Levy N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300:2055, 2003.
- 15 • Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, Philipp J, Hohensinner PJ, Rega G, Pammer J, Maurer G, Huber K, Wojta J. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 71:1324-1330, 2006.
- Duque G, Rivas D. Age-related changes in Lamin A/C expression in the osteoarticular system: laminopathies as a potential new aging mechanism. *Mech Aging Dev* 127:378-383, 2006.
- 20 • Efué ET, Keyomarsi K. Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* 66:1040-1051, 2006.
- 25 • Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutation in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423:293-298, 2003.
- Evans M, Rees A. The myotoxicity of statins. *Cur Op Lipid*, 13:415-420, 2002.
- 30 • Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture. *Tox Appl Pharmacol* 145:99-110, 1997.
- 35 • Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG. A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science*,311 : 1621-1623, 2006.
- Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Côté N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, Young SG. Prelamin A and Lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* 116:743-752, 2006.
- 40 • Fong LG, Ng JK, Meta M, Cote N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K, Bergo MO, Young SG. Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:18111-18116, 2004.
- 45 • Glynn MW, Glover TW. Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchison-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet* 14:2959-2969, 2005.
- 50 • Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8963-8968, 2004.
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nat Mol Cell Biol* 6:21-31, 2005.
- 55 • Gruenbaum Y, Wilson KL, Harel A, Goldberg M, Cohen M. Review: nuclear lamins - structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 129:313-323, 2000.
- Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J. The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem Sci* 21:140-145, 1996.
- 60 • Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114:4557-4565, 2001.
- 65

- Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, Durrington PN. Sequencing of reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet* 79:383-389, 2006.
- 5 • Hildebrand T, Ruegsegger P. A new method for the model independent assessment of thickness in three dimensional images. *J Microsc* 185:67-75, 1997.
- Hoffmann GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichsenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K. Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics* 91:915-921,1993.
- 10 • Huang S, Chen L, Libina N, Janes J, Martin GM, Campisi J, Oshima J. Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference. *Hum Genet.* 2005 Oct 6;:1-7
- 15 • Hutchinson CJ, Worman HJ. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol* 6:1062-1067, 2004.
- Ji JY, Lee RT, Vergnes L, Fong LG, Stewart CL, Reue K, Young SG, Zhang Q, Shanahan CM, Lammerding J. Cell nuclei spin in the absence of Lamin B1. *J Biol Chem online*, 8/05/2007.
- 20 • Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Murata T, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. The effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci* 1001:344-349, 2006.
- Leung KF, Baron R, Seabra MC. Geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res* 47:467-475, 2006.
- 25 • Lévy N, Cau P. Anomalies du noyau et maladies. *Pour la Science* 313 :2-7, 2003.
- Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* 27:230-236, 1995.
- 30 • Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268:16321-16326, 1993.
- Maraldi NM, Squarzone S, Sabatelli P, Capanni C, Mattioli E, Ognibene A, Lattanzi G. Laminopathies: involvement of structural nuclear proteins in the pathogenesis of an increasing number of human diseases. *J Cell Physiol* 203:319-327, 2005.
- 35 • Mattout A, Dechat T, Adam SA, Goldman RD, Gruenbaum Y. Nuclear lamins, diseases and aging. *Cur Op Cell Biol* 18:335-341, 2006.
- 40 • Navarro CL, Cadinanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courier S, Boccaccio I, Boyer A, Kleijer WJ, Wagner A, Giuliano F, Beemer FA, Freije JM, Cau P, Hennekam RC, Lopez-Otin C, Badens C, Levy N. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet* 14:1503-1513, 2005.
- 45 • Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Genevieve D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P, Levy N. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* 13:2493-2503, 2004.
- 50 • Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptacek LJ, Fu YH. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature Genet* 38:1114-1123, 2006.
- Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodriguez F, Tryggvason K, Lopez-Otin C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 31:94-99, 2002.
- 55 • Reid TS, Terry KL, Casey PJ, Beese LS. Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J Mol Biol* 343:417-433, 2004.
- 60 • Robber RA, Weber K, Osborn M. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105:365-378, 1989.
- Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Scienceexpress*, 27 avril 2006.
- 65 • Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11:440-445, 2005.

ES 2 702 062 T3

- Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature Med* 11: 440-445, 2005.
- 5 • Shelton KR, Egle PM, Cochran DL. Nuclear envelope proteins: identification of lamin B subtypes. *Biochem Biophys Res Comm* 103: 975-981, 1981.
- Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* 15: 358-366, 2003.
- 10 • Stewart C, Burke B. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 51: 383-392, 1987.
- Takeda M, Noshiro R, Onozato ML, Tojob A, Hasannejada H, Huang XL, Narikawa S, Endou H. Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharm* 483 :133- 138, 2004.
- 15 • Toth JI, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12873-12878, 2005.
- 20 • Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, Zheng Y. A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* 311: 1887-1893, 2006.
- Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, Lopez-Otin C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437:564-568, 2005.
- 25 • Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10428-10433, 2004.
- 30 • Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 405-412, 2005.
- Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, Lawrence JB. Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1 and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32: 474-478, 1996.
- 35 • Young SG, Meta M, Yang SH, Fong LG. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem* 281: 39741-39745, 2006.
- 40 • Zastrow MS, Vlcek S, Wilson KL. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci* 117: 979-987, 2004.
- Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 65: 241-269, 1996.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un inhibidor de hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y un inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa, o de una de sus sales fisiológicamente aceptable, para su uso en el tratamiento de afecciones patológicas que implican signos de envejecimiento, ya sea natural, prematuro o acelerado seleccionadas entre el deterioro del endotelio vascular, el envejecimiento de la piel y la lisis ósea, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina y/o de prelamina A farnesilada.
2. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de farnesil-pirofosfato sintasa es una molécula de la familia de los aminobisfosfonatos (NBP) o una de sus sales fisiológicamente aceptables.
3. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el aminobisfosfonato puede seleccionarse entre
- ácido alendrónico o su forma iónica, alendronato;
 - ácido ibandrónico o su forma iónica, ibandronato;
 - ácido neridrónico o su forma iónica, neridronato;
 - ácido olupadrónico o su forma iónica, olupadronato;
 - ácido pamidrónico o su forma iónica, pamidronato;
 - ácido risedrónico o su forma iónica, risedronato;
 - ácido zoledrónico (o zolendrónico) o su forma iónica, zoledronato (o zolendrato);
 - ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico o su forma iónica, dimetilaminometanodifosfonato;
 - alfa-amino-(4-hidroxibencilideno) difosfonato; preferiblemente ácido zoledrónico o su forma iónica, zoledronato.
4. Composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el inhibidor de HMG-CoA reductasa es una molécula de la familia de las estatinas o una de sus sales fisiológicamente aceptable.
5. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el inhibidor de HMG-CoA reductasa es una estatina hidrosoluble.
6. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la estatina puede seleccionarse entre atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina, fluindostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, pitavastatina o lovastatina, o una de sus sales fisiológicamente aceptable.
7. Utilización no terapéutica de la composición tal y como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el tratamiento de afecciones no patológicas que implican signos de envejecimiento natural, seleccionadas entre el deterioro del endotelio vascular y el envejecimiento de la piel, relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina y/o de prelamina A farnesilada.
8. Utilización de acuerdo con la reivindicación 7 en la que las afecciones no patológicas relacionadas con la acumulación y/o persistencia en las células de progerina y/o de prelamina A farnesilada se seleccionan entre el grupo que comprende el envejecimiento celular a nivel de la piel y/o del endotelio vascular.

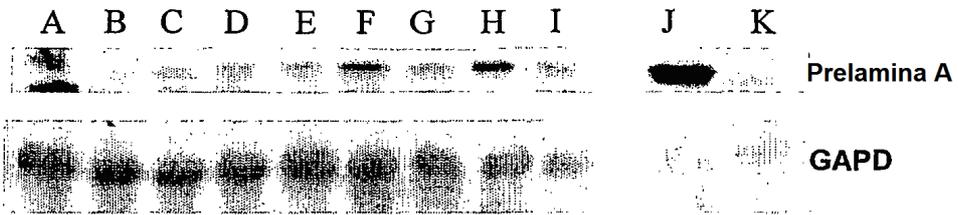


Figura 1

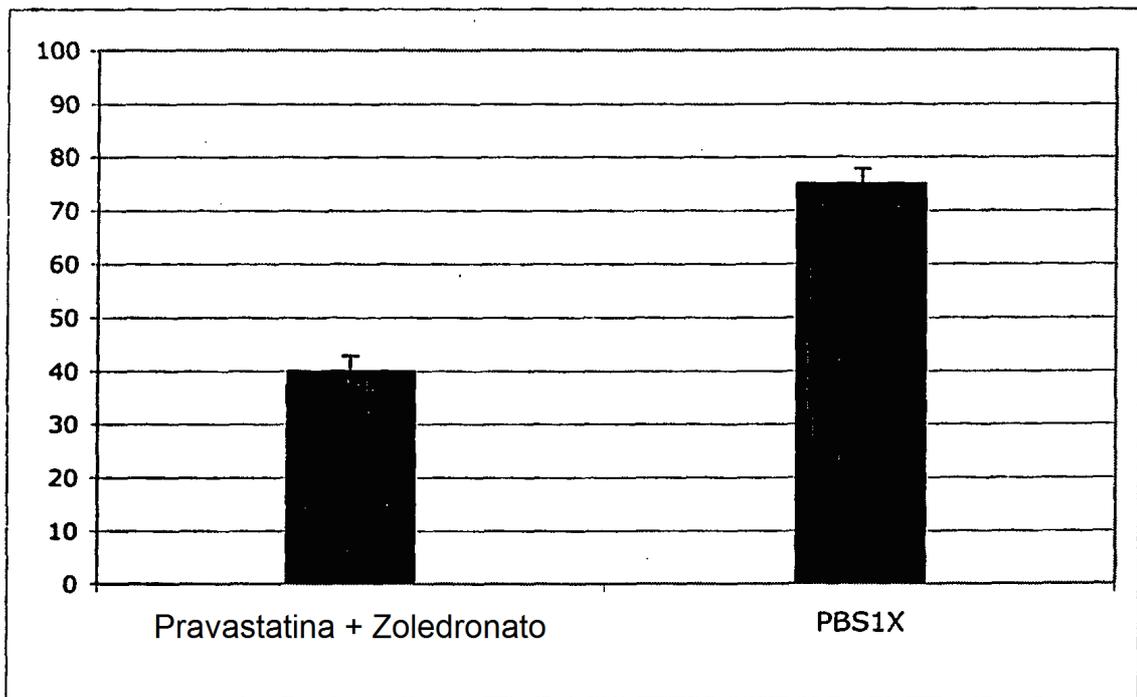


Figura 2

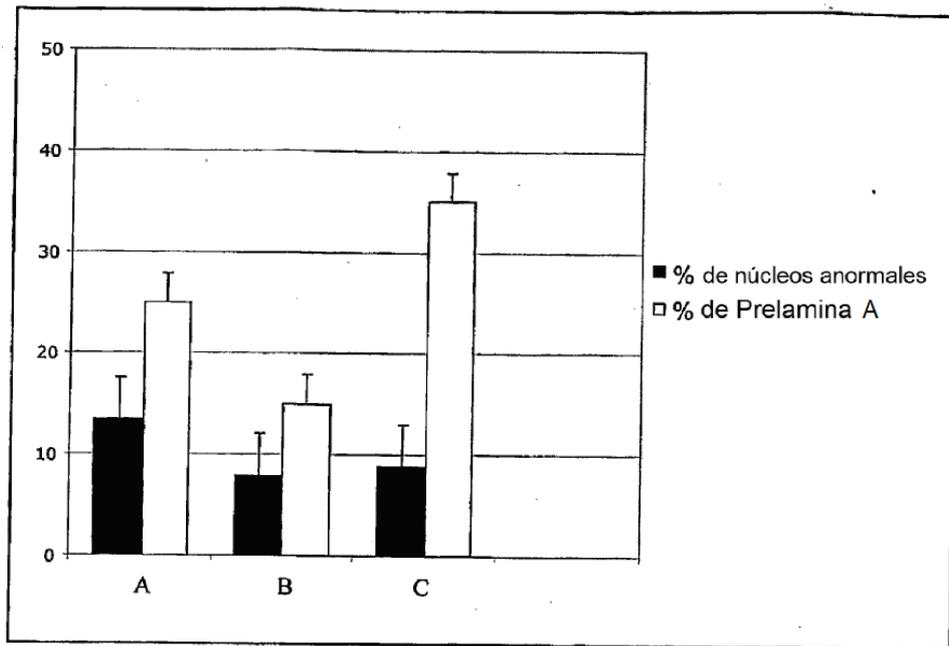


Figura 3

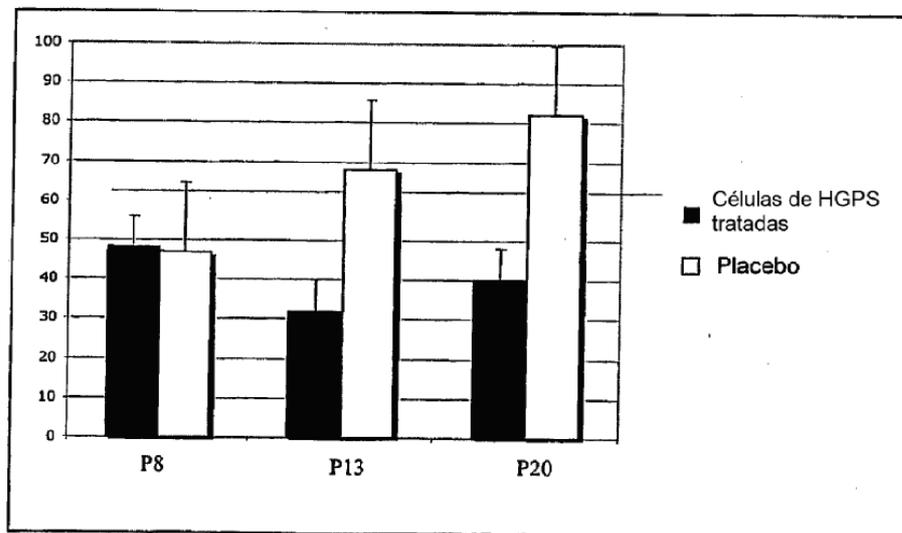
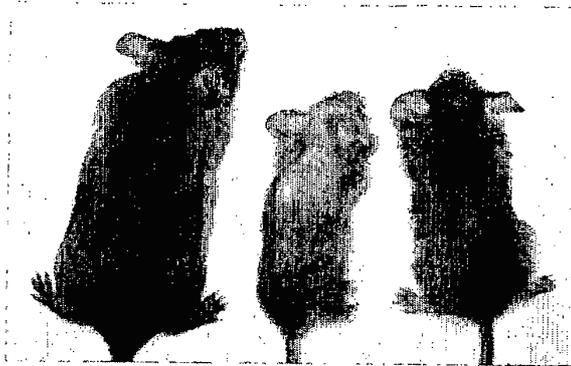


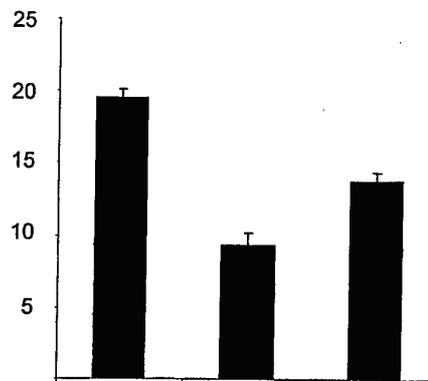
Figura 4

a



<i>Zmpste24</i>	+/+	-/-	-/-
Zolendronato	-	-	+
Pravastatina	-	-	+

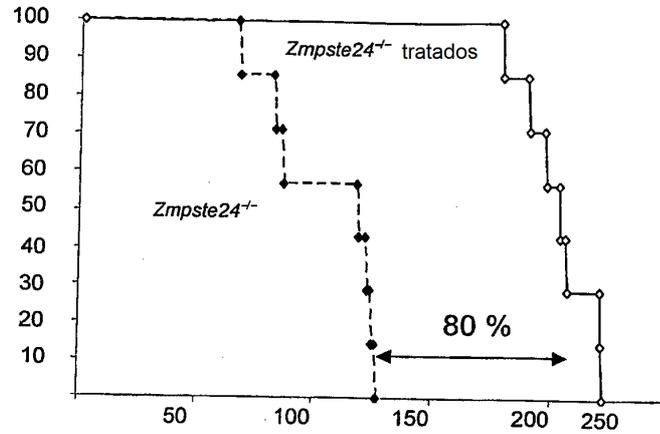
b



<i>Zmpste24</i>	+/+	-/-	-/-
Zolendronato	-	-	+
Pravastatina	-	-	+

Figura 5

C



d

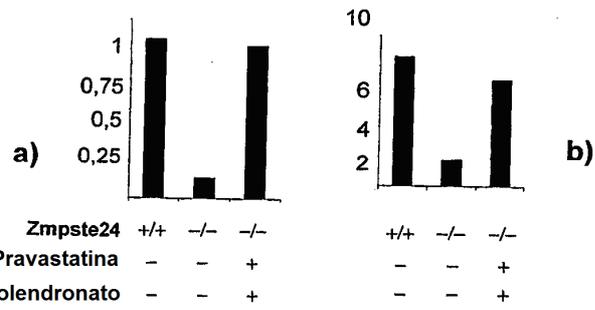
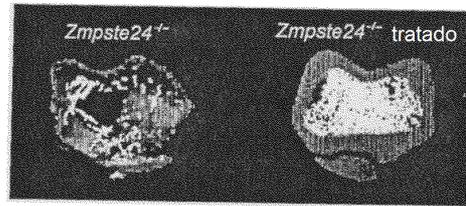


Figura 5

e

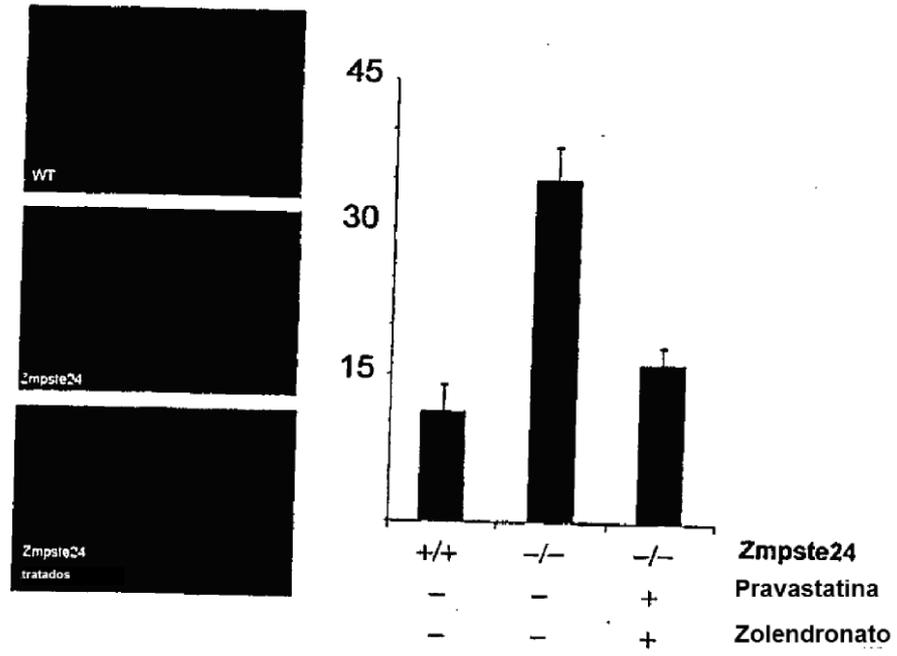


Figura 5