

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 932**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/145** (2006.01)

**A61K 47/54** (2007.01)

**C07C 323/41** (2006.01)

**C07H 15/203** (2006.01)

**A61K 31/164** (2006.01)

**A61K 31/355** (2006.01)

**A61K 31/375** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**C07C 323/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2018** **PCT/US2018/052080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19060634**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2018** **E 18858763 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025** **EP 3684418**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de trastornos sensibles a la cisteamina**

30 Prioridad:

**20.09.2017 US 201762561101 P**

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

**05.06.2025**

73 Titular/es:

**THIOGENESIS THERAPEUTICS, INC. (100.00%)**  
**4795 Keswick Court**  
**San Diego, CA 92130, US**

72 Inventor/es:

**STANTON, VINCENT, P., JR.;**  
**RIOUX, PATRICE, P.;**  
**BARSKI, PIOTR y**  
**WITT, DARIUSZ**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

Observaciones:

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

ES 3 024 932 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos para el tratamiento de trastornos sensibles a la cisteamina

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención presenta composiciones para uso en el tratamiento de síntomas, síndromes y enfermedades sensibles a la cisteamina.

## 10 ANTECEDENTES

La cisteamina es un aminotiol natural, generado in vivo a través del catabolismo de la pantoteína. Los estudios preclínicos y clínicos en etapa temprana sugieren que la cisteamina puede ser terapéuticamente activa en una variedad de enfermedades, pero el desarrollo clínico amplio se ha visto obstaculizado por la falta de un régimen de dosificación conveniente y una toxicología deficiente.

La cisteamina tiene varios mecanismos de acción, la mayoría de ellos relacionados con la capacidad reductora de su resto de tiol. La cisteamina se estudió clínicamente por primera vez en la década de 1950 como radioprotector para pacientes con cáncer sometidos a radioterapia, y como tratamiento para el envenenamiento por radiación. El grupo tiol de la cisteamina puede reducir los radicales libres y otros compuestos oxidados que pueden ser perjudiciales para las células, contribuyendo así a la homeostasis redox. La cisteamina también puede neutralizar indirectamente oxidantes dañinos al aumentar los niveles de otros tioles antioxidantes tales como la glutatona y la cisteína. Por ejemplo, la cisteamina puede participar en el intercambio tiol-disulfuro con cistina, la forma oxidada dimérica de cisteína, para formar un disulfuro de cisteamina-cisteína y una cisteína libre. La cisteamina también puede formar disulfuros con restos de cisteína de las proteínas, afectando así la estructura y función de las proteínas. La cisteamina puede inhibir enzimas que incluyen transglutaminasas, caspasas, metaloproteinasas de la matriz, y glutaminil ciclasa. La cisteamina es un agente quelante, con particular afinidad por el cobre. La cisteamina también bloquea la secreción de ciertas hormonas peptídicas, incluida la somatostatina.

Las enfermedades para las que existe evidencia preclínica o clínica de un beneficio terapéutico de la cisteamina incluyen enfermedades neurodegenerativas, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson; enfermedades inflamatorias y fibróticas del riñón, hígado y pulmón; enfermedades metabólicas, que incluyen diabetes, síndrome metabólico y el espectro de enfermedades del hígado graso; enfermedades infecciosas, que incluyen infecciones virales, bacterianas y parasitarias; hipercolesterolemia; enfermedad isquémica, que incluye enfermedad cardíaca isquémica o accidente cerebrovascular; anemia de células falciformes; trastornos mitocondriales hereditarios; enfermedades hereditarias causadas por mutación de arginina a cisteína; y cáncer. Además, AMORUSO D C ET AL: "THERAPEUTIC EFFECTS OF CYSTAMINE IN A MURINE MODEL OF LIVER FIBROSIS", DIGESTIVE AND LIVER DISEASE, W.B. SAUNDERS, GB, vol. 40, 1 marzo 2008, página S46D2, describen la cistamina (el dímero de disulfuro de la cisteamina) para tratar diversas patologías.

Desafortunadamente, la cisteamina tiene propiedades sensoriales muy desagradables (mal olor y sabor amargo), y puede producir olor corporal y halitosis cuando se ingiere en cantidades terapéuticamente efectivas (más de un gramo por día en adolescentes y adultos). La mayoría de los pacientes también experimentan efectos secundarios gastrointestinales, que incluyen anorexia, náuseas, vómitos y/o dolor de estómago. La halitosis, el olor corporal y los efectos secundarios gastrointestinales se han asociado con altos niveles máximos de cisteamina en sangre (con frecuencia más de 50 veces superiores a los niveles de cisteamina endógena en sujetos sanos). Además, la vida media de eliminación de la cisteamina es de sólo alrededor de 25 minutos, lo que requiere una dosificación frecuente. En resumen, existen problemas con las propiedades organolépticas (sabor amargo, mal olor), farmacología (niveles sanguíneos subterapéuticos durante gran parte del intervalo entre dosis), toxicología (efectos secundarios gastrointestinales y otros) y estabilidad (vida útil corta debido a la oxidación) de las formulaciones orales existentes de cisteamina. Muchos de estos problemas son intrínsecos al fármaco, un compuesto de tiol volátil. Como consecuencia, muchos pacientes con cistinosis no cumplen plenamente con el tratamiento con cisteamina, y como resultado, sufren una progresión de la enfermedad.

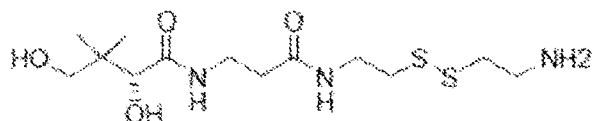
El desarrollo clínico se ha visto obstaculizado por la incapacidad de las formulaciones de cisteamina de proporcionar niveles terapéuticos del fármaco durante períodos de tiempo sostenidos con una toxicología aceptable. En consecuencia, existe una necesidad de regímenes de tratamiento mejorados, incluidos compuestos productores de cisteamina mejorados, formulaciones mejoradas y regímenes de dosificación mejorados, que puedan producir niveles sanguíneos elevados y sostenidos de cisteamina mientras se reducen las concentraciones máximas y se aumentan las concentraciones mínimas para proporcionar una eficacia mejorada y se minimizan los efectos secundarios. Además, en vista de la variación conocida entre pacientes en la farmacocinética de la cisteamina, se necesitan composiciones que permitan la individualización de los regímenes de dosificación para mejorar la eficacia y reducir la toxicidad.

## SUMARIO

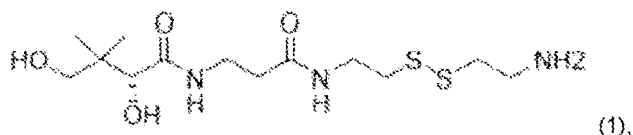
El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones; cualquier otra descripción en la presente descripción, por ejemplo relacionada con profármacos, análogos o derivados que no sean los compuestos abarcados por las presentes reivindicaciones, se proporciona únicamente con fines de referencia.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

En un primer aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende el compuesto 1



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un trastorno sensible a la cisteamina en un sujeto como se define en la reivindicación 1. El tratamiento incluye administrar al sujeto una dosis de 50 a 150 miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) (por ejemplo,  $60 \pm 10$ ,  $70 \pm 10$ ,  $80 \pm 10$ ,  $90 \pm 10$ ,  $100 \pm 25$ ,  $110 \pm 20$ ,  $120 \pm 10$ ,  $130 \pm 10$  o  $140 \pm 10$  mg/kg) del compuesto 1:

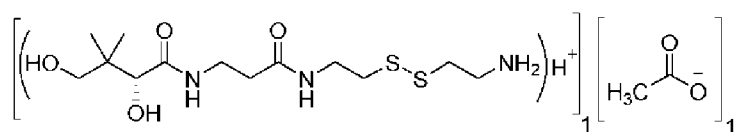


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una o más veces al día (por ejemplo, una, dos o tres veces al día). En realizaciones particulares, dentro de las 2 horas (por ejemplo, dentro de los 30 minutos, 1 hora, 90 minutos, o 2 horas) de la administración de la dosis, no se administra ningún agente reductor al sujeto. En realizaciones particulares, entre 2 horas y 8 horas después de la administración de la dosis se administra al sujeto un agente reductor. En realizaciones particulares, el agente reductor se administra  $3 \pm 1$  horas,  $4 \pm 1$  horas,  $5 \pm 1$  horas,  $6 \pm 1$  horas,  $7 \pm 1$  horas o  $4 \pm 2$  horas después de la administración de la dosis del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, el agente reductor se selecciona de glutatona, éster dietílico de glutatona, gamma glutamylcisteína, ácido dihidrolipoico, N-acetilcisteína, homocisteína, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, vitamina E, y ácido ascórbico. En realizaciones particulares, el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se formula para liberación inmediata. En realizaciones particulares, el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se formula como un polvo, y la forma de dosificación es una bolsita. En realizaciones particulares, se administra al sujeto un agente inductor de panteteinasa seleccionado del grupo que incluye agonistas de PPAR alfa, agonistas de PPAR gamma, o agentes inductores de Nrf2. En una realización, el agente inductor de panteteinasa es un isotiocianato presente en vegetales crucíferos, un sulforafano, S-alil cisteína, trisulfuro de dialilo, grasa oxidada, ácidos grasos omega-3, u oleiletanolamida. En realizaciones particulares, dentro de los 30 minutos (por ejemplo, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos o 30 minutos) de administrar el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra al sujeto de 10 a 50 mg/kg (por ejemplo,  $15 \pm 5$ ,  $20 \pm 5$ ,  $25 \pm 5$ ,  $30 \pm 5$ ,  $35 \pm 5$ ,  $40 \pm 5$  o  $45 \pm 5$  mg/kg) de cistamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización, la cistamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se formula para liberación inmediata. En realizaciones particulares, la cistamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se administra simultáneamente con la administración del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

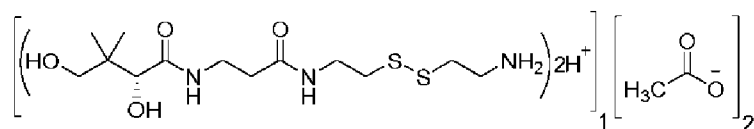
En cualquiera de los métodos anteriores, el trastorno sensible a la cisteamina se puede seleccionar de cistinosis; enfermedad neurodegenerativa; enfermedad del neurodesarrollo; enfermedad neuropsiquiátrica; enfermedad mitocondrial; enfermedades fibróticas del riñón, del hígado o del pulmón; infección parasitaria; anemia de células falciformes; cáncer; enfermedad isquémica, que incluye cardiopatía isquémica o accidente cerebrovascular; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); fibrosis quística (FQ); infección bacteriana; infección viral; esteatohepatitis no alcohólica (NASH); esteatohepatitis alcohólica; y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), o cualquier otro trastorno sensible a la cisteamina descrito aquí.

En otro aspecto, la invención presenta una sal de adición de ácido del compuesto 1, en la que el ácido es ácido clorhídrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, o ácido tartárico. En realizaciones particulares, el ácido es ácido acético o ácido tartárico. En realizaciones particulares, el ácido es ácido acético.

En una realización, la sal de adición de ácido tiene la fórmula:

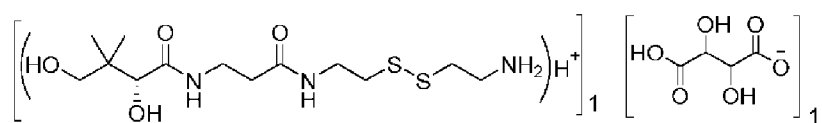


En algunas realizaciones, la sal de adición de ácido tiene la fórmula:

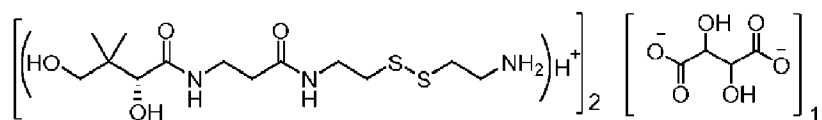


En realizaciones particulares, no reivindicadas, el ácido es ácido tartárico.

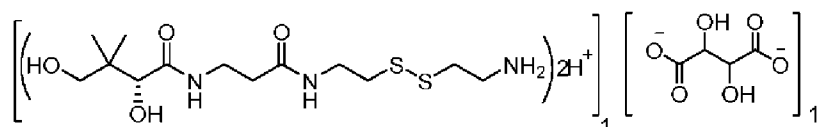
En una realización, la sal de adición de ácidos tiene la fórmula:



En una realización, la sal de adición de ácido tiene la fórmula:



En una realización, la sal de adición de ácido tiene la fórmula:



En otro aspecto, no reivindicado, la descripción presenta un método para tratar un trastorno sensible a la cisteamina en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de las sales de adición de ácidos anteriores.

En realizaciones particulares, dentro de las 2 horas (por ejemplo, dentro de los 30 minutos, 1 hora, 90 minutos, o 2 horas) de la administración de la dosis, no se administra ningún agente reductor al sujeto. En realizaciones particulares, entre 2 horas y 8 horas después de la administración de la dosis se administra al sujeto un agente reductor. En realizaciones particulares, el agente reductor se administra  $3 \pm 1$  horas,  $4 \pm 1$  horas,  $5 \pm 1$  horas,  $6 \pm 1$  horas,  $7 \pm 1$  horas o  $4 \pm 2$  horas después de la administración de la dosis del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, el agente reductor se selecciona de glutatona, éster dietílico de glutatona, gamma glutamylcisteína, ácido dihidrolipoico, N-acetylcisteína, homocisteína, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, vitamina E, y ácido ascórbico.

En realizaciones particulares, cualquiera de las sales de adición de ácidos anteriores se formula para liberación inmediata. En realizaciones particulares, cualquiera de las sales de adición de ácidos anteriores se formula como un polvo, y la forma de dosificación es una bolsita, o se formula en una botella para resuspensión en una disolución acuosa adecuada para beber. En realizaciones particulares, se administra al sujeto un agente inductor de panteteinasa seleccionado del grupo que incluye agonistas de PPAR alfa, agonistas de PPAR gamma, o agentes inductores de Nrf2. En una realización, el agente inductor de panteteinasa es un isotiocianato presente en vegetales crucíferos, un sulforafano, S-alil cisteína, trisulfuro de dialilo, grasa oxidada, ácidos grasos omega-3, u oleiletanolamida. En realizaciones particulares, dentro de los 30 minutos (por ejemplo, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos o 30 minutos) de administrar cualquiera de las sales de adición de ácidos anteriores, se administra al sujeto de 10 a 50 mg/kg (por ejemplo,  $15 \pm 5$ ,  $20 \pm 5$ ,  $25 \pm 5$ ,  $30 \pm 5$ ,  $35 \pm 5$ ,  $40 \pm 5$  o  $45 \pm 5$  mg/kg) de cistamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. En una realización, la cistamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se formula para liberación inmediata. En realizaciones particulares, la cistamina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se administra simultáneamente con la administración de cualquiera de las sales de adición de ácidos anteriores.



En aún otro aspecto, no reivindicado, la descripción presenta un método para sintetizar un disulfuro asimétrico, comprendiendo dicho método combinar: (a) 1 equivalente molar de un ácido carboxílico orgánico, o una sal del mismo; (b) de 2 a 4 equivalentes molares (por ejemplo, 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 equivalentes molares) de cistamina, o una sal de la misma; y (c) un reactivo de acoplamiento de amida, para formar una mezcla que comprende más de 90% (por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%) del ácido carboxílico orgánico, o una sal del mismo, se convierte en el disulfuro asimétrico de fórmula (A), y menos de 10% (por ejemplo, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0,5%) del ácido carboxílico orgánico permanece sin reaccionar o se convierte en el disulfuro simétrico de fórmula (B):



en las que R es un radical orgánico. En realizaciones particulares, el grupo RC(O)- es un resto de menos de 1.000 Daltons, 700 Daltons, 400 Daltons, o 200 Daltons. En algunas realizaciones, RC(O)- es un aminoácido natural o sintético, o un éster o amida del mismo.

En algunas realizaciones, el ácido carboxílico orgánico, o una sal del mismo, se selecciona de ácido pantoténico, ácido 4-fosfopantoténico, ácido acético, o sales de los mismos. En realizaciones particulares, el ácido carboxílico orgánico, o una sal del mismo, es ácido pantoténico o una sal del mismo. En algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento de amida es hidroxibenzotriazol. En algunas realizaciones, el reactivo de acoplamiento de amida es N,N'-diciclohexilcarbodiimida. En algunas realizaciones, la combinación se realiza en uno o más disolventes seleccionados de diclorometano, tetrahidrofurano, acetonitrilo, dimetilformamida, agua, y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, no reivindicado, la descripción presenta un método para sintetizar un disulfuro asimétrico, comprendiendo dicho método combinar en un disolvente orgánico:

(a) de 2 a 4 equivalentes molares (por ejemplo, de 2 a 2,3, de 2,2 a 3, de 2,7 a 3,3, o de 3,1 a 4 equivalentes molares) de un tiol seleccionado de cisteamina, N-acetilcisteamina, cisteína, N-acetilcisteína, amida de N-acetilcisteína, o sales de las mismas; y

(b) 1 equivalente molar de un disulfuro seleccionado de cistamina, pantetina, o sales de las mismas.

En algunas realizaciones, la relación molar del tiol al disulfuro es alrededor de 2:1 a alrededor de 4:1 (por ejemplo, alrededor de 2:1 a alrededor de 2,5:1, alrededor de 2,5:1 a alrededor de 3,5:1, alrededor de 2,7:1 a alrededor de 3,3:1, alrededor de 2,5:1 a alrededor de 3:1, alrededor de 3:1 a alrededor de 3,5, o alrededor de 3:1 a alrededor de 3,5, a alrededor de 4:1, alrededor de 3,5:1 a alrededor de 4:1). En realizaciones particulares, la relación molar del tiol al disulfuro es alrededor de 2,5:1 a alrededor de 3,5:1 (por ejemplo, alrededor de 2,5:1 a alrededor de 2,7:1, alrededor de 2,7:1 a alrededor de 3,3:1, o alrededor de 3,3:1 a alrededor de 3,5:1). En otras realizaciones, la relación molar del tiol al disulfuro es alrededor de 2,7:1 a alrededor de 3,3:1 (por ejemplo, alrededor de 2,7:1 a alrededor de 3,1:1 o alrededor de 3,1 a alrededor de 3,3).

En algunas realizaciones, el tiol es N-acetilcisteamina, o una sal de la misma.

En algunas realizaciones, el disulfuro es cistamina, o una sal de la misma.

En algunas realizaciones, el disolvente orgánico es metanol o etanol. En realizaciones particulares, el disolvente orgánico es metanol.

## DEFINICIONES

Por "liberación inmediata" se entiende un modo de liberación del agente activo (por ejemplo, un precursor de cisteamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) formulado en una forma de dosificación unitaria que tiene un perfil de liberación de disolución en un medio gástrico simulado en el que al menos 55%, 65%, 75%, 85% o 95% del agente se libera dentro de las primeras dos horas de la prueba utilizando un instrumento compatible con la USP.

Por "liberación controlada" se entiende un modo liberación del agente activo (por ejemplo, un precursor de cisteamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) de su formulación de una manera que permite el control del sitio anatómico de liberación o de la velocidad de liberación, o de ambos. En general, el propósito de una formulación de liberación controlada es prolongar el período de tiempo durante el cual los niveles terapéuticos del fármaco están presentes en el cuerpo (por ejemplo, con respecto a una formulación de liberación inmediata), y/u optimizar la administración del fármaco a los sitios de absorción de cisteamina, reduciendo así la cantidad de

dosis que se deben administrar en un período de 24 horas. Las formulaciones gastrorretentivas, de liberación retardada, de liberación sostenida, y dirigidas al colon, son ejemplos de formulaciones de liberación controlada. Una formulación de liberación controlada también puede permitir una reducción en la concentración máxima del fármaco ( $C_{max}$ ) con respecto a la observada para una formulación de liberación inmediata administrada al mismo nivel de dosis (es decir, una  $C_{max}$  reducida de cisteamina en el caso de un precursor de cisteamina de la invención). Una formulación de liberación controlada de un agente activo se puede lograr, por ejemplo, incorporando el agente activo en una sustancia matriz que el cuerpo tarda en disolver o erosionar, de modo que el ingrediente activo lixivie lenta y regularmente del recubrimiento, ya sea por difusión fuera de la matriz o por erosión de la superficie de la matriz, o ambas, o por formación de un gel con una superficie semipenetrable, en el que el fármaco sale lentamente de la capa semipermeable.

Por "liberación retardada" se entiende una preparación farmacéutica, por ejemplo una formulación administrada por vía oral, que pasa a través del entorno ácido del estómago sustancialmente intacta y se disuelve en el entorno más básico del intestino delgado de manera que el agente activo (por ejemplo, un precursor de cisteamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) formulado en una forma de dosificación unitaria tiene un perfil de liberación de disolución en un medio gástrico simulado en el que menos de 25%, 20%, 15%, 10% o 5% del agente se libera dentro de la primera hora de prueba, y además un perfil de liberación de disolución en un fluido intestinal simulado a pH 6,0 o 6,3 o 6,5 en el que al menos 55%, 65%, 75%, 85% o 95% del agente se libera dentro de las primeras dos horas de prueba. En algunas realizaciones, la liberación retardada del agente activo (por ejemplo, un precursor de cisteamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) resulta del uso de un recubrimiento entérico sensible al pH de una forma de dosificación oral). Un recubrimiento entérico se puede combinar, por ejemplo, con una formulación de liberación rápida o lenta (sostenida), o una combinación de ambas, para extender el período de tiempo durante el cual se libera el fármaco.

La expresión "liberación sostenida" (también denominada "liberación prolongada" en la bibliografía) se refiere a una formulación de fármaco que proporciona una liberación gradual de un fármaco durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo 6-12 horas o más, en comparación con una formulación de liberación inmediata del mismo fármaco, de modo que el agente activo (por ejemplo, un precursor de cisteamina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) formulado en una forma de dosificación unitaria tiene un perfil de liberación de disolución en un fluido gástrico o intestinal simulado en el que al menos 10-45% (es decir, 15-45%, 20-45%, 25-45%, 30-45%, 35-45%, 40-45%) del agente se libera dentro de las primeras tres horas de la prueba y no menos de 65%, 75%, 85%, 90%, 93%, 95%, o 97% del agente se libera dentro de las 8 horas, cuando está en un líquido simulado del intestino delgado. Preferiblemente, aunque no necesariamente, la liberación sostenida da como resultado niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período de tiempo prolongado que se encuentran dentro del intervalo terapéutico para la enfermedad que se está tratando. Preferiblemente, una formulación de liberación sostenida de un precursor de cisteamina produce niveles plasmáticos de cisteamina que se encuentran dentro de un intervalo de concentración que está entre, por ejemplo, 5-50  $\mu\text{M}$ , 5-40  $\mu\text{M}$ , 5-35  $\mu\text{M}$ , 5-30  $\mu\text{M}$ , 5-25  $\mu\text{M}$ , 5-20  $\mu\text{M}$ , o 10-50  $\mu\text{M}$ , 10-45  $\mu\text{M}$ , 10-40  $\mu\text{M}$ , 10-35  $\mu\text{M}$ , 10-30  $\mu\text{M}$ , 10-25  $\mu\text{M}$ , o 10-20  $\mu\text{M}$ .

La expresión "dirigida al colon" se refiere a una formulación o composición que permite la liberación del fármaco en el colon (que tiene una densidad de la flora entérica mucho mayor que el intestino delgado), y opcionalmente también en el íleon distal (que tiende a ser la región más alcalina del tracto gastrointestinal). Un método para dirigir la liberación del fármaco al íleon distal y al colon es utilizar un recubrimiento sensible al pH que se disuelve alrededor de un pH 7 (por ejemplo, pH 6,8, pH 6,9, pH 7,0), un pH típico en el íleon. Es muy probable que una formulación diseñada para la liberación de fármacos dependiente del pH en el íleon también libere el fármaco en el colon (especialmente si el fármaco está incorporado en una matriz de liberación sostenida), y/o parte del precursor de cisteamina liberado en el íleon puede pasar al colon todavía en forma de precursor (es decir, aún no convertido en cisteamina). Otro tipo de formulación dirigida al colon se basa en enzimas producidas por bacterias entéricas para degradar los polímeros que encierran el fármaco y que no pueden ser degradados por enzimas salivales, gástricas o pancreáticas, lo que efectúa la administración del fármaco en el colon. La densidad de la flora intestinal también es alta en el íleon distal, por lo que la flora entérica puede comenzar a digerir el polímero, y por lo tanto, liberar el fármaco en el íleon distal. Las formulaciones dirigidas al íleon y al colon se denominan aquí colectivamente formulaciones dirigidas al colon.

La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, tales como una píldora, comprimido, comprimido oblongo, cápsula dura o cápsula blanda, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un precursor de cisteamina, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por "cápsula dura" se entiende una cápsula que incluye una membrana que forma un recipiente de dos partes, con forma de cápsula, capaz de transportar una carga sólida o líquida de fármaco y excipientes. Por "cápsula blanda" se entiende una cápsula moldeada en un único recipiente que transporta una carga líquida, semisólida o sólida de fármaco y excipientes. Los gránulos, polvos y líquidos también pueden suministrarse en "forma de dosificación unitaria" utilizando un envase adecuado. Por ejemplo, los gránulos o polvos se pueden administrar en una bolsita, y los líquidos en una ampolla, un vial, o un recipiente de plástico.

El término "micropartículas", como se utiliza aquí, se refiere a microperlas, microesferas, micropellets, nanopartículas, nanoperlas, nanoesferas u otras partículas finas utilizadas en formulaciones de fármacos en las

que cada micropartícula tiene entre 0,05-999 micrómetros de diámetro promedio. Se pueden utilizar decenas, cientos o miles de dichas micropartículas en una única forma de dosificación unitaria, por ejemplo se pueden envasar dentro de una cápsula o formular como polvo o suspender en un líquido.

La expresión "cantidad efectiva" de un agente, como se utiliza aquí, es aquella cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados en un paciente, tal como la remisión de una enfermedad, y, como tal, una "cantidad efectiva" depende del contexto en el que se aplica, incluyendo la edad y el peso del paciente, la naturaleza de la enfermedad, incluyendo los órganos afectados por la enfermedad, el estado de la enfermedad o el nivel de actividad, la sensibilidad del paciente a la cisteamina y otros factores.

Como se utiliza aquí, "panteteína", "4-fosfopanteteína", "desfosfo-coenzima A" y "coenzima A", así como cualquier análogo o derivado convertible a uno de esos compuestos en el tracto gastrointestinal, se refieren al enantiómero D (también denominado ocasionalmente enantiómero R utilizando una nomenclatura más reciente). Cada uno de estos compuestos contiene un carbono quiral en el resto de pantotenoilo, que puede existir en forma D (dextro) o L (levo), también denominadas formas (R) o (S), respectivamente. Sólo el enantiómero D-panteteína es un sustrato para la panteteinasa, y por lo tanto es el único enantiómero de panteteína que es un precursor de la cisteamina. De manera similar, sólo los enantiómeros D de compuestos que son convertibles en panteteína, tales como 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A, son útiles en las composiciones y métodos de la descripción.

Como se utiliza aquí, los "compuestos de disulfuro" son compuestos que contienen un átomo de azufre unido químicamente a un segundo átomo de azufre en la forma: R1-S-S-R2, en la que R1 y R2 son compuestos orgánicos. R1 y R2 pueden ser idénticos o diferentes. Los compuestos de disulfuro generalmente se forman por oxidación de dos tioles (es decir, R1-S-H más R2-S-H produce R1-S-S-R2 más 2H<sup>+</sup>), y pueden convertirse reversiblemente de nuevo en dos tioles por reducción (es decir, R1-S-S-R2 más 2H<sup>+</sup> produce R1-S-H + R2-S-H). Los compuestos de disulfuro también se pueden formar al hacer reaccionar uno o dos tioles con un ditiol (por ejemplo, R1-S-H más R2-S-H más H-S-R3-S-H produce R1-S-S-R3-S-S-R2 más 4H<sup>+</sup>, en el que R1, R2 y R3 son compuestos orgánicos y H<sup>+</sup> es un ion hidrógeno). Los compuestos de disulfuro de la presente descripción son compuestos que contienen azufre biológicamente activos que abarcan: 1) compuestos de disulfuro mixtos de cisteamina de la fórmula: C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>NS-S-R1, en la que R1 es un resto orgánico, 2) compuestos de disulfuro de panteteína de la fórmula: C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S-S-R1, en la que R1 es un resto orgánico, 3) compuestos de disulfuro de 4-fosfopanteteína de la fórmula: C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>PS-S-R1, en la que R1 es un resto orgánico, 4) compuestos de disulfuro de desfosfo-coenzima A de la fórmula: C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>P<sub>2</sub>S-S-R1, en la que R1 es un resto orgánico, 5) compuestos de disulfuro de coenzima A de la fórmula: C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S-S-R1, en la que R1 es un resto orgánico, o 6) compuestos de N-acetilcisteamina de la fórmula: C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NOS-S-R1, en la que R1 es un resto orgánico. Se pueden formar disulfuros adicionales utilizando ditiolos, compuestos que pueden formar dos enlaces de disulfuro. Al menos uno, y opcionalmente ambos, enlaces de disulfuro son con cisteamina o compuestos que son degradables a cisteamina en el tracto gastrointestinal. Alternativamente, un ditiol está unido mediante enlace de disulfuro a sólo uno de dichos compuestos, permaneciendo el segundo tiol del ditiol en forma de tiol, o el segundo tiol puede estar unido mediante enlace de disulfuro a cualquier tiol, incluyendo, por ejemplo, cualquier tiol enumerado en la Figura 17. Los compuestos que son degradables a cisteamina en el tracto gastrointestinal incluyen, además de la panteteína, la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A, la coenzima A o la N-acetilcisteamina, o cualquier análogo o derivado convertible a uno de esos cinco compuestos en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, mediante procesos químicos o enzimáticos). Cualquier análogo o derivado de este tipo, aquí denominado "análogo o derivado adecuado", es un tiol de la descripción, y puede sustituir a uno de esos cinco compuestos. Un "disulfuro mixto" es un disulfuro formado a partir de dos tioles diferentes. Por "disulfuro mixto de cisteamina" se entiende un disulfuro que conecta la cisteamina con otro tiol (que no es cisteamina); por "disulfuro mixto de panteteína" se entiende un disulfuro que conecta la panteteína con otro tiol (que no es panteteína); y así sucesivamente. En general, los disulfuros mixtos se clasifican según el más simple de los dos tioles constituyentes (por ejemplo, la cisteamina-panteteína se denomina disulfuro mixto de cisteamina). Los tioles útiles para formar precursores de cisteamina disulfuro incluyen, por ejemplo, L-cisteína, N-acetilcisteína, glutatona, cualquier tiol enumerado en la Figura 17 y otros tioles como se describe aquí. En las Figuras 2 a 10 se ilustran varios disulfuros mixtos ejemplares. Las tablas de las Figuras 18 - 21 muestran cómo los tioles de la Figura 17 pueden combinarse de forma útil para formar disulfuros. Para mayor brevedad y claridad, para nombrar el disulfuro, aquí se utilizan los nombres de los dos tioles que están conectados a través de un enlace de disulfuro, en lugar del nombre químico formal (por ejemplo, utilizando la nomenclatura IUPAC). Por lo tanto, cisteamina-panteteína se refiere a un disulfuro formado a partir de esos dos compuestos. Hay tres excepciones importantes a esa regla: el disulfuro formado al hacer reaccionar dos panteteínas se denomina comúnmente pantetina, el disulfuro formado al hacer reaccionar dos cisteínas se denomina comúnmente cistina, y el disulfuro formado al hacer reaccionar dos cisteaminas se denomina comúnmente cistamina.

Como se utilizan aquí, los términos "disulfuros formados al reaccionar..." o "compuesto formado al reaccionar..." se refieren específicamente al disulfuro formado entre los dos tioles nombrados. Por ejemplo, el disulfuro formado al reaccionar cisteamina con panteteína, denominado cisteamina-panteteína, significa el heterodímero formado entre una molécula de cisteamina y una molécula de panteteína. Esta definición no refleja lo que realmente puede ocurrir cuando se hacen reaccionar los dos tioles nombrados. Es decir, cuando la cisteamina se hace reaccionar con panteteína en condiciones oxidantes se pueden formar tres disulfuros en proporciones variables, dependiendo de

las condiciones químicas: cisteamina-cisteamina (es decir, cistamina), cisteamina-panteteína (también panteteína-cisteamina, que es idéntica para los fines de la descripción) y panteteína-panteteína (es decir, pantetina). Cuando se hace referencia a los productos de reacción reales (es decir, una mezcla de tres disulfuros), el texto lo indica claramente.

Por "precursor de cisteamina" se entiende un compuesto que puede convertirse en condiciones fisiológicas en al menos una cisteamina. Los medios de conversión incluyen reducción en el caso de disulfuros que contienen cisteamina (es decir, disulfuros mixtos de cisteamina), hidrólisis enzimática en el caso de sustratos de panteteinasa (panteteína así como compuestos que son metabólicamente convertibles en panteteína en el tracto gastrointestinal, tales como 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A, y análogos o derivados adecuados de los mismos, o tanto reducción como escisión enzimática. Los ejemplos de precursores incluyen disulfuros mixtos de cisteamina, disulfuros de panteteína, disulfuros de 4-fosfopanteteína, disulfuros de desfosfo-coenzima A, disulfuros de coenzima A, y disulfuros de N-acetilcisteamina, así como panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, y N-acetilcisteamina. La relación química entre cisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A (los cuatro últimos compuestos son precursores de la cisteamina) se ilustra a continuación. Un homodímero de dos moléculas de panteteína (es decir, pantetina), o de dos moléculas de 4-fosfopanteteína, o de dos moléculas de desfosfo-coenzima A, o de dos moléculas de coenzima A, o de dos moléculas de N-acetilcisteamina también son cada uno compuestos precursores de cisteamina disulfuro, ya que los tioles constituyentes son todos precursores de cisteamina.

Por "análogos o derivados adecuados", en referencia a los precursores de cisteamina panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina, o disulfuros que contienen cualquiera de ellos, se entiende compuestos que son convertibles en panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina en el tracto gastrointestinal, ya sea por procesos químicos o enzimáticos.

Por "compuestos convertibles en panteteína" se entiende compuestos tales como 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A que pueden degradarse en el tracto gastrointestinal a panteteína, y análogos o derivados de dichos compuestos que pueden convertirse en el compuesto original en el tracto gastrointestinal.

Por "tioles constituyentes", utilizado en referencia a un disulfuro, se entiende los compuestos de tiol (y opcionalmente ditiol) que reaccionan para formar el disulfuro.

Por "contenido de cisteamina" se entiende la fracción, en peso, de un precursor de cisteamina convertible en cisteamina *in vivo* tras degradación química y/o enzimática.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza aquí, representa aquellas sales que, dentro del alcance del criterio médico sólido, son adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables se describen en: Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977, y en Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl y C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de los compuestos de la descripción, o por separado haciendo reaccionar el grupo de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, bitartrato, borato, butirato, canforato, canfosulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato, y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalino-térreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluidos amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares.

Por "gastroretentivo", "gástrico-retentivo" y similares se entiende composiciones farmacéuticas capaces de permanecer en el estómago de un mamífero, preferiblemente un ser humano, durante períodos prolongados de tiempo, preferiblemente tan largos como el del alimento, más preferiblemente más largos que el del alimento. "Retención gástrica" es por lo tanto el mantenimiento de una composición farmacológica en el estómago durante un período de tiempo más largo que el tiempo que habría sido retenida en el estómago si se hubiera administrado en forma libre, por ejemplo dentro de un vehículo de administración oral que no se considera gastroretentivo. Las formulaciones gastroretentivas pueden caracterizarse por una retención en el estómago durante un período más largo que el tiempo normal de vaciado del estómago, es decir, más largo que alrededor de 2 horas, particularmente más largo que alrededor de 3 horas, y usualmente más largo que alrededor de 4, 6, 8 o 10 horas. Las formulaciones gastroretentivas generalmente permanecen en el estómago durante alrededor de 3, 4, 6, 8, 10, o a veces 18 horas o más después de su ingestión con una comida. Sin embargo, se observa que de acuerdo con la descripción, la

retención del sistema de administración de fármaco gastrorretentivo de liberación controlada no se observa después de más de 48 horas después de la administración al estómago sin ayuno, y preferiblemente no después de 24 horas. Las formulaciones gastrorretentivas incluyen formulaciones flotantes o boyantes, formulaciones hinchables o expandibles, formulaciones bioadhesivas o mucoadhesivas, formulaciones desplegadas y formulaciones magnéticas, o cualquier combinación de las mismas. Las combinaciones de dos o más tipos de formulaciones gastrorretentivas son comunes, ya que ha resultado difícil mantener la residencia en el estómago con sólo un mecanismo gastrorretentivo. Las formulaciones gastrorretentivas se administran preferiblemente con una comida.

Por "flotante", "flotación" y "boyante", utilizados indistintamente, se entiende un tipo de formulación con la capacidad de posicionar la composición de la invención sobre o en la proximidad de la superficie del contenido gástrico, que es quimo en el estado de alimentación (fluido gástrico en el estado de ayuno o el estado de vaciamiento post-gástrico). Al flotar sobre el contenido gástrico, la formulación tiene menos posibilidades de ser impulsada a través del píloro hacia el duodeno durante las contracciones de los músculos del estómago, ya que el píloro se encuentra en la parte inferior del estómago cuando la persona está sentada o de pie. Las formulaciones flotantes pueden consistir en partículas pequeñas (por ejemplo, escala micrométrica), medianas (por ejemplo, escala milimétrica) o grandes (por ejemplo, escala centimétrica). Las composiciones grandes pueden funcionar simultáneamente a través de un mecanismo hinchable/expandible, como se explica aquí. Cualquier formulación de cualquier tamaño puede actuar simultáneamente a través de un mecanismo mucoadhesivo.

Por "hinchamiento" y "expandible", utilizados indistintamente, se entiende la capacidad de una composición de aumentar sus dimensiones al entrar en contacto con un medio que contiene líquido, tal como jugo gástrico o quimo. Preferentemente, el "hinchamiento" se caracteriza por el aumento de las dimensiones del comprimido inicial hasta un tamaño tal que no se eliminaría fácilmente del estómago. El aclaramiento del estómago implica el paso a través del píloro. El diámetro promedio en reposo del píloro en seres humanos varía en estado de ayuno y de alimentación. En estado de alimentación, es alrededor de 1 centímetro o menos, en estado de ayuno es alrededor de 1,28 centímetros, más o menos 7 milímetros. Preferiblemente, el "hinchamiento" implica aumentar las dimensiones de la composición a más de 14 mm, más de 16 mm, más de 18 mm, más de 20 mm o más de 22 mm en al menos dos dimensiones, pero alternativamente en una dimensión, siendo la segunda y la tercera dimensión ambas mayores que 12 mm, 14 mm o 16 mm.

Por "mucoadhesión" se entiende la capacidad de una composición de adherirse a la capa de mucosa que recubre el tracto gastrointestinal. En el caso de una formulación gastrorretentiva, la "mucoadhesión" se refiere a la adhesión a la capa mucosa que recubre el estómago. La mucoadhesión es una de varias tecnologías para prolongar el tiempo de residencia gástrica; sin embargo, la capa mucosa del estómago se renueva continuamente, aunque lentamente, lo que limita la duración de la mucoadhesión. Por lo tanto, la mucoadhesión generalmente se combina con otros métodos gastrorretentivos para lograr un tiempo de residencia gástrica prolongado. Por "bioadhesión" se entiende la capacidad de una composición de adherirse a otras moléculas que recubren el tracto gastrointestinal, incluidas las moléculas de la superficie de los enterocitos.

Por "desplegarse" o "cambiar de forma", utilizados indistintamente, se entiende la capacidad de una composición de desplegarse, desenroscarse, desenrollarse, descomprimirse o abrirse de otro modo en el estómago para transformarse en una composición de un tamaño y/o geometría que no pasa fácilmente a través del píloro, y por lo tanto, se retiene en el estómago durante un período prolongado. Las formulaciones "desplegables" o que cambian de forma se pueden formular dentro de una cápsula. Idealmente, pero no necesariamente, las dimensiones de la formulación desplegada en el estado desplegado o sin enrollar son mayores que 16 mm, 18 mm, 20 mm o 22 mm en al menos dos dimensiones, pero alternativamente sólo en una dimensión, siendo la segunda y tercera dimensiones mayores que 12 mm, 14 mm o 16 mm.

Por "formulación magnética" se entiende una composición que contiene un imán o un material magnetizado diseminado capaz de interactuar con un campo magnético aplicado externamente creado por un imán o imanes ubicados fuera del cuerpo a fin de efectuar la retención de la composición en el estómago o el intestino delgado durante un período prolongado. Una composición dirigida al estómago se retiene preferiblemente al menos tanto tiempo como el alimento se retiene en el estómago, más preferiblemente más tiempo que el que se retiene el alimento. Una composición dirigida al intestino delgado se conserva preferiblemente hasta la disolución sustancialmente completa del fármaco, o hasta la pérdida de la fuerza magnética adecuada para mantener la composición en su lugar, lo que ocurra primero. El imán o material magnético utilizado debe ser seguro para la ingestión humana. También se pueden utilizar imanes externos para colocar una composición farmacéutica que contenga imanes en otras regiones del tracto gastrointestinal, tal como el colon; sin embargo, en la mayoría de los casos, una formulación magnética es un tipo de formulación gastrorretentiva o dirigida al intestino delgado.

Como se utiliza aquí, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad que debe administrarse a un paciente (un mamífero humano o no humano) para mejorar una enfermedad o modular un biomarcador que sirve como sustituto de la actividad de la enfermedad. Los criterios de valoración clínicos de distintas enfermedades, incluidas las neurodegenerativas, metabólicas, fibróticas, isquémicas, infecciosas, neoplásicas y hereditarias, varían ampliamente, pero generalmente son bien conocidos en la técnica. Los biomarcadores

específicos pueden incluir, por ejemplo, (i) los niveles de cistina en los glóbulos blancos (WBC), que sirven como sustituto del control de la enfermedad en pacientes con cistinosis; (ii) se pueden utilizar índices del estado cognitivo, motor o emocional para medir la respuesta al tratamiento en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, incluidos instrumentos como la puntuación de Impresiones Globales del Médico (CGI), la puntuación global de la Evaluación a base de Entrevista del Médico de Cambio Más Aportación del Cuidador (CIBIC-Plus), la puntuación del Estudio Cooperativo de la Enfermedad de Alzheimer - Impresión Global del Médico de Cambio (ADCS-CCGIC), la puntuación de la Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer - Subescala Cognitiva (ADAS-Cog), la puntuación del Estudio Cooperativo de la Enfermedad de Alzheimer - Inventario de Actividades de la Vida Diaria modificado para demencia grave (ADCS-ADLsev), el Mini-Examen del Estado Mental (MMSE), la puntuación del Inventario Neuropsiquiátrico (NPI), la Escala de Puntuación de Enfermedad de Huntington Unificada (UDHRS), la prueba MATTIS, la Prueba de Trazos de Hopkins, la fluidez categórica, la puntuación de la Escala de Puntuación de Enfermedad de Parkinson Unificada (UPDRS), o la puntuación total de la Escala de Sueño de la Enfermedad de Parkinson (PDSS-2); (iii) las medidas bioquímicas de la actividad de las enfermedades neurodegenerativas incluyen biomarcadores de EA (por ejemplo, proteínas beta-amiloide plasmáticas) o niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); (iv) los índices de enfermedades hepáticas metabólicas y fibróticas incluyen pruebas anatómicas tales como medidas basadas en biopsia hepática de fibrosis hepática, incluyendo el índice de actividad (NAFLD) (NAS) y el índice de fibrosis hepática; (v) índices bioquímicos de la salud del hígado, incluyendo la sensibilidad a la insulina del hígado y del tejido adiposo medida por los índices HOMA-IR y adipo-IR, respectivamente, los niveles séricos de aminotransferasas y gamma-glutamyl transpeptidasas (GGT), los fragmentos derivados de CK-18 en sangre para NAFLD, NASH, ASH o enfermedades hepáticas hereditarias; (vi) los índices del estado de la enfermedad para las enfermedades mitocondriales incluyen como criterio de valoración clínico la puntuación de la Escala de la Enfermedad Mitocondrial Pediátrica de Newcastle (NPMDS), así como (vii) biomarcadores que incluyen niveles de glutatión, tioles séricos totales, acetoacetato, beta-hidroxibutirato, lactato o malondialdehído (un marcador de estrés oxidativo). Otros marcadores de la enfermedad sustitutos incluyen la modulación de una respuesta inmune, la modulación de la expresión de genes o proteínas o la modulación de una medida de enfermedad radiológica validada (por ejemplo, evaluada mediante rayos X, tomografía computarizada, resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones). Los métodos para determinar cantidades terapéuticamente efectivas de precursores de cisteamina son altamente específicos de cada enfermedad, y son bien conocidos por los médicos que se especializan en cada una de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Como se utiliza aquí, un "excipiente farmacéuticamente aceptable" es una sustancia natural o sintética incluida (junto con el ingrediente activo) en la formulación de una composición que es adecuada para uso en seres humanos y/o mamíferos no humanos sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica). Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, auxiliares de compresión, disgregantes, colorantes, emolientes, emulsionantes, cargas (diluyentes), formadores de película o recubrimientos, sabores, fragancias, deslizantes (mejoradores del flujo), lubricantes, conservantes (incluidos antioxidantes), tintas de impresión, sorbentes, agentes de suspensión o dispersión, disolventes, estabilizadores coloides, edulcorantes, y agua. La FDA de EE. UU. mantiene una base de datos de "ingredientes inactivos" que contiene información sobre miles de sustancias comúnmente utilizadas en la formulación de fármacos. En la base de datos se pueden buscar excipientes comúnmente utilizados en formulaciones de liberación controlada, retardada, sostenida o prolongada. Los excipientes incluyen: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, carbómero, croscarmelosa, polivinilpirrolidona reticulada, ácido cítrico, crospovidona, derivados de celulosa, incluyendo etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o hipromelosa, docusato de sodio, gelatina, gelucire 43/01, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metilcelulosa, metilparabeno, celulosa microcristalina, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona, povidona, almidón pregelatinizado, propilparabeno, goma laca, dióxido de silicio, carboximetilcelulosa sódica, glicolato de almidón sódico, sorbitol, almidón (de maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, aceites vegetales, cera, incluyendo cera blanca, amarilla o de abejas, y xilitol. Los excipientes también pueden incluir diluyentes (por ejemplo, disoluciones amortiguadoras acuosas y salinas), portadores acuosos y portadores no acuosos, por ejemplo agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los excipientes útiles para formular composiciones con propiedades particulares se describen más particularmente en la Descripción Detallada.

Por "recubrimiento entérico" se entiende un agente o compuesto añadido a las formulaciones descritas aquí que protege el o los ingredientes activos descritos aquí (por ejemplo, precursores de cisteamina y potenciadores de la degradación y absorción de precursores de cisteamina) a medida que pasan a través del estómago. Los recubrimientos entéricos también protegen al estómago de los ingredientes farmacéuticos irritantes (por ejemplo, la cisteamina). Algunos ejemplos de tecnologías comerciales de recubrimiento entérico incluyen: productos AcryEZE, Opadry, Nutraletic y Sureteric (Colorcon, West Point PA), Advantia Performance Specialty Coatings (International Specialty Products, Wayne NJ), línea de productos Kollicoat (BASF Corporation, Ludwigshafen Alemania), productos Aquacoat (FMC BioPolymer), Eastman CAP (Eastman Chemical Co. Kingsman TN), línea de productos Eudragit (Evonik Industries), y líneas de productos ACOAT, HP-50 y HP-55 (Shin Etsu Pharma). Ashland Specialty Ingredients, Encap Drug Delivery y Sanyo Chemical Industries, Ltd. también venden sistemas de recubrimiento entérico. Algunos ejemplos de polímeros formadores de película sensibles al pH que se utilizan habitualmente en formulaciones con recubrimiento entérico incluyen: (i) polímeros basados en celulosa, tales como

acetato-ftalato de celulosa (por ejemplo, Aquacoat CPD, FMC; CAP, Eastman Chemical Co.), acetato-succinato de celulosa, acetato-trimelitato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (por ejemplo, AquaSolve, Ashland Specialty Ingredients, Wilmington DE); (ii) polimetacrilatos, tales como poli(ácido metacrílico-acrilato de etilo) (por ejemplo, Eudragit L30D-55 y Eudragit L100-55, Evonik Industries; AcryLEZE, Colorcon; Kollicoat MAE 30 DP y Kollicoat MAE 100 P, BASF Pharma Ingredients and Services; Polyquid PA-30, Sanyo Chemical Industries) y poli(ácido metacrílico-metacrilato de metilo) en relaciones 1:1 y 1:2; (iii) derivados de polivinilo tales como ftalato de poli(acetato de vinilo) (por ejemplo, Sureteric, Colorcon); y (iv) otros copolímeros tales como semiésteres del copolímero de estireno y ácido maleico, semiésteres del copolímero de éter vinílico y ácido maleico, y copolímeros de acetato de vinilo y ácido crotonico. Los recubrimientos entéricos también se obtienen utilizando goma laca (por ejemplo, PROTECT, Sensient Pharmaceutical Coating Systems) o alginato de sodio y zeína (Encap Drug Delivery). La hidroxipropilmetilcelulosa también se conoce como hipromelosa o HPMC. Ejemplos de otros excipientes comúnmente utilizados en formulaciones con recubrimiento entérico incluyen: celulosa microcristalina húmeda, celulosa en polvo húmeda, goma gellán, y ácido esteárico. Los recubrimientos entéricos se pueden aplicar a una variedad de formulaciones, incluidos comprimidos, cápsulas y micropartículas.

Como se utiliza aquí, "terapia de combinación" significa que al paciente (o mamífero no humano) que necesita tratamiento de acuerdo con la presente descripción, se le administra un medicamento que no se describe completamente aquí, o en algunos casos no se contempla, además del que se describe aquí. La terapia de combinación puede ser secuencial (antes o después) o simultánea con las terapias con el precursor de cisteamina de la descripción.

Por "tratar" se entiende someter a un paciente a un régimen de manipulación con el fin de tratar una enfermedad o trastorno y obtener resultados beneficiosos o deseados, tales como la mejora de los signos o síntomas de la enfermedad o la mejora de los marcadores bioquímicos, radiológicos, conductuales o físicos de la actividad de la enfermedad o del estado de la enfermedad. Los ejemplos de resultados beneficiosos o deseados pueden incluir la resolución de la inflamación, la resolución de desequilibrios bioquímicos, la mejora de la calidad de vida, la mejora del estado cognitivo y conductual, la mejora de la función motora, la mejora del estado emocional y anímico, la mejora del sueño, o de manera más general, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o afecciones; la disminución del grado de una enfermedad; la estabilización de un estado de enfermedad; la prevención de la propagación de una enfermedad; el retraso o la ralentización del progreso de la enfermedad; la mejora o paliación de una enfermedad, trastorno o afección; y la remisión parcial o completa de una manifestación significativa de una enfermedad.

El término "mamíferos" se refiere tanto a los mamíferos humanos como a los no humanos.

Por "suministrar" se entiende proporcionar y/o administrar el o los ingredientes activos descritos aquí mediante administración oral de comprimidos, cápsulas, líquidos, polvos, gránulos, micropartículas, bolsitas, supositorios, etc. (denominados colectivamente "composiciones farmacéuticas" o simplemente "composiciones") que contienen el o los ingredientes activos y (opcionalmente) uno o más portadores y/o diluyentes y/o adyuvantes u otros excipientes. Las composiciones pueden proporcionarse con instrucciones de administración que incluyan una explicación de cualquier código de color o texto alfanumérico en la superficie o el envasado de las composiciones, así como instrucciones sobre si las composiciones deben ingerirse en determinados momentos del día o con alimentos (por ejemplo, tipos o cantidades específicos de alimentos), líquidos, una comida (incluidos detalles sobre el tipo de comida) u otros medicamentos, y si el paciente debe permanecer erguido o sentado durante un período de tiempo después de la administración del fármaco.

Varios acrónimos de enfermedades, nombres de genes y otros términos médicos se representan mediante abreviaturas. Los acrónimos de enfermedad incluyen MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica, y episodios similares a accidentes cerebrovasculares) y MERFF (epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares). Los nombres de genes incluyen POLG, que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa gamma, una ADN polimerasa mitocondrial; OCT1, OCT2 y OCT3, que codifican los transportadores de cationes orgánicos 1, 2 y 3 (también conocidos como SLC22A1, SLC22A2 y SLC22A3, respectivamente); PANK2, que codifica la pantotenato cinasa 2; VNN1, que codifica la vanina 1, también conocida como panteteinasa; VNN2, que codifica la vanina 2, también conocida como GPI-80 y también una panteteinasa.

Como se utiliza aquí, "enfermedad sensible a la cisteamina" significa una enfermedad para la que existen pruebas de que la cisteamina puede ser un tratamiento eficaz. Las pruebas pueden derivar de estudios clínicos o preclínicos de enfermedades en mamíferos (por ejemplo, seres humanos, perros, ratones, ratas, monos, conejos), o de estudios in vitro de los mecanismos de la enfermedad. Las enfermedades sensibles a la cisteamina constituyen un grupo amplio y heterogéneo de enfermedades con manifestaciones y patogenia muy variables. Las enfermedades y trastornos para los que existen pruebas de la eficacia de la cisteamina pueden clasificarse según la patogénesis, con la importante salvedad de que el mecanismo de eficacia de la cisteamina no siempre es claro y puede haber mecanismos de acción desconocidos. Las categorías importantes de enfermedades sensibles a la cisteamina incluyen (i) trastornos del transporte de cistina, entre los cuales la cistinosis es la más conocida; (ii) trastornos asociados con daño oxidativo, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y hepáticas; (iii) trastornos asociados

con actividad enzimática patológica, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, enfermedades mitocondriales hereditarias, enfermedades asociadas con MECP2 y POLG mutantes; (iv) trastornos fibróticos, incluyendo fibrosis del riñón, hígado o pulmón; (v) trastornos metabólicos, incluyendo síndrome metabólico X, diabetes y el espectro de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, que culmina en esteatohepatitis no alcohólica (NASH); (vi) enfermedades infecciosas, incluidas ciertas infecciones virales (por ejemplo, gripe), infecciones bacterianas (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*) e infecciones parasitarias (por ejemplo, malaria); (vii) enfermedades isquémicas, incluidas las lesiones por isquemia-reperfusion del corazón y otros órganos; (viii) enfermedades asociadas con un metabolismo anormal de la adiponectina; y (ix) cáncer, así como la mejora de los efectos nocivos de la terapia contra el cáncer.

Como se utiliza aquí, la expresión "alrededor de" significa  $\pm 20\%$  del valor citado.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 representa una estructura química de la coenzima A, de la cual se puede derivar una molécula de desfosfo-coenzima A, una molécula de 4-fosfopantoteína, una molécula de pantoteína, una molécula de ácido pantoténico o una molécula de cisteamina mediante reacciones catalizadas por enzimas (mostradas en la Figura 11).

La FIGURA 2 representa dos estructuras químicas de disulfuros de la descripción. La estructura química en la parte superior muestra una molécula de disulfuro de cisteamina mixto, con cisteamina a la izquierda y un segundo tiol (representado como RS-) a la derecha. La estructura química en la parte inferior muestra un disulfuro de pantoteína, con pantoteína a la izquierda y un segundo tiol (representado como RS-) a la derecha. Las Figuras 3, 4 y 5 muestran ejemplos de disulfuros de cisteamina mixtos. Se pueden formar otros disulfuros de cisteamina mixtos con los tioles enumerados en la Figura 17, como se muestra esquemáticamente en las Figuras 18 y 21.

La FIGURA 3 muestra cuatro estructuras químicas de disulfuros de cisteamina mixtos ejemplares. Específicamente, se muestran disulfuros de cisteamina mixtos con los tioles asociados alil mercaptano, L-cisteína, éster etílico de L-cisteína y N-acetilcisteína, como se indica en las etiquetas.

La FIGURA 4 muestra dos estructuras químicas de disulfuros de cisteamina mixtos ejemplares y una estructura química de un disulfuro de N-acetilcisteamina mixto ejemplar. Los dos disulfuros de cisteamina mixtos se forman entre cisteamina y N-acetilcisteína, y cisteamina y amida de N-acetilcisteína. También se muestra un disulfuro mixto formado entre N-acetilcisteína y amida de N-acetilcisteína (como se indica en las etiquetas).

La FIGURA 5 muestra dos estructuras químicas de disulfuros de cisteamina mixtos ejemplares formados entre cisteamina y pantoteína y entre cisteamina y glutatona, como se indica en las etiquetas.

La FIGURA 6 representa la estructura química de un disulfuro de cisteamina mixto ejemplar formado entre cisteamina y coenzima A.

La FIGURA 7 muestra dos estructuras químicas. En la parte superior se encuentra un disulfuro de pantoteína mixto ejemplar formado entre pantoteína y cisteína. En la parte inferior se encuentra un disulfuro de N-acetilcisteína mixto ejemplar formado con pantoteína.

La FIGURA 8 representa las estructuras químicas de dos disulfuros mixtos ejemplares, uno formado entre pantoteína y N-acetilcisteína, el otro formado entre el ácido ditiol dihidrolipoico y dos cisteaminas (un disulfuro enlazado a cada uno de los dos tioles del ácido dihidrolipoico), como se indica en las etiquetas.

La FIGURA 9 representa una estructura química de un disulfuro de pantoteína mixto ejemplar formado entre pantoteína y glutatona.

La FIGURA 10 representa una estructura química de un disulfuro de 4-fosfopantoteína mixto ejemplar formado entre 4-fosfopantoteína y coenzima A.

La FIGURA 11 es una representación esquemática de parte de las rutas metabólicas de la coenzima A, pantoteína y cisteamina, que incluye tanto el metabolismo intracelular (líneas continuas) como las reacciones catabólicas que ocurren en el tracto gastrointestinal (líneas punteadas). Algunas reacciones ocurren en ambas ubicaciones (por ejemplo, las fosfatasa están presentes en el citoplasma y en la luz gastrointestinal). Los compuestos se nombran en letra normal, las enzimas en letra cursiva. Tanto los compuestos como las enzimas tienen una variedad de nombres alternativos a los que se muestran en la Figura. Esta Figura no es una representación completa del metabolismo de la coenzima A, la pantoteína y la cisteamina, sino que pretende simplemente transmitir que la coenzima A, la desfosfo-coenzima A, la 4-fosfopantoteína y la pantoteína pueden catabolizarse en cisteamina (y pantotenato) en el intestino.



La FIGURA 12 muestra la anatomía del tracto gastrointestinal (GI) en forma esquemática (arriba). A continuación se muestra una tabla que resume, para cada segmento del tracto gastrointestinal, ciertos parámetros anatómicos y fisiológicos relevantes para la generación y captación in vivo de cisteamina de los precursores de cisteamina de la descripción. En particular, la tabla indica los sitios anatómicos en los que ocurre la formación y captación de cisteamina y los niveles de variables fisiológicas que afectan las tasas de generación in vivo de cisteamina a partir de precursores de cisteamina (por ejemplo, a través de la reducción del enlace de disulfuro y la escisión por panteteinasa), y la tasa de absorción de cisteamina a lo largo del tracto gastrointestinal (por ejemplo, por los transportadores de cationes orgánicos 1, 2 y 3). Por ejemplo, el pH influye en las reacciones de intercambio de disulfuro. El nivel de glutatona (GSH) es un indicador del entorno redox, que influye en el equilibrio entre las formas oxidadas y reducidas de disulfuros y tioles, incluida la reducción de los precursores de cisteamina disulfuro. La superficie de absorción y el tiempo de tránsito, junto con los niveles de enzimas que digieren panteteína y transportadores de cisteamina, influyen en las tasas de producción de cisteamina a partir de panteteína y la posterior absorción de cisteamina. Otras variables fisiológicas en la figura influyen en el rendimiento de ciertos tipos de formulaciones. Por ejemplo, algunos tipos de formulaciones gastrorretentivas se hinchan hasta un tamaño que impide el paso a través del píloro; algunos recubrimientos farmacéuticos sensibles al pH se disuelven a alrededor de pH 5,5, pH 6 o pH 6,5 en el duodeno, mientras que otros recubrimientos se disuelven a alrededor de pH 7, que es más típico del íleon; algunos tipos de formulaciones dirigidas al colon están compuestas, en parte, de polímeros que son refractarios a la digestión por enzimas humanas (o mamíferas) pero que pueden ser degradados por enzimas producidas por bacterias entéricas, lo que provoca la liberación de precursores de cisteamina coformulados con dichos polímeros. Los valores o intervalos proporcionados en la tabla provienen de fuentes bibliográficas, pero pueden no abarcar el intervalo completo de variación humana normal. Sin embargo, el grado de variación indicado puede explicar, en parte, la extensa variación interindividual en la captación y el metabolismo de la cisteamina observada clínicamente.

La FIGURA 13 es una tabla que muestra una clasificación de los precursores de cisteamina y algunas de sus propiedades farmacológicas más destacadas. Los precursores de cisteamina se clasifican en el lado izquierdo (inferior) de la tabla según (i) sean tioles o disulfuros, (ii) si son disulfuros, si son disulfuros mixtos que contienen cisteamina (incluyendo cisteamina-panteteína), disulfuros que contienen panteteína (excepto cisteamina-panteteína), o si contienen otros tioles degradables a panteteína en el tracto gastrointestinal, y (iii) cuántas cisteaminas se generan por reducción química y/o degradación enzimática (bajo el símbolo #). Por "otro tiol o ditiol" se entiende cualquier ditiol, así como cualquier tiol que no sea cisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina. (Véase la Figura 17 para tioles y ditiolos ejemplares). El número de cisteaminas generadas a partir de la degradación de precursores de cisteamina disulfuro que contienen "otros tioles" es uno; sin embargo, los precursores de cisteamina disulfuro que contienen ditiolos pueden producir una o dos cisteaminas tras la degradación debido a que un ditiol puede unirse, por ejemplo, a dos cisteaminas (véase la Tabla 21 para ver un resumen de cómo se pueden combinar los tioles y los ditiolos). La tabla muestra además, en "Etapas para generar cisteamina", qué etapas químicas y/o enzimáticas se requieren para generar cisteamina a partir de cada clase de precursores de cisteamina. Por ejemplo, un disulfuro de cisteamina mixto que contiene cisteamina más otro tiol (por ejemplo, cisteína) requiere sólo una etapa: la reducción del enlace de disulfuro. De manera similar, la tiol panteteína requiere sólo una etapa: la escisión por panteteinasa. Otros precursores de cisteamina requieren dos etapas. Por ejemplo, el homodímero de pantetina, pantetina, requiere una reducción del enlace de disulfuro, seguida de una escisión por panteteinasa. Otros precursores de cisteamina requieren tres o más etapas. Por ejemplo, un homodímero de 4-fosfopanteteína requiere reducción del enlace de disulfuro, escisión por fosfatasa y escisión por panteteinasa. La desfosfo-coenzima A y la coenzima A que contiene disulfuros requieren etapas adicionales. En algunos precursores de cisteamina disulfuro, el número de etapas degradativas hacia la cisteamina difiere entre los dos tioles producidos por reducción del enlace de disulfuro, como se muestra en la tabla. La tabla muestra además clases de compuestos que pueden coformularse o coadministrarse con precursores de cisteamina para mejorar la generación in vivo de cisteamina, y muestra qué clase o clases de potenciadores son útiles para cada clase de precursores de cisteamina. Por ejemplo, cualquier precursor de cisteamina disulfuro se puede coformular o coadministrar productivamente con un agente reductor (abreviado como RA en la tabla) para promover la reducción del enlace de disulfuro. Un precursor de cisteamina que es, o que incluye, una panteteína, o cualquier tiol que pueda degradarse a panteteína, puede coformularse o coadministrarse productivamente con un inductor de la enzima panteteinasa (abreviado PI en la tabla). Un disulfuro de panteteína se puede coformular o coadministrar productivamente con un agente reductor y un inductor de panteteinasa. No se muestran en la tabla los potenciadores de la absorción de cisteamina (por ejemplo, los inductores de los transportadores de cisteamina, tales como los transportadores de cationes orgánicos) ni los inhibidores del catabolismo de la cisteamina, debido a que dichos compuestos pueden coformularse o coadministrarse de forma productiva con todas las clases de precursores de cisteamina. En el extremo derecho (arriba), la tabla resume en pocas palabras las propiedades farmacológicas más destacadas de las diferentes clases de precursores de cisteamina, que pueden verse influidas por el número de etapas degradativas necesarias para generar cisteamina, el rendimiento de cisteaminas, o la presencia de potenciadores de la generación de cisteamina in vivo. Las breves descripciones proporcionadas no son completas, y no deben interpretarse como limitativas.

La FIGURA 14 es una ilustración de composiciones farmacéuticas ejemplares. Se muestran las propiedades destacadas de las composiciones ejemplares, incluyendo: (i) el tipo de forma de dosificación (por ejemplo,

comprimido, cápsula, polvo, líquido), (ii) las propiedades de la formulación con respecto a la localización anatómica de la liberación del fármaco (por ejemplo, las formulaciones gastrorretentivas se retienen en el estómago; las formulaciones con recubrimiento entérico pueden estar diseñadas para liberar el fármaco en el intestino delgado; las formulaciones dirigidas al colon están diseñadas para liberar el fármaco en el íleon o el colon), así como (iii) la duración de la liberación del fármaco (liberación inmediata: IR, o liberación sostenida: SR), (iv) el tipo de precursor o precursores de cisteamina, (v) la dosis (proporcionada como un intervalo), (vi) el tipo de potenciador o potenciadores coformulados de la generación de cisteamina in vivo, si los hay, (vii) la dosis del compuesto potenciador (proporcionada como un intervalo), (viii) recomendaciones para administrar la composición con alimentos (por ejemplo, puré de manzana o yogur) o una comida (por ejemplo, cena), o si la comida es opcional ("comida OK"), (ix) el sitio o sitios de liberación del precursor de cisteamina en el tracto gastrointestinal, y (vii) los sitios en los que se genera cisteamina in vivo (por ejemplo, por reducción de enlace de disulfuro o escisión por panteteinasa). Las composiciones de la Figura 13 están limitadas cada una a un solo tipo de formulación con respecto al sitio y al momento de liberación del fármaco. Estas composiciones (incluidas muchas variantes no mostradas en la figura) se pueden administrar en diversas combinaciones, lo que proporciona flexibilidad para individualizar la dosificación. En las Figuras 14 y 15 se muestran otras composiciones ejemplares con componentes más activos y/o formulaciones más complejas.

La FIGURA 15 es una ilustración de composiciones farmacéuticas ejemplares con (i) uno o dos perfiles de liberación de fármacos - por ejemplo, la composición G incluye componentes de liberación inmediata y sostenida; (ii) al menos dos tipos de precursor o precursores de cisteamina y hasta dos potenciadores. Se proporcionan recomendaciones para la administración con o sin alimentos, así como los sitios de liberación del fármaco y de conversión in vivo de los precursores de cisteamina en cisteamina. Las composiciones ejemplares, y muchas otras no mostradas, se pueden combinar en diversas relaciones.

La FIGURA 16 es una ilustración de regímenes multidosis ejemplares, en los que se administran dos o más composiciones juntas o en secuencia durante un corto intervalo de tiempo. Las propiedades destacadas de las composiciones ejemplares se muestran en las Figuras 14 y 15. Se incluyen ejemplos de composiciones que proporcionan potenciadores de la degradación del precursor de cisteamina (por ejemplo, agentes reductores) pero no precursores de cisteamina. La formulación separada de potenciadores permite coadministrarlos con composiciones que contienen precursores de cisteamina en diversas relaciones para optimizar la generación o captación de cisteamina in vivo. La formulación separada de potenciadores permite además controlar el sitio y el momento de la liberación del potenciador para optimizar la generación o captación de cisteamina in vivo.

La FIGURA 17 es una lista de tioles y ditioles ejemplares que son precursores de cisteamina de tipo tiol (compuestos 2-6) o que pueden combinarse para formar precursores de cisteamina de tipo disulfuro. Para cada tiol o ditiole se muestra la fórmula química, el número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS) y el peso molecular de la fórmula. En algunos casos, el número CAS es específico de un enantiómero particular. Cada tiol está numerado (en la columna del extremo izquierdo de la Figura 17) para facilitar una referencia concisa a estos tioles en las Figuras 18 - 21.

La FIGURA 18 contiene dos tablas que muestran cómo los tioles y ditioles de la Figura 17 pueden combinarse para formar dos clases de precursores de cisteamina disulfuro: disulfuros mixtos de cisteamina y disulfuros de panteteína. Las cinco columnas de cada una de las dos tablas enumeran, desde la izquierda:

(i) Los dos tioles reaccionaron para formar un disulfuro, a los que se hace referencia mediante los números en la columna del extremo izquierdo de la Figura 17 (los tioles están numerados del 1-29 y los ditioles del 30-35). Así, por ejemplo, la notación: "1 + 28" representa el disulfuro formado al reaccionar el tiol 1 (cisteamina) con el tiol 28 (tiopronina). Todos los disulfuros en la tabla de la izquierda comprenden cisteamina (compuesto 1) más un segundo tiol (cualquiera de los compuestos 2 a 35). Todos los disulfuros en la tabla de la derecha comprenden panteteína (compuesto 2) más un segundo tiol (cualquiera de los compuestos 2 a 35).

(ii) El peso molecular (MW) de la fórmula del disulfuro representado en la primera columna; por ejemplo, el MW del disulfuro 1 + 28 es 238,35 Daltons (la suma de las masas de los dos tioles constituyentes menos 2 para tener en cuenta los dos protones perdidos). Téngase en cuenta que en el caso de los tioles 13 y 14 (éster etílico de L-cisteína HCl y éster metílico de L-cisteína HCl) se utiliza la masa de la forma de sal. La masa real del disulfuro libre es 36,46 Daltons menos que la masa mostrada.

(iii) El número de cisteaminas que se pueden producir tras la degradación del precursor de cisteamina in vivo. Los disulfuros se clasifican, de modo que aquellos que producen dos cisteaminas se enumeran encima de la línea horizontal en negrita, y aquellos que producen una cisteamina se enumeran debajo.

(iv) La fracción del precursor de cisteamina convertible a cisteamina libre in vivo. Por ejemplo, la fracción de los 238,35 Daltons de disulfuro 1 + 28 que se pueden convertir en cisteamina es 32,4%. Los disulfuros que producen una cisteamina se clasifican, de mayor a menor, según la fracción de su peso molecular convertible a cisteamina.

(v) El número de etapas degradativas (químicas o enzimáticas) necesarias para producir cisteamina a partir del precursor de cisteamina disulfuro. Para los disulfuros por encima de la línea horizontal en negrita, en los que ambos tioles son degradables a cisteamina (o uno de los dos tioles es cisteamina en sí mismo), se proporcionan dos números que muestran la cantidad de etapas para cada constituyente tiol del disulfuro. El orden de los dos números corresponde al orden en que aparecen los dos tioles en la primera columna de la tabla. Para los disulfuros en los que sólo uno de los tioles es degradable a cisteamina (debajo de la línea horizontal en negrita) sólo se muestra un número, que indica el número de etapas degradativas para ese tiol. Por ejemplo, en la Tabla 1B de disulfuro, el disulfuro representado "2 + 5" significa disulfuro de panteteína (tiol 2) unido a la coenzima A (tiol 5). El peso molecular de este disulfuro es 1.352,36. Al degradarse en el intestino, este disulfuro produce dos cisteaminas. Las dos cisteaminas juntas pesan 154,3 Daltons, lo que representa el 11,4 por ciento de la masa del disulfuro, como se muestra en la columna 4. La vía degradativa del disulfuro a dos cisteaminas comprende dos etapas en el caso del resto de panteteína (etapa 1: reducción del enlace de disulfuro, etapa 2: escisión por panteteinasa) y cuatro o más etapas (indicados 4+) en el caso del resto de coenzima A (etapa 1: reducción del enlace de disulfuro, etapa 2: desprendimiento del nucleótido catalizado por la ectonucleótido difosfatasa (son posibles otras rutas catabólicas), etapa 3: desfosforilación a panteteína, etapa 4: escisión por panteteinasa). Así, los números: 2/4+ en la columna 5 indican el número de etapas degradativas desde el disulfuro hasta la cisteamina para los restos de panteteína y coenzima A, respectivamente.

La FIGURA 19 contiene dos tablas que muestran cómo los tioles y ditioles de la Figura 17 pueden combinarse para formar dos clases de precursores de cisteamina disulfuro: disulfuros de 4-fosfopanteteína y disulfuros de desfosfo-coenzima A. Las cinco columnas de cada una de las dos tablas proporcionan la misma información que en la Figura 18. Nuevamente, téngase en cuenta que en el caso de los tioles 13 y 14 (éster etílico de L-cisteína HCl y éster metílico de L-cisteína HCl) se utiliza la masa de la forma de sal. La masa real del disulfuro libre es 36,46 Daltons menos que la masa mostrada.

La FIGURA 20 contiene dos tablas que muestran cómo los tioles y ditioles de la Figura 17 pueden combinarse para formar dos clases de precursores de cisteamina disulfuro: disulfuros de coenzima A y disulfuros de N-acetilcisteamina. Las cinco columnas de cada una de las dos tablas proporcionan la misma información que en la Figura 18. Nuevamente, téngase en cuenta que en el caso de los tioles 13 y 14 (éster etílico de L-cisteína HCl y éster metílico de L-cisteína HCl) se utiliza la masa de la forma de sal. La masa real del disulfuro libre es 36,46 Daltons menos que la masa mostrada.

La FIGURA 21 contiene dos tablas que muestran cómo un ditiol puede unirse a dos tioles para formar un disulfuro capaz de producir dos cisteaminas (tabla superior) o una cisteamina (tabla inferior) tras la degradación in vivo. La numeración de tioles y ditioles es como en la Figura 17. Dentro de cada tabla se agrupan diversas combinaciones posibles de ditiol-tiol-tiol por resto de ditiol (compuestos 30 - 35) para mayor concisión, y el peso molecular y los rendimientos de cisteamina para cada grupo se proporcionan como intervalos. En la parte inferior de cada tabla se muestran tres combinaciones ejemplares de ditiol-tiol-tiol, que incluyen el peso molecular específico, el porcentaje de peso molecular convertible a cisteamina, y el número de etapas degradativas a cisteamina (véase la explicación de la Figura 18, anterior). Se proporcionan detalles adicionales en el texto explicativo debajo de las dos tablas.

La FIGURA 22 ilustra la etapa de activación inicial de tiol utilizado en la síntesis química de disulfuros mixtos (asimétricos).

La FIGURA 23 ilustra un esquema sintético utilizado para producir disulfuro de cisteamina-panteteína (denominado TTI-0102, en el que 01 se refiere a la cisteamina, que es el tiol 1 en la Figura 17, y 02 se refiere a la panteteína, que es el tiol 2 en la Figura 17). La amina primaria de la cisteamina se protege primero con *terc*-butiloxycarbonilo (Boc), después el -SH de la cisteamina-Boc se activa con bis(5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)disulfano (referido con el acrónimo PDTA) en presencia de 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ), en diclorometano (DCM). Después, el grupo Boc se elimina con ácido, y la cisteamina activada se hace reaccionar con (R)-panteteína.

La FIGURA 24 ilustra un segundo esquema sintético utilizado para producir disulfuro de cisteamina-panteteína (TTI-0102). La (R)-panteteína se activa con bis(5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)disulfano (referido con el acrónimo PDTA) en presencia de 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ), en diclorometano (DCM). Después, la (R)-panteteína activada se hace reaccionar con cisteamina en hidruro de sodio (NaH) y tetrahidrofurano (THF).

La FIGURA 25 ilustra el esquema sintético utilizado para producir disulfuro de N-acetilcisteamina-panteteína (referido como TTI-0602, en el que los números 6 y 2 se refieren a los dos tioles combinados, numerados en la Figura 17). La N-acetilcisteamina se activa con bis(5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)disulfano (PDTA) en presencia de 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ), en diclorometano (DCM). Después, la N-acetilcisteamina activada se hace reaccionar con (R)-panteteína en trietanolamina (TEA) en DCM.

La FIGURA 26 ilustra el esquema sintético utilizado para producir disulfuro de N-acetilcisteína-panteteína (referido como TTI-1502, en el que los números 15 y 2 se refieren a los dos tioles combinados, numerados en la Figura 17). La N-acetilcisteína se activa con bis(5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)disulfano (PDTA) en presencia de 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ), en diclorometano (DCM). Después, la N-acetilcisteína activada se hace reaccionar con (R)-panteteína en hidruro de sodio (NaH) y tetrahidrofurano (THF).

La FIGURA 27 contiene el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de TTI-0102, obtenido en un Varian INOVA 500. La estructura insertada de TTI-0102 está anotada con las letras a a i para indicar enlaces específicos, que también se resaltan en el espectro de RMN.

La FIGURA 28 contiene el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de TTI-0602, obtenido en un Varian INOVA 500. La estructura insertada de TTI-0602 está anotada con las letras a a g para indicar enlaces específicos, que también se resaltan en el espectro de RMN.

La FIGURA 29 contiene el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de TTI-1502, obtenido en un Varian INOVA 500. La estructura insertada de TTI-1502 está anotada con las letras a a i para indicar enlaces específicos, que también se resaltan en el espectro de RMN.

La FIGURA 30A y FIGURA 30B. contienen la curva de concentración frente al tiempo de cisteamina en el plasma sanguíneo después de la administración de hidrocloreuro de cisteamina (30 mg/kg; FIGURA 30A) o compuesto 2 (también conocido como TTI-0602) (120 mg/kg; FIGURA 30B) a ratas Sprague-Dawley mediante sonda gástrica, como se describe en el Ejemplo 10. Los valores de ambas curvas son la media de tres ratas. La desviación estándar se indica mediante las barras de error.

La FIGURA 31A y FIGURA 31B. contienen la curva de concentración frente al tiempo de cisteamina en plasma sanguíneo después de la administración del compuesto 2 (también conocido como TTI-0602) a dosis de 30 mg/kg, 60 mg/kg o 120 mg/kg a ratas Sprague-Dawley (3 ratas por dosis) mediante sonda (FIGURA 31A), como se describe en el Ejemplo 10, y las curvas de concentración frente al tiempo de cisteamina, N-acetilcisteamina y ácido pantoténico en plasma sanguíneo después de la administración del compuesto 2 (también conocido como TTI-0602) a 120 mg/kg a ratas Sprague-Dawley mediante sonda (FIGURA 31B), como se describe en el Ejemplo 10.

La FIGURA 32 contiene un gráfico que ilustra la concentración de cisteamina (micromolar) en el hígado y el riñón 10,5 horas después de la administración del compuesto 2 (también conocido como TTI-0602) a 120 mg/kg a ratas Sprague-Dawley mediante sonda gástrica, como se describe en el Ejemplo 10.

La FIGURA 33 representa la curva de concentración frente al tiempo de cisteamina en el plasma sanguíneo después de la administración de: (i) hidrocloreuro de cisteamina (30 mg/kg) o dihidrocloreuro de cistamina (30 mg/kg) o pantetina (30 mg/kg) o compuesto 1 (también conocido como TTI-0102) (100 mg/kg) a ratas Sprague-Dawley macho mediante sonda, como se describe en el Ejemplo 1. Las concentraciones son la media de tres ratas, y las barras de error indican desviaciones estándar.

La FIGURA 34A y FIGURA 34B. representan la curva de concentración frente al tiempo de cisteamina en el plasma sanguíneo después de la administración del compuesto 1 (también conocido como TTI-0102) en dosis de 30 mg/kg, 60 mg/kg o 100 mg/kg a ratas Sprague-Dawley macho mediante sonda (FIGURA 34A), como se describe en los Ejemplos 11-13, y los parámetros farmacocinéticos derivados de cada dosis (FIGURA 34B). Abreviaturas: Cmax = concentración máxima de cisteamina; Tmax = tiempo en el que se alcanza la concentración máxima de cisteamina; AUC last = área bajo la curva de concentración del fármaco frente al tiempo desde el momento 0 hasta las seis horas; T ½ = vida media de la cisteamina en plasma; MRT last = tiempo de residencia medio basado en datos de 6 horas.

La FIGURA 35A y FIGURA 35B. representan un gráfico de barras que muestra la concentración de cisteamina (FIGURA 35A) y panteteína (FIGURA 35B) en los tractos gastrointestinales de ratas seis horas después de la administración de hidrocloreuro de cisteamina (30 mg/kg) o compuesto 1 (también conocido como TTI-0102) en dosis de 30 mg/kg, 60 mg/kg o 100 mg/kg a ratas Sprague-Dawley macho mediante sonda. Los contenidos gastrointestinales obtenidos del estómago, intestino delgado proximal, intestino delgado distal y ciego/colon se analizaron como se describe en los Ejemplos 11-13. Las muestras de los cuatro segmentos intestinales se redujeron con TCEP. También se analizaron los contenidos del intestino delgado proximal y distal sin TCEP. Los números sobre cada barra indican el valor de esa muestra. Las muestras están alineadas en los paneles superior e inferior para facilitar la comparación de los niveles de cisteamina y panteteína en la misma muestra.

La FIGURA 36A. representa el esquema sintético para la hemiacilación de cistamina para producir el compuesto 1 (disulfuro asimétrico de cistamina-panteteína). DCC es una abreviatura del reactivo de acoplamiento N,N'-diciclohexilcarbodiimida. HOBt es una abreviatura de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol. DMF es una abreviatura del disolvente dimetilformamida.

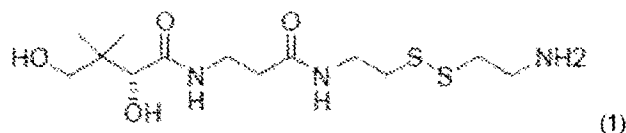
La FIGURA 36B. representa el esquema para la síntesis del compuesto 1 por intercambio tiol-disulfuro. La reacción ilustrada, que implica cisteamina (tiol) y panteteína (disulfuro), es una de las dos reacciones de intercambio tiol-disulfuro analizadas en el Ejemplo 14.

5 La FIGURA 37. representa el espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN  $^1\text{H}$ ) de TTI-0102 obtenido mediante hemiacilación de cistamina (ilustrado en la Figura 36 A). Se muestra la estructura de TTI-0102, y se anota con letras minúsculas correspondientes a los picos en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ . La tabla muestra valores numéricos para todos los picos con su valor delta (expresado en partes por millón o ppm) y altura de pico.

10 La FIGURA 38. representa en forma de tabla la relación entre las alturas de los picos de protones previstas y observadas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  que se muestra en la Figura 37, con los protones marcados (a, b, c, d, e, f, g, h, i) como en la Figura 37.

### DESCRIPCION DETALLADA

15 La invención presenta composiciones que permiten la producción in vivo de cisteamina a partir de compuestos precursores (precursores de cisteamina) en cantidades controladas y en ubicaciones controladas en el tracto gastrointestinal, para uso en métodos de tratamiento de síntomas, síndromes y enfermedades sensibles a la cisteamina. Las composiciones de la invención incluyen el compuesto 1, que se muestra a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



25 El compuesto 1 se puede administrar solo, o en combinación con un segundo activo que es un precursor de cisteamina, o en combinación con un agente que modifica la liberación o captación de cisteamina en un sujeto después de la administración del compuesto, tal como un agente reductor o un agente inductor de panteteinasa.

La cisteamina es una molécula de tiol pequeña y altamente reactiva ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ ) presente en todas las formas de vida, desde las bacterias hasta las personas. El nombre IUPAC para la cisteamina es 2-aminoetanol. Otros nombres comunes incluyen mercaptamina, beta-mercaptoetilamina, 2-mercaptoetilamina, descarboxicisteína y tioetanolamina. En los seres humanos, la cisteamina es producida por la enzima panteteinasa, que escinde la panteteína en cisteamina y ácido pantoténico, también conocido como pantotenato o vitamina B5. Las panteteinasas humanas están codificadas por los genes Vanina 1 y Vanina 2 (abreviados VNN1 y VNN2), y se expresan ampliamente, incluso en el tracto gastrointestinal. De esta manera, la panteteína dietética, presente en muchos alimentos (por ejemplo, en frutos secos y productos lácteos), se escinde en la luz gastrointestinal para generar cisteamina y ácido pantoténico, que luego se absorben. En particular, la cisteamina puede ser transportada a través del epitelio gastrointestinal por transportadores de cationes orgánicos (OCT), una familia de transportadores que incluye el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT1), OCT2 y OCT3, que han demostrado transportar cisteamina en los enterocitos. Debido a su capacidad de convertirse en cisteamina en el tracto gastrointestinal, la panteteína es un precursor de la cisteamina. Los precursores de cisteamina representan una clase de compuestos que pueden tener ventajas sobre las sales de cisteamina con respecto a (i) tolerabilidad y efectos secundarios, (ii) farmacocinética e intervalos de dosificación, (iii) fabricación y (iv) estabilidad del producto. De manera más general, la administración de un precursor de cisteamina a partir del cual se puede generar cisteamina in vivo a diferentes velocidades, y el uso de métodos de formulación para administrar esos precursores a sitios seleccionados en el tracto gastrointestinal en momentos seleccionados, puede ser útil en un régimen de tratamiento al proporcionar un control mucho mejor de la farmacocinética de la cisteamina, que hasta el presente ha sido un obstáculo importante para el uso generalizado de la cisteamina y otros tioles.

### Precursos de cisteamina

50 La panteteína, y sus productos catabólicos, cisteamina y pantotenato, son compuestos intermedios en la biosíntesis de la coenzima A en plantas y animales (véase la Figura 11 para un diagrama de las rutas metabólicas y catabólicas relevantes). Varios compuestos de la ruta biosintética de la coenzima A, tales como la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A y la coenzima A, pueden catabolizarse a panteteína, y después a cisteamina y pantotenato, en el tracto gastrointestinal humano. Por lo tanto, la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A y la coenzima A, en virtud de ser convertibles en cisteamina en el intestino, son precursores de la cisteamina. La N-acetilcisteamina también es un precursor de la cisteamina, mediante desacetilación en el intestino o por desacetilasas celulares (por ejemplo, las desacetilasas que convierten la N-acetilcisteína en cisteína in vivo).

60 La pantetina es un dímero de dos moléculas de panteteína, unidas por un enlace de disulfuro. En otras palabras, la pantetina es una forma oxidada de panteteína. La interconversión de pantetina en dos panteteínas no está mediada enzimáticamente, y no requiere ATP. La reacción, en cambio, está controlada en gran medida por el

entorno redox del intestino. En un ambiente reductor, que tiende a prevalecer in vivo, particularmente a nivel intracelular, predominará la panteteína, mientras que en un ambiente más oxidante, tal como el estómago, el equilibrio se desplazará hacia la pantetina. Un pequeño estudio clínico realizado por Wittwer (Wittwer et al., J. Exp. Med. 76:4 (1985)) demostró que, cuando se administra por vía oral, una fracción significativa de pantetina se reduce químicamente a panteteína en el tracto gastrointestinal humano, y posteriormente se escinde en cisteamina y pantotenato. Por lo tanto, la pantetina es un precursor de la cisteamina. Aquí, la panteteína se refiere al enantiómero D.

El resto de pantotenoilo de la panteteína contiene un carbono quiral. Por lo tanto, existen dos formas enantioméricas de panteteína, tradicionalmente denominadas D-panteteína y L-panteteína (también denominadas R-panteteína y S-panteteína). Sólo el enantiómero D de la panteteína puede ser escindido por la panteteinasa, por lo tanto sólo el enantiómero D sirve como un precursor de cisteamina. Los dos enantiómeros de la panteteína pueden combinarse de cuatro maneras para formar el disulfuro pantetina: D-,D-; D-,L-; L-,D-; y L-,L-pantetina. Sólo la D-,D-pantetina puede reducirse químicamente a dos D-panteteínas y después escindirse para producir dos cisteaminas. Por lo tanto, la forma D-,D- de pantetina es muy preferida, y el término pantetina, como se utiliza aquí, se refiere al enantiómero D-,D-. Los compuestos relacionados con la panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A, también deben estar en la configuración estereoisomérica D- para producir D-panteteína (y por lo tanto cisteamina) tras la degradación en el intestino. Por lo tanto, "4-fosfopanteteína", "desfosfo-coenzima A" y "coenzima A", así como cualquier análogo o derivado de los mismos, aquí se refieren al enantiómero D-. Ninguno de los compuestos, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, es absorbido por los enterocitos, sino que cada compuesto debe ser catabolizado a pantotenato y cisteamina, que son absorbidos (véase Shibata et al., J. Nutr. 113:2107 (1983)).

Los análogos o derivados del estereoisómero D- de panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A que pueden convertirse en el compuesto original en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, mediante procesos enzimáticos o químicos naturales) también pueden usarse para formar precursores de cisteamina de tipo tiol o disulfuro, y aquí se denominan "análogos o derivados adecuados". Por ejemplo, hay muchas formas fisiológicas de coenzima A (por ejemplo, acetil CoA, succinil CoA, malonil CoA, etc.) que se degradan fácilmente a coenzima A en el intestino. Se puede utilizar cualquier análogo acetilado, alquilado, fosforilado, lipidado, u otro, como precursor de cisteamina. Se han descrito en la bibliografía análogos de panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, así como métodos para producirlos (van Wyk et al., Chem Commun 4:398 (2007)).

La panteteína puede formar disulfuros con otros tioles distintos de ella misma, denominados disulfuros mixtos de panteteína, que constituyen otra clase de precursores de cisteamina. Los tioles que reaccionan con panteteína son preferiblemente tioles naturales o tioles no naturales que se sabe que son seguros para el hombre según un historial de uso en seres humanos o animales. Por ejemplo, se pueden formar disulfuros mixtos al hacer reaccionar panteteína con 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, compuestos presentes en el cuerpo humano y en muchos alimentos. Estos disulfuros mixtos, tras la reducción y degradación en el intestino, producen dos cisteaminas. La panteteína acoplada a la N-acetilcisteamina también produce dos cisteaminas tras la reducción y degradación en el intestino. En ciertas realizaciones, se prefieren precursores de cisteamina disulfuro que pueden producir dos cisteaminas. Las Figuras 18 - 21 muestran el rendimiento de cisteamina de diferentes clases de precursores de cisteamina disulfuro. Los análogos o derivados de 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A que pueden convertirse en el compuesto original en el tracto gastrointestinal a través de procesos químicos o enzimáticos (es decir, análogos o derivados adecuados) también pueden acoplarse a la panteteína para formar precursores de cisteamina disulfuro mixtos de panteteína, o pueden acoplarse a otros tioles.

Los disulfuros mixtos de panteteína también se pueden formar haciendo reaccionar panteteína con tioles que no son degradables en sí mismos a cisteamina, tales como L-cisteína, homocisteína, N-acetilcisteína, amida de N-acetilcisteína, éster etílico de N-acetilcisteína, N-acetilcisteamina, éster etílico de hidrocloreto de L-cisteína, éster metílico de hidrocloreto de L-cisteína, tiocisteína, alil mercaptano, furfural mercaptano, bencil mercaptano, tioterpineol, 3-mercaptopiruvato, cisteinilglicina, gamma glutamiltiocisteína, éster etílico de gamma-glutamiltiocisteína, glutatona, éster monoetilico de glutatona, éster dietílico de glutatona, mercaptoetilgluconamida, ácido tiosalicílico, tiocisteína, tiopronina o ácido dietilditiocarbámico. Véase la Figura 17 para conocer los números de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), las fórmulas moleculares y el peso molecular de compuestos de tiol ejemplares que pueden reaccionar con panteteína para formar disulfuros mixtos de panteteína. Los disulfuros formados por la panteteína y cualquiera de los tioles 6 - 35 (véase la Figura 17 para la numeración de los tioles) producen, tras la reducción del enlace de disulfuro y la escisión por panteteinasa, una cisteamina. Aunque estos segundos tioles no son convertibles en cisteamina en el intestino, pueden no obstante mejorar la producción de cisteamina, por ejemplo estimulando la actividad de la panteteinasa o participando en el intercambio de disulfuro con disulfuros que contienen cisteamina, o pueden proporcionar un beneficio terapéutico complementario al proporcionado por la cisteamina, por ejemplo actuando como agentes reductores, o mediante otros mecanismos.

Los compuestos de ditiol tales como el ácido dihidrolipoico (DHLA), el ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), el ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico (DMPS), el 2,3-dimercapto-1-propanol, la bucilamina o la N,N'-bis(2-mercaptoetil)isofaltamida también se pueden hacer reaccionar con panteteína para formar un disulfuro mixto

de panteteína con un grupo tiol libre, o un compuesto tripartito con dos enlaces de disulfuro que conectan dos moléculas de panteteína al ditiol. La primera categoría de disulfuros de panteteína mixtos produce una cisteamina tras la reducción del enlace de disulfuro y la escisión por panteteinasa, mientras que la última categoría produce dos cisteaminas. Véase la Figura 21 para ver tablas que muestran cómo la cisteamina, la panteteína, la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A, la coenzima A o la N-acetilcisteamina pueden combinarse con diversos ditiolos para producir precursores de cisteamina útiles. Como alternativa, se pueden unir dos tioles diferentes a un ditiol para producir un precursor de cisteamina, siempre que uno de los tioles sea cisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina, o un análogo o derivado adecuado de los mismos; es decir, un compuesto que en última instancia puede degradarse a cisteamina en el tracto gastrointestinal. Las Tablas 2A y 2B de la Figura 21 muestran algunas de las propiedades más destacadas de dichos precursores de cisteamina, incluyendo el intervalo de pesos moleculares y rendimientos de cisteamina (es decir, el porcentaje del precursor de cisteamina convertible a cisteamina *in vivo*), y para ejemplos seleccionados, el número de etapas de degradación *in vivo* del precursor de cisteamina a cisteamina.

De manera similar a la panteteína, cualquiera de 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina, o análogos o derivados adecuados, pueden (i) hacerse reaccionar consigo mismos para formar un disulfuro homodimérico, o (ii) hacerse reaccionar entre sí en diversos pares para formar disulfuros mixtos, o (iii) hacerse reaccionar con otros tioles (no convertibles en cisteamina *in vivo*), para formar disulfuros mixtos. Todos estos disulfuros son precursores de cisteamina. Las dos primeras categorías pueden producir dos cisteaminas tras la reducción y degradación en el intestino, mientras que la tercera categoría puede producir sólo una cisteamina.

Por ejemplo, cualquiera de los tioles enumerados en la Figura 17 se pueden hacer reaccionar con 4-fosfopanteteína (como se muestra en la Figura 19), con desfosfo-coenzima A (Figura 19), con coenzima A (Figura 20) o con N-acetilcisteamina (Figura 20) para formar precursores de cisteamina disulfuro mixtos. También se pueden utilizar otros tioles naturales, así como tioles no naturales que se sabe que son seguros para el hombre. Las Figuras 18 - 21 muestran esquemáticamente algunas de las combinaciones de tioles y ditiolos que se pueden hacer reaccionar para formar precursores de cisteamina disulfuro. La conversión de dichos compuestos en cisteamina en el tracto gastrointestinal humano requiere: (i) reducción del enlace de disulfuro para generar tioles libres, (ii) en el caso de disulfuros que contienen 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o análogos o derivados adecuados de los mismos, degradación por enzimas presentes en el intestino (por ejemplo, fosfatasas, difosfatasas, fosfodiesterasas) para generar panteteína, (iii) escisión de panteteína por panteteinasa. Los disulfuros que contienen N-acetilcisteamina deben reducirse y desacetilarse en el intestino, la sangre o los tejidos.

La propia cisteamina también se puede hacer reaccionar con otros tioles para formar precursores de cisteamina disulfuro mixtos. Por ejemplo, la cisteamina se puede hacer reaccionar con panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina, con análogos o derivados de esos cinco tioles degradables al compuesto original en el tracto gastrointestinal, o con cualquiera de los otros tioles enumerados en la Figura 17, para formar cualquiera de los disulfuros en las Figuras 18 - 20. Se pueden unir dos cisteaminas a un ditiol a través de dos enlaces disulfuro para producir otro tipo de precursor de cisteamina disulfuro (Figura 21). La Figura 8 ilustra la estructura química de dicho precursor de cisteamina: un disulfuro de dihidrolipoato unido a dos cisteaminas. Tras la reducción del enlace de disulfuro, se liberan dos cisteaminas, junto con ácido dihidrolipoico, que es un fuerte agente reductor y puede complementar las propiedades terapéuticas de la cisteamina en ciertos entornos patológicos.

En resumen, los precursores de cisteamina se pueden clasificar en tres categorías principales: (i) tioles degradables a cisteamina, (ii) disulfuros mixtos que incluyen cisteamina, incluidos disulfuros formados con ditiolos, (iii) disulfuros que incluyen panteteína, (iii) disulfuros que incluyen 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A o análogos o derivados adecuados. Cada una de las últimas tres categorías se puede descomponer aún más dependiendo del segundo tiol: (a) panteteína o análogos o derivados adecuados, (b) 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, o coenzima A o análogos o derivados adecuados, o (c) un tiol que no es en sí mismo un precursor de cisteamina (por ejemplo, L-cisteína, homocisteína, N-acetil-cisteína, amida de N-acetilcisteína, éster etílico de N-acetilcisteína, N-acetilcisteamina, éster etílico de hidrocloreto de L-cisteína, éster metílico de hidrocloreto de L-cisteína, tiocisteína, alil mercaptano, furfuril mercaptano, bencil mercaptano, 3-mercaptopiruvato, tioterpineol, glutatióna, cisteinilglicina, gamma glutamilcisteína, éster etílico de gamma-glutamilcisteína, éster monoetilico de glutatióna, éster dietílico de glutatióna, mercaptoetilgluconamida, ácido tiosalicílico, tiocisteína, tiopronina o ácido dietilditiocarbámico). Los compuestos de ditiol tales como el ácido dihidrolipoico, el ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), el ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico (DMPS), el 2,3-dimercapto-1-propanol, la buclamina o la N,N'-bis(2-mercaptoetil)isofaltamida también se pueden combinar con cisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A o análogos o derivados adecuados, para formar disulfuros.

### ***Propiedades farmacológicas de los precursores de cisteamina***

El patrón temporal y espacial de la generación de cisteamina *in vivo* a partir de precursores de cisteamina puede variar ampliamente dependiendo del tipo de precursor de cisteamina. Los precursores de cisteamina que requieren múltiples reacciones químicas y enzimáticas para generar cisteamina generarán, en promedio, cisteamina más tarde que aquellos que requieren sólo una etapa. Esta propiedad de los precursores de cisteamina se puede utilizar

para diseñar una pluralidad de composiciones farmacéuticas con diferentes velocidades y duraciones de creación de cisteamina in vivo. Además, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinaciones y en proporciones que produzcan fines farmacológicos deseables. Por ejemplo, para proporcionar niveles elevados de cisteamina plasmática poco después de la administración del fármaco, se puede administrar un disulfuro de cisteamina mixto. La única etapa necesaria para producir una cisteamina a partir de un disulfuro de cisteamina mixto es la reducción del enlace de disulfuro. Dependiendo de la identidad del segundo tiol, se puede producir una segunda cisteamina, siguiendo una o más etapas degradativas. La segunda cisteamina sólo se puede generar después de la reducción del enlace de disulfuro y otra etapa, por lo que necesariamente se producirá más tarde que la primera cisteamina, extendiendo así el período de tiempo durante el cual la cisteamina se genera en el intestino y se absorbe en la sangre. Dado que la base libre de cisteamina y las sales de cisteamina (por ejemplo, Cystagon® y ProCysbi®) tienen una vida media muy corta, esta prolongación de la creación de cisteamina in vivo a partir de precursores de cisteamina representa un avance significativo con respecto a las terapias actuales.

En un enfoque, si el segundo tiol es panteteína (es decir, un disulfuro de cisteamina-panteteína), entonces es necesario una etapa de escisión por panteteinasa para generar una segunda cisteamina. La panteteinasa generalmente se encuentra en la superficie de los enterocitos, y por lo tanto sólo está en contacto con una fracción del contenido intestinal en un momento dado, lo que extiende el período de tiempo durante el cual se genera cisteamina. Esta combinación de generación temprana y tardía de cisteamina a partir de una molécula de disulfuro tiene varias ventajas: (i) la cisteamina se vuelve disponible tras la reducción del enlace de disulfuro, proporcionando un beneficio terapéutico temprano, (ii) la escisión de la panteteína se produce con el tiempo (las panteteinasas se expresan en niveles variables a lo largo del tracto gastrointestinal), lo que extiende la duración del beneficio terapéutico, (iii) la producción prolongada de cisteamina a lo largo del tiempo y el espacio, a través de la reducción del enlace de disulfuro y la escisión de la panteteína, reduce las altas concentraciones máximas de cisteamina que están fuertemente asociadas con los efectos secundarios, mientras que también (iv) evita la saturación de la panteteinasa o los mecanismos de captación de cisteamina, tal como el transporte por OCT. En resumen, los niveles elevados y prolongados de cisteamina en sangre proporcionan una medicación más eficaz y una forma de dosificación menos tóxica y más conveniente para los pacientes.

Alternativamente, si el segundo tiol es L-cisteína (es decir, un disulfuro de cisteamina-L-cisteína), entonces sólo se genera una cisteamina, con la reducción del disulfuro, y no hay generación de cisteamina de larga duración. Sin embargo, como se describe a continuación, el disulfuro de cisteamina-L-cisteína se puede formular para su liberación en prácticamente cualquier parte del tracto gastrointestinal, incluido el íleon o el colon, en el que puede ser útil un precursor de cisteamina capaz de liberar cisteamina rápidamente. Además, también se ha demostrado que la cisteína mejora la actividad de panteteinasa, y tiene efectos beneficiosos en varios modelos de enfermedad. Por lo tanto, un disulfuro de cisteamina-L-cisteína puede ser un complemento útil para otro precursor de cisteamina, o puede ser útil para el tratamiento de enfermedades que responden tanto a la cisteamina como a la cisteína.

Los disulfuros que contienen un tiol que requiere dos o más reacciones catabólicas para generar cisteamina, tales como 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, o análogos o derivados adecuados de los mismos, pueden degradarse de manera más eficiente en el intestino delgado, en el que están expuestos a las enzimas digestivas presentes en el jugo pancreático, que en el estómago o el intestino grueso. Los disulfuros obtenidos al hacer reaccionar dos de estos tioles entre sí, o con tioles distintos de la cisteamina, generarán cisteamina a partir de un momento posterior y durante un período de tiempo más largo que, por ejemplo, un disulfuro de cisteamina-L-cisteína. En promedio, la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A o la coenzima A, o análogos adecuados generarán cisteamina más tarde que la panteteína, y lo mismo ocurre con los disulfuros que contienen esos compuestos.

Los precursores de cisteamina, tales como panteteína y los compuestos degradables a panteteína en el intestino, así como los disulfuros que contienen cualquiera de esos compuestos, producen pantotenato, junto con cisteamina, tras su escisión por panteteinasa. El pantotenato, o vitamina B5, es un compuesto soluble en agua que está presente en la dieta y es sintetizado por bacterias entéricas. Cuando se administra pantotenato en grandes dosis, el exceso se excreta en la orina. Una revisión del pantotenato realizada por el Panel sobre Folato, Otras Vitaminas B y Colina del Comité Permanente sobre Evaluación Científica de Ingestas Dietéticas de Referencia del Instituto de Medicina de los Estados Unidos (National Academies Press (EE.UU.), 1998) encontró que: "No se encontraron informes de efectos adversos del ácido pantoténico oral en seres humanos o animales".

### **Mezclas de precursores de cisteamina**

Las composiciones para uso según la invención pueden incluir mezclas de precursores de cisteamina para aprovechar sus diferentes propiedades farmacológicas. En particular, se puede lograr una mejora individualizada (o personalización para las necesidades de un paciente determinado) de los niveles plasmáticos de cisteamina utilizando mezclas de precursores de cisteamina. Por ejemplo, el disulfuro mixto de cisteamina-panteteína descrito anteriormente fija la relación de cisteamina a panteteína en 1:1. Sin embargo, la cisteamina se absorbe y se elimina del cuerpo rápidamente (vida media de eliminación: ~25 minutos), produciendo un pico agudo en los niveles sanguíneos, mientras que la panteteína proporciona cisteamina (a través de la escisión por panteteinasa) durante varias horas. Por lo tanto, una dosis de un disulfuro mixto de cisteamina-panteteína que produce niveles



terapéuticos de cisteamina de forma temprana (a partir de la cisteamina liberada tras la reducción del enlace de disulfuro) puede producir niveles subterapéuticos de cisteamina más tarde, porque la generación de cisteamina a partir de panteteína se extiende en un período de tiempo más largo. Por lo tanto, una relación 1:1 de cisteamina:panteteína puede no ser ideal para un paciente o propósito específico. Añadir más panteteína a la forma de dosificación mantendría la cisteamina en sangre en el intervalo de concentración terapéutica durante un período de tiempo más largo. Para aumentar la relación de panteteína a cisteamina, la tiol panteteína o la disulfuro pantetina, u otro disulfuro que contenga panteteína, se pueden coformular o coadministrar, por ejemplo, con el disulfuro mixto de cisteamina-panteteína para lograr niveles de cisteamina en sangre dentro del intervalo terapéutico durante un período de tiempo más prolongado. La relación de los dos precursores de cisteamina se puede ajustar para lograr los parámetros farmacocinéticos deseados, tales como maximizar el área bajo la curva de concentración frente al tiempo de cisteamina (AUC), o minimizar la concentración máxima (Cmax) de cisteamina, o maximizar la concentración mínima (Cmin), o mantener los niveles sanguíneos de cisteamina por encima de un umbral, o cualquier combinación de dichos parámetros.

Los precursores de cisteamina, tales como la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A o coenzima A, y los disulfuros formados a partir de esos tres compuestos, requieren más etapas catabólicas para producir cisteamina que la panteteína (que sólo requiere una etapa). En consecuencia, la velocidad de producción de cisteamina a partir de esos precursores de cisteamina es, en promedio, más lenta y más prolongada que la de la panteteína o ciertos disulfuros de panteteína. Por lo tanto, la coadministración o coformulación de 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, o sus disulfuros en combinación con cisteamina-panteteína, y opcionalmente panteteína o pantetina, proporciona otra forma de controlar la farmacocinética de la cisteamina mediante la selección de precursores de cisteamina apropiados. En particular, el uso de dichos precursores de cisteamina se puede utilizar para extender aún más el tiempo durante el cual se produce cisteamina en el tracto gastrointestinal.

#### ***disulfuros que contienen 4-fosfopantetina, desfosfo-coenzima A y coenzima A***

La ruta biosintética canónica de la coenzima A, que se muestra esquemáticamente en la Figura 11, implica cinco etapas catalizadas por cuatro enzimas (la CoA sintasa cataliza las dos etapas finales). La etapa inicial, la fosforilación del pantotenato por la pantotenato cinasa, controla el flujo a través de la ruta. Hasta hace poco se creía que ninguno de los compuestos intermedios en las rutas sintéticas (o catabólicas) de la coenzima A se absorbía eficientemente en el tracto gastrointestinal. Más bien, sólo los productos catabólicos de la panteteína (pantotenato y cisteamina) se absorben en el intestino. Dos consecuencias importantes de esa comprensión de la ruta de la coenzima A para la terapia con precursores de cisteamina son (i) los precursores de cisteamina deben degradarse a cisteamina en el intestino, después absorberse y transportarse al sitio del efecto terapéutico (por ejemplo, hígado, sistema nervioso central), y (ii) la síntesis de coenzima A celular necesariamente comienza a partir del pantotenato (ya que otros intermediarios metabólicos no atraviesan las membranas celulares).

Sin embargo, la 4-fosfopanteteína atraviesa las membranas celulares de manera eficiente (Srinivasan et al., Nature Chemical Biology 11:784 (2015)). Esta observación tiene implicaciones para el diseño y uso de los precursores de cisteamina descritos aquí para tratar una variedad de enfermedades y trastornos. En primer lugar, permite enfoques de tratamiento que implican la creación de cisteamina in situ en múltiples tejidos y órganos (a diferencia de solo en el intestino), incluidos los tejidos enfermos. En un segundo aspecto, permite la administración celular de un precursor de coenzima A (4-fosfopanteteína) después de la etapa sintética inicial catalizada por la pantotenato cinasa, que se puede utilizar para tratar a sujetos con deficiencia de pantotenato cinasa. A continuación se describen métodos para utilizar precursores de cisteamina para tratar estas dos categorías de enfermedades, y se ilustran con varios ejemplos.

En un enfoque, las enfermedades de los riñones, el hígado, los pulmones y los tejidos conjuntivos, así como las enfermedades infecciosas, se pueden tratar eficazmente debido a que estos órganos (y otros) contienen panteteinasa, expresada a partir del gen VNN1 o VNN2. El método incluye (i) dosificar a un paciente con un precursor de cisteamina que puede degradarse en el intestino para producir una o dos moléculas de 4-fosfopanteteína, una fracción de la cual (ii) será absorbida por los enterocitos y pasará a la sangre (en la que la 4-fosfopanteteína es bastante estable), y luego, a través de la circulación, (iii) pasará a través del órgano enfermo, en el que (iv) puede ser degradada por la fosfatasa y la panteteinasa para producir cisteamina en el lugar de la enfermedad.

Las ventajas de este método de tratamiento pueden incluir (i) mayor concentración de cisteamina en el sitio de la enfermedad que la que se puede lograr con la cisteamina absorbida desde el intestino, por dosis equivalente, (ii) menor concentración de cisteamina en plasma (debido a que la 4-fosfopanteteína es el vehículo de administración circulante) con la consiguiente menor toxicidad, (iii) mayor vida media en sangre que la cisteamina (más de 3 horas para la 4-fosfopanteteína frente a unos 25 minutos para la cisteamina), lo que alarga los intervalos de dosificación y de ese modo aumenta la comodidad del paciente, y (iv) la capacidad de dirigir selectivamente la cisteamina a los tejidos enfermos en los que la sobreexpresión de panteteinasa es patógena, incluyendo, por ejemplo, enfermedades metabólicas tal como NASH (Sato W. et al., Hepatol Res. 34:256 (2006)), y ciertas enfermedades inflamatorias (Naquet P. et al., Biochem Soc Trans. 42:1094 (2014)). La inflamación suele estar presente en los sitios de infección, por lo que también es posible la creación selectiva de cisteamina en los sitios de infección, y es

útil en entornos en los que la cisteamina tiene efectos antimicrobianos, antivirales o antiparasitarios. Por tanto, la 4'-fosfopanteteína puede absorberse en el intestino, circular en la sangre, y después degradarse a cisteamina en un órgano o tejido enfermo que expresa panteteinasa, ya sea de manera constitutiva, como en el riñón, o como manifestación de una enfermedad activa, como en la inflamación.

#### **4-fosfopantetina - producción de disulfuros para enfermedades renales**

Como se señaló anteriormente, las panteteinasas (codificadas por los genes VNN1 y VNN2) se expresan en niveles elevados en el riñón. Por lo tanto, parte de la 4-fosfopanteteína circulante se degradará en el riñón, produciendo cisteamina. Las ventajas de la creación de cisteamina específica en los riñones incluyen niveles tisulares más elevados que los que se podrían lograr mediante la absorción de cisteamina por el tracto gastrointestinal, y menos efectos secundarios asociados con niveles elevados de cisteamina en sangre (por ejemplo, mal aliento y sudor, náuseas, vómitos, anorexia y dolor de estómago). Las enfermedades renales que responden a la terapia con cisteamina incluyen enfermedades fibróticas (por ejemplo, glomerulonefritis), así como enfermedades metabólicas, incluida la cistinosis nefropática (en la que la insuficiencia renal es una complicación importante que puede retrasarse hasta una década mediante la terapia con cisteamina).

La cistinuria es otra enfermedad renal hereditaria, asociada con cálculos renales recurrentes (nefrolitiasis). En promedio, los pacientes adultos requieren un procedimiento quirúrgico para el dolor, la infección u otra complicación asociada con los cálculos renales cada 3 años, y el paciente promedio se ha sometido a siete procedimientos quirúrgicos para nefrolitiasis en la mediana edad. Los pacientes con cistinuria tienen mayor riesgo de pérdida renal, requiriendo nefrectomía. Una pequeña pero significativa proporción de casos (1-3 por ciento) desarrollan enfermedad renal terminal, y deben tratarse con diálisis o trasplante de riñón.

La cistinuria es causada por mutaciones en uno de los dos genes (SLC3A1 y SLC7A9) que codifican el transportador de cistina de baja afinidad, rBAT, un heterodímero. La transmisión de la enfermedad es autosómica recesiva; los individuos que heredan dos copias defectuosas de cualquiera de los genes desarrollan cistinuria.

En sujetos humanos sanos, sólo el 0,4% de la cistina filtrada a través del glomérulo termina en la orina; el 99,6% restante es reabsorbido en el túbulo proximal por rBAT (y en menor medida por otro transportador). Cuando el rBAT es defectuoso, altas concentraciones de cistina permanecen en la orina a medida que se acumula en la pelvis renal. La cistina puede precipitarse formando cálculos, lo que puede causar obstrucción ureteral y dolor intenso. Los cálculos renales también aumentan el riesgo de infección. (No todos los pacientes con cistinuria desarrollan cálculos; el espectro de la enfermedad es bastante amplio).

El tratamiento inicial de los pacientes con cistinuria que desarrollan cálculos es dietético: beber hasta 5 litros de líquidos por día y alcalinizar la orina a un pH cercano a 7,5, lo que aumenta la solubilidad de la cistina. La terapia de segunda línea es la administración de compuestos de tior que pueden formar disulfuros mixtos con cisteína. Los disulfuros mixtos son más solubles que la cistina, y por lo tanto permanecen disueltos en la orina. Los tioles penicilamina y tiopronina se han utilizado de esta forma, pero la mayoría de los pacientes no los toleran bien. La alfa-mercaptopropionilglicina también se ha aprobado por la FDA de EE. UU. para la cistinuria, pero alrededor de un tercio de los pacientes no la tolera.

Los precursores de cisteamina administrados por vía oral, degradables a 4-fosfopanteteína en el intestino, después absorbidos, pasados a la circulación y finalmente degradados a panteteína y luego a cisteamina por panteteinasa en el riñón, son una clase útil de compuestos terapéuticos para la cistinuria. La cisteamina forma fácilmente disulfuros mixtos con cisteína a través del intercambio de disulfuro con cistina, y el disulfuro de cisteamina-cisteína es más soluble que la cistina en disoluciones acuosas (por ejemplo, orina). Debido a que este enfoque terapéutico implica la formación de cisteamina en el riñón, se requieren dosis más bajas del precursor de cisteamina que las que serían necesarias para la cisteamina formada y absorbida en el intestino (sólo una pequeña fracción de la cual llega al riñón).

Otras enfermedades renales que pueden tratarse con terapia con cisteamina pueden tratarse utilizando un enfoque similar, incluidas las enfermedades fibróticas asociadas con daño oxidativo y las enfermedades hereditarias, incluidas las enfermedades causadas por mutaciones que alteran un codón de arginina a un codón de cisteína. El suministro de sangre al riñón constituye una fracción importante del gasto cardíaco y garantiza el suministro de una fracción significativa de 4-fosfopanteteína absorbida al riñón.

De manera más general, los precursores de cisteamina degradables a 4-fosfopanteteína (incluidos los disulfuros de 4-fosfopanteteína) son útiles para proporcionar dosis terapéuticas de cisteamina a todos los órganos que expresan niveles significativos de fosfatasa y panteteinasa. Por ejemplo, se pueden tratar enfermedades pulmonares asociadas al daño oxidativo.

Los precursores de cisteamina útiles para estos métodos de tratamiento incluyen coenzima A, desfosfo-coenzima A y disulfuros que contienen 4'-fosfopanteteína, cada uno de los cuales puede degradarse a 4'-fosfopanteteína en el tracto gastrointestinal, ya sea por reducción de enlace de disulfuro (en el caso de disulfuros que contienen 4'-

fosfopanteteína), o por reducción de enlace de disulfuro seguido de degradación enzimática (en el caso de disulfuros que contienen coenzima A y desfosfo-coenzima A). En algunas realizaciones, se prefieren los precursores de cisteamina que proporcionan dos moléculas de 4'-fosfopanteteína sobre aquellos que proporcionan una. Por ejemplo, un disulfuro mixto de 4'-fosfopanteteína - desfosfo-coenzima A, o un disulfuro homodimérico de 4'-fosfopanteteína puede proporcionar mayor capacidad de generación de cisteamina *in situ* que un disulfuro mixto de cisteína - 4'-fosfopanteteína. Otra clase útil de precursores de cisteamina comprende ditioles unidos a uno o dos tioles degradables a 4'-fosfopanteteína. Por ejemplo, el ácido dihidrolipoico unido a través de enlaces de disulfuro a una o dos moléculas de 4'-fosfopanteteína.

De manera más general, cualquier disulfuro compuesto por 4'-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A y otro tiol puede, después de la reducción del enlace de disulfuro y (en el caso de la desfosfo-coenzima A o coenzima A) degradación parcial en el tracto gastrointestinal, ser una fuente de 4'-fosfopanteteína. Después del transporte a través del epitelio gastrointestinal y al llegar a la circulación, la 4'-fosfopanteteína puede ser degradada por una fosfatasa sérica a panteteína (que, sin embargo, es una reacción lenta) y luego por panteteinasa a cisteamina y pantotenato en la sangre (una reacción rápida), o la 4'-fosfopanteteína puede degradarse al entrar en contacto con tejidos que expresan fosfatasa y panteteinasa. Las fosfatasas, incluidas, por ejemplo, las fosfatasas ácidas codificadas por los genes ACP1, ACP2, ACP5 y ACPT, así como las fosfatasas alcalinas codificadas por los genes ALPI, ALPL, ALPP y ALPL2, se expresan (colectivamente) ampliamente. Los tejidos que expresan la panteteinasa codificada por VNN1 incluyen el hígado, el riñón, el corazón y el tracto gastrointestinal, mientras que la panteteinasa codificada por VNN2 se expresa en el riñón, la vejiga, el páncreas, el bazo, el pulmón, el sistema hematopoyético (por ejemplo, médula ósea, ganglios linfáticos, amígdalas), el tejido conjuntivo (músculo liso, tejido adiposo) y, en menor medida, en la tiroides, la glándula suprarrenal, el corazón y los órganos reproductores (testículos, ovarios, trompas de Falopio, endometrio). El gen VNN3 se ha descrito como un pseudogén; sin embargo, varios informes describen la expresión diferencial de VNN3, lo que sugiere un papel funcional. VNN3 se expresa ampliamente. Se pueden encontrar datos sobre la expresión de genes de la familia vanina en tejidos y líneas celulares en bases de datos públicas tal como el atlas de proteínas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) y en varias publicaciones (por ejemplo, Jansen, P.A.M. et al. Expression of the Vanin Gene Family in Normal and Inflamed Human Skin: Induction by Proinflammatory Cytokines. J. Investigative Dermatology 129: 2167-2174, 2009).

### **Neurodegeneración asociada a la pantotenato cinasa (PKAN)**

Un segundo método de tratamiento en el que se pueden utilizar terapéuticamente precursores de cisteamina disulfuro que liberan 4'-fosfopanteteína se ilustra mediante una enfermedad conocida como neurodegeneración asociada a la pantotenato cinasa (PKAN). Existe evidencia preclínica y clínica de que la cisteamina es terapéuticamente eficaz en varias enfermedades neurodegenerativas, incluidas la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro (NBIA). NBIA se refiere a un grupo de enfermedades raras, clínicamente heterogéneas, asociadas de forma variable con signos extrapiramidales progresivos, retraso en el desarrollo motor y deterioro cognitivo, entre otros síntomas. La edad de aparición oscila desde la infancia hasta la edad adulta tardía. Los síntomas que se presentan varían ampliamente, al igual que las velocidades de progresión. Por lo tanto, el diagnóstico generalmente se sugiere mediante la observación de una acumulación anormal de hierro en los ganglios basales en una resonancia magnética del cerebro. También puede presentarse atrofia cerebelosa. NBIA se asocia con mutaciones en algunos genes: PANK2, PLA2G6, C19orf12, FA2H, ATP13A2, WDR45, COASY, FTL, CP y DCAF17. A excepción de las mutaciones en el gen WDR45, ubicado en el cromosoma X, la NBIA se transmite como una enfermedad autosómica recesiva.

El tipo más común de NBIA (30-50% de todos los casos) es la neurodegeneración asociada a la pantotenato cinasa (PKAN), que es causada por una mutación en el gen que codifica la pantotenato cinasa 2 (PANK2). La pantotenato cinasa 2, que se localiza en las mitocondrias, fosforila el ácido pantoténico para generar ácido 4'-fosfopantoténico, que se convierte en 4'-fosfopantotenil-cisteína, que posteriormente se descarboxila a 4'-fosfopanteteína (véase la Figura 11). Proporcionar una fuente de 4'-fosfopanteteína, un metabolito aguas abajo a la etapa catalizada por PANK2, supera el requisito de enzima PANK2 funcional. Tanto la coenzima A como la desfosfo-coenzima A pueden degradarse a 4'-fosfopanteteína en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, cualquier disulfuro que consista en 4'-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A y otro tiol puede complementar la deficiencia de PANK2.

En ciertas realizaciones, se puede administrar 4'-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o disulfuros que contienen coenzima A a pacientes que padecen una deficiencia de PANK2 para mejorar los síntomas de la enfermedad. Específicamente, los disulfuros que se muestran en la Figura 19 (Tablas 1C y 1D), Figura 20 (Tabla 1E) y Figura 21 (el subconjunto de compuestos que comprenden al menos una 4'-fosfopanteteína, una desfosfo-coenzima A o una coenzima A; tioles 3, 4 y 5, respectivamente, en la nomenclatura de las Figuras).

Los precursores de cisteamina disulfuro de la presente solicitud son particularmente adecuados para implementar los métodos de tratamiento descritos anteriormente. Los disulfuros proporcionan una forma eficaz de administrar 4'-fosfopanteteína (y en última instancia cisteamina) debido a que (i) los disulfuros son estables en el aire (es decir, estables al oxígeno), y por lo tanto más fáciles de formular y almacenar que los tioles, y estables durante períodos más largos, (ii) el grupo tiol está protegido hasta que el disulfuro se reduce en el intestino delgado, cerca del sitio de absorción, (iii) un segundo tiol, con propiedades terapéuticas aditivas o complementarias, se puede administrar

simultáneamente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el disulfuro mixto de cisteamina-4-fosfopanteteína, el disulfuro mixto de cisteamina-defosfocoenzima A y el disulfuro mixto de cisteamina-coenzima A son compuestos terapéuticos útiles.

## 5 Potenciadores de la producción de cisteamina a partir de precursores de cisteamina

Las composiciones según la invención pueden utilizar potenciadores de la producción de cisteamina. Se puede lograr una flexibilidad adicional en el control de los niveles sanguíneos de cisteamina combinando precursores de cisteamina con potenciadores de las etapas necesarias para descomponer química y enzimáticamente los precursores de cisteamina a cisteamina en el intestino, para absorber la cisteamina en la sangre, y para evitar que la cisteamina se catabolice rápidamente en el intestino, la sangre o los tejidos. Existen potenciadores específicos para cada una de estas etapas. Por lo tanto, cualquiera de los precursores de cisteamina descritos aquí puede opcionalmente coformularse o coadministrarse o administrarse en secuencia con un agente que mejora la generación de cisteamina o la absorción intestinal o retarda la descomposición de cisteamina.

La primera etapa para convertir los precursores de cisteamina disulfuro en cisteamina es la reducción del disulfuro para producir dos tioles. Es posible que el entorno redox en el tracto gastrointestinal no contenga suficientes equivalentes reductores para reducir cuantitativamente los precursores de cisteamina a sus respectivos tioles, lo que limita la generación de cisteamina. Por ejemplo, la concentración de los agentes reductores glutatona y cisteína en el jugo gástrico es muy baja o indetectable (véase Nalini et al., *Biol Int.* 32:449 (1994)). Además, en un pequeño estudio clínico con dosis altas de pantetina, gran parte de la pantetina se excretó sin cambios en las heces, lo que aparentemente refleja una reducción incompleta del enlace de disulfuro (véase Wittwer et al., *J. Exp. Med.* 76:4 (1985)). Para abordar esta posible limitación, los agentes reductores pueden coadministrarse o coformularse con precursores de cisteamina disulfuro, o administrarse antes o después de los precursores de cisteamina para que estén disponibles en el momento y el lugar en el que se necesitan. Los agentes reductores pueden promover la reducción del enlace de disulfuro, liberando dos tioles, o pueden promover reacciones de intercambio tiol-disulfuro, en las que un tiol (A) y un disulfuro (B-C) reaccionan para producir un nuevo disulfuro (A-B o A-C) y un tiol (B o C), liberando así uno de los tioles en el disulfuro original (por ejemplo, cisteamina, panteteína o un compuesto degradable a cisteamina).

Se pueden utilizar diversos agentes reductores para promover la reducción de disulfuros, o el intercambio de tiol-disulfuro, en el tracto gastrointestinal. Los agentes reductores pueden reducir directamente los precursores de cisteamina disulfuro o pueden reducir otros disulfuros, tal como el disulfuro de glutatona, que a su vez reducen los precursores de cisteamina disulfuro o participan en intercambios de tiol-disulfuro. En algunas realizaciones, se pueden usar compuestos fisiológicos (es decir, sustancias que normalmente se encuentran en el cuerpo) o compuestos derivados de alimentos con capacidad reductora para promover la reducción de precursores de cisteamina disulfuro, o para promover reacciones de intercambio de tiol-disulfuro. Se pueden utilizar agentes reductores fisiológicos tales como los tioles glutatona o cisteína (ambos presentes en el intestino delgado como resultado de la secreción de bilis y enterocitos), así como otros compuestos normalmente presentes en el cuerpo y en los alimentos, tal como el ácido ascórbico (vitamina C), los tocoferoles (vitamina E) o el ácido ditiol dihidrolipoico, un potente agente reductor. También se pueden utilizar otros agentes reductores ampliamente disponibles, incluidos tioles tal como N-acetilcisteína y no tioles tal como el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), así como cualquier tiol enumerado en la Figura 17. Los agentes reductores preferidos incluyen aquellos que se sabe que son seguros en las dosis necesarias para producir un cambio en el entorno redox gastrointestinal local. Se pueden requerir hasta varios gramos de agente reductor por período de dosificación, por ejemplo 0,5 - 5 gramos. Los precursores de cisteamina disulfuro que pueden beneficiarse de la coadministración de agentes reductores se muestran en la Figura 13. En particular, los compuestos 1-3 pueden beneficiarse de la coadministración o, en momentos apropiados, de la administración posterior de uno o más agentes reductores, como se describe aquí. Se pueden combinar dos o más agentes reductores. Preferiblemente, los agentes reductores tienen una masa molecular menor que 300 Daltons.

Los seres humanos adultos producen entre 400 y más de 1000 mililitros (ml) de bilis diariamente; se ha estimado que 750 ml es el volumen promedio (Boyer, *Compr. Physiol.* 3:32 (2013)). La bilis se produce en el hígado a lo largo del día. Una parte se almacena en la vesícula biliar, mientras que el resto proporciona un flujo lento y constante de bilis, incluso en estado de ayuno (la bilis cumple una función excretora además de ayudar en la digestión y la absorción de grasas). Una comida estimula la secreción duodenal de las hormonas peptídicas secretina y colecistoquinina, que estimulan la producción de bilis y la contracción de la vesícula biliar, respectivamente. La concentración de tioles en la bilis es aproximadamente 4 mM, y se compone principalmente por glutatona, pero también incluye gamma-glutamilcisteína, cisteinilglicina y cisteína (Eberle et al., *J Biol. Chem.* 256:2115 (1981); Abbott y Meister, *J. Biol. Chem* 258:6193 (1984)).

La cisteína y, en menor medida, el glutatona también son segregadas en la luz del tracto gastrointestinal por los enterocitos para regular el potencial redox luminal. Se ha medido directamente la concentración de tiol en el líquido intestinal del yeyuno de ratas, independientemente de las contribuciones de la bilis. Oscila de 60-200  $\mu$ M en ratas en ayunas y de 120-300  $\mu$ M en animales alimentados (Hagen et al., *Am. J. Physiol.* 259:G524 (1990); Dahm y Jones, *Am. J. Physiol.* 267:G292 (1994)). Además, a diferencia de la secreción biliar, el mantenimiento de los

niveles de tioril luminal es un proceso dinámico, de modo que los aumentos en los niveles intestinales de moléculas oxidadas (tales como los precursores de cisteamina disulfuro) pueden ser contrarrestados, al menos en cierta medida, por el aumento de la producción de cisteína por los enterocitos (Dahm y Jones, J. Nutr. 130:2739 (2000)). El intestino delgado humano segrega alrededor de 1,8 litros de líquido por día, y el colon alrededor de 0,2 litros, para un total de alrededor de 2 litros. La concentración de tioles (principalmente cisteína) en el líquido segregado varía según la región del tracto gastrointestinal, el potencial redox luminal y la dieta.

La concentración total de tioles gastrointestinales (tanto los derivados de la bilis como de los enterocitos) afectará la velocidad y el grado de reducción del enlace de disulfuro y/o el intercambio tioril-disulfuro necesario para convertir los precursores de cisteamina en tioles, que es la primera etapa necesaria en su degradación a cisteamina. La cantidad de equivalentes reductores disponibles en el tracto gastrointestinal superior después de una comida se puede estimar haciendo algunas suposiciones. Por ejemplo, si suponemos que (i) se segregan 200 ml de bilis en la hora siguiente a una comida abundante, y otros 100 ml en las 2-3 horas siguientes, y (ii) la concentración de tioril en la bilis es 4 mM, entonces los miliequivalentes de poder reductor de tioril en la bilis ascienden a  $0,3 \text{ l} \times 0,004 \text{ moles/l} = 0,0012 \text{ moles de tioril (1,2 milimoles)}$ . Supongamos además que los enterocitos del intestino delgado segregan 400 mililitros adicionales durante las cuatro horas posteriores a una comida, con una concentración de tioril de 200  $\mu\text{M}$ , lo que proporciona  $0,4 \text{ litros adicionales} \times 0,0002 \text{ moles/litro} = 80 \text{ micromoles de tioles luminiales}$ . Combinado con tioles biliares, se dispone de un total de  $\sim 1,28 \text{ milimoles}$  para reducir los disulfuros de la dieta y mantener el potencial redox intestinal. Esta no es una estimación del límite superior de la secreción de tioles, que puede ser considerablemente mayor, sino de los niveles normales de tioles en el intestino delgado en las horas posteriores a una comida.

Una dosis de 0,5 gramos de disulfuro de cisteamina-(R)-panteteína (MW: 353,52 g/l) contiene  $\sim 1,41 \text{ milimoles}$  de enlaces de disulfuro, y por lo tanto, en principio, podría convertirse en tioles (ya sea mediante reducción de enlaces de disulfuro o intercambio de tioril-disulfuro) mediante niveles endógenos de tioles (ignorando la necesidad de tioles luminiales para otros fines fisiológicos).

De manera más general, las dosis precursoras de cisteamina superiores a 1,25 milimoles pueden beneficiarse de la coadministración de un agente reductor exógeno. Muchos productos naturales, normalmente presentes en la dieta, pueden aportar poder reductor para facilitar la reducción del precursor de cisteamina o el intercambio tioril-disulfuro, incluidos los principales tioles intestinales endógenos cisteína o glutatión. También se pueden utilizar análogos de cisteína o glutatión, tales como N-acetilcisteína, éster etílico de N-acetilcisteína o amida de N-acetilcisteína. El ácido ascórbico es otro agente que puede reducir los enlaces de disulfuro (Giustarini et al. Nitric Oxide 19:252 (2008)). La dosis de ácido ascórbico necesaria para proporcionar un poder reductor equivalente a, por ejemplo, 1 gramo del precursor de cisteamina disulfuro, el disulfuro de cisteamina-(R)-panteteína, se puede calcular de la siguiente manera:

El peso molecular del ácido ascórbico (176,12 g/mol) es aproximadamente la mitad del disulfuro de cisteamina-(R)-panteteína, también conocido como compuesto 1 (353,52 g/mol). Por lo tanto, 1 gramo de ácido ascórbico tiene equivalentes reductores equimolares al número de enlaces de disulfuro en una dosis de 2 gramos del compuesto 1. Aunque la ingesta diaria de vitamina C recomendada por la Junta de Alimentos y Nutrición de Estados Unidos es de sólo 75 miligramos para las mujeres y 90 miligramos para los hombres, muchas personas toman dosis mucho más altas, incluidas dosis de 1 gramo por día o más, con aparentemente pocos o ningún efecto adverso.

Un razonamiento similar proporciona las cantidades de otros agentes reductores necesarias para igualar una dosis de compuesto 1 en términos molares. Por ejemplo, la cisteína (peso molecular: 121,15 Daltons) es alrededor del 34% de la masa del compuesto 1; N-acetilcisteína (peso molecular: 163,195 Daltons) es alrededor del 46% de la masa del compuesto 1; ácido alfa lipoico (peso molecular: 208,34 Daltons) es alrededor del 59% de la masa del compuesto 1, y así sucesivamente. El ácido alfa lipoico y la N-acetilcisteína están ampliamente disponibles en tiendas de vitaminas y en Internet en cápsulas y comprimidos de 600 y 1000 mg, respectivamente, incluidas las formulaciones de liberación sostenida, lo que indica su estado no regulado. Se pueden realizar cálculos similares para otros precursores de cisteamina disulfuro en función de su peso molecular.

Debido a que la bilis es la principal fuente de tioles y se diluye sucesivamente a lo largo del intestino delgado y grueso, el poder reductor adicional para la reducción del precursor de cisteamina puede ser más útil en el yeyuno, el íleon o el colon que en el duodeno. Por lo tanto, las formulaciones diseñadas para liberar agentes reductores en el intestino delgado distal y/o el intestino grueso pueden ser complementos particularmente útiles para los precursores de cisteamina disulfuro. Existen formulaciones de liberación sostenida de ácido ascórbico y otros agentes reductores disponibles comercialmente. Alternativamente, el ácido ascórbico podría coformularse con un precursor de cisteamina para asegurar la administración conjunta de ambos agentes.

Los potenciales electroquímicos (fuerza reductora) asociados con diferentes agentes reductores biológicos son conocidos, y proporcionan una guía para su uso; sin embargo, la capacidad de dichos agentes para reducir diferentes precursores de cisteamina disulfuro se determina mejor empíricamente.

La cinética de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro está fuertemente influenciada por el pH (es decir, se retarda si el pH es bajo). Estas reacciones de intercambio son un mecanismo alternativo a la reducción de enlaces de disulfuro para liberar cisteamina de un disulfuro mixto de cisteamina, o panteteína de un disulfuro de panteteína, y así sucesivamente. Para mejorar la cinética de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, los compuestos básicos pueden coadministrarse o coformularse con precursores de cisteamina disulfuro, de modo que estén disponibles en el momento y lugar en el que se necesiten. Los compuestos fisiológicos tal como el bicarbonato, presente en altas concentraciones en el jugo pancreático, pueden utilizarse para modular el pH gastrointestinal local.

Una etapa esencial en la conversión de muchos precursores de cisteamina en cisteamina es la enzima panteteinasa, codificada por los genes VNN1 y VNN2 en el hombre. La panteteína y los disulfuros de panteteína, incluida la pantetina, requieren esta enzima para producir cisteamina. La panteteinasa también es necesaria en última instancia para la generación de cisteamina a partir de compuestos convertibles en panteteína en el tracto gastrointestinal, tales como la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A, la coenzima A y análogos y derivados adecuados. Los niveles normales de panteteinasa en el tracto gastrointestinal pueden no ser adecuados para escindir cuantitativamente todas las moléculas de panteteína proporcionadas por las dosis farmacológicas. Para abordar esta restricción, los compuestos que inducen la expresión de panteteinasa se pueden coadministrar o coformular con precursores de cisteamina que contienen panteteína, o compuestos convertibles en panteteína, para aumentar la cantidad de panteteinasa en el tracto gastrointestinal en el momento y lugar en el que se necesita (es decir, cuando y donde la panteteína está presente). Los agentes que inducen la expresión de panteteinasas incluyen tanto sustancias fisiológicas, incluidos ciertos componentes alimentarios, como agentes farmacológicos, incluidos los fármacos aprobados por la FDA. Los inductores fisiológicos de VNN1 incluyen una variedad de sustancias que actúan a través de los factores de transcripción factor 2 relacionado con NF-E2 (más comúnmente conocido por el acrónimo Nrf2), receptor activado por el proliferador de peroxisomas alfa (PPAR alfa) y receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma (PPAR gamma).

Los factores que inducen la activación de Nrf2 (a través de la translocación al núcleo) incluyen tanto productos naturales como ciertos fármacos. Por ejemplo, el sulforafano, un isotiocianato presente en las verduras crucíferas, tales como el brócoli, las coles de Bruselas, el repollo y la coliflor, induce la expresión de VNN1 a través de Nrf2. Se pueden utilizar alimentos ricos en sulforafano (por ejemplo, brotes de brócoli) para inducir la expresión de panteteinasa, o se puede administrar sulforafano como sustancia pura en una composición farmacéutica. Ciertos tioles derivados de los alimentos, incluida la S-alil cisteína y el trisulfuro de dialilo (ambos presentes en las cebollas, el ajo y el extracto de ajo) también inducen Nrf2, y pueden incluirse en comidas administradas con precursores de cisteamina. Alternativamente, cada compuesto puede obtenerse en forma pura y administrarse en una composición farmacéutica. Los lípidos presentes en ciertos alimentos, incluidos algunos ácidos grasos poliinsaturados, grasas oxidadas, ácidos grasos omega-3 y el lípido natural oleiletanolamida (OEA), también inducen Nrf2 y/o PPAR alfa. Los alimentos ricos en grasas oxidadas incluyen las patatas fritas y otros alimentos fritos, que pueden coadministrarse con precursores de cisteamina que requieren la escisión por panteteinasa para generar cisteamina. Los ácidos grasos omega-3 están presentes en el pescado, y están disponibles en extractos de aceite de pescado y en forma pura para su uso en composiciones farmacéuticas.

Los ligandos de PPAR alfa naturales incluyen compuestos endógenos tales como el ácido araquidónico y sus metabolitos, incluido el leucotrieno B4, el ácido 8-hidroxieicosatetraenoico y ciertos miembros de la familia. Los ligandos farmacológicos del PPAR alfa incluyen los fibratos (por ejemplo, benzafibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato, fenofibrato, gemfibrozil), ácido piriníxico (Wy14643) y ftalato de di(2-etilhexilo) (DEHP). Cualquier ligando de PPAR alfa natural o sintético puede coformularse o coadministrarse con un precursor de cisteamina que requiera la escisión por panteteinasa para producir cisteamina. Para una revisión de los ligandos de PPAR, véase Grygiel-Gorniak, B. Nutrition Journal 13:17 (2014).

También se pueden utilizar agonistas de PPARG naturales y sintéticos para estimular la transcripción mediada por Nrf2 de los genes de panteteinasa VNN1 y/o VNN2. Los agonistas de PPARG de productos naturales incluyen ácido araquidónico y metabolitos que incluyen ácido 15-hidroxieicosatetraenoico (15(S)-HETE, 15(R)-HETE y 15(S)-HpETE), ácido 9-hidroxioctadecadienoico, ácido 13-hidroxioctadecadienoico, 15-desoxi-(delta)12,14-prostaglandina J2 y prostaglandina PGJ2, así como honokiol, amorfrutina 1, amorfrutina B y amorfastilbol. Otros productos naturales activan tanto PPARG como PPARA, incluidos la genisteína, la biocanina A, el ácido sargaquinoico, el ácido sargahidroquinoico, el resveratrol y el amorfastilbol. Los agonistas de PPARG de productos naturales se describen y revisan en Wang et al., Biochemical Pharmacology 92:73 (2014)). Los agonistas farmacológicos de PPAR gamma incluyen tiazolidindionas (también llamadas glitazonas, por ejemplo pioglitazona, rosiglitazona, lobeglitazona). El hemo, derivado de la carne roja, también induce la expresión de VNN1. Los agonistas de PPARA o PPARG que estimulan la expresión de panteteinasa pueden coadministrarse o coformularse con precursores de cisteamina que contengan panteteína o un compuesto degradable a panteteína en el intestino. Se pueden combinar dos o más inductores de la expresión de panteteinasa para mejorar la expresión o reducir la dosis de un solo agente.

Otra etapa importante para que la cisteamina esté biodisponible en todo el cuerpo es la absorción a través del epitelio intestinal. La captación de cisteamina desde la luz intestinal está mediada por transportadores, cuyos

niveles naturales pueden no ser lo suficientemente altos para transportar toda la cisteamina en la luz intestinal. En consecuencia, los compuestos que inducen la expresión de transportadores de cisteamina pueden coadministrarse o coformularse con precursores de cisteamina para mejorar la absorción de cisteamina. La cisteamina es transportada a través del epitelio intestinal por los transportadores de cationes orgánicos 1, 2 y 3 (codificados por los genes OCT1, OCT2 y OCT3, también denominados genes SLC22A1, SLC22A2 y SLC22A3) y posiblemente por otras proteínas transportadoras. Los inductores de la expresión del transportador de cationes orgánicos incluyen los factores de transcripción PPAR alfa y PPAR gamma, el receptor de pregnano X (PXR), el receptor de ácido retinoico (RAR) y (en el caso de OCT1) el receptor RXR, así como el receptor de glucocorticoides. En consecuencia, se pueden utilizar ligandos naturales o sintéticos de estos receptores para aumentar la expresión de OCT y, en consecuencia, mejorar la captación de cisteamina por las células epiteliales intestinales. Los agentes que estimulan la expresión del o de los transportadores de cisteamina pueden coadministrarse o coformularse con precursores de cisteamina de cualquier tipo.

La vida media de eliminación de la cisteamina en el cuerpo humano (tiempo desde la Cmax hasta la mitad de la Cmax después de un bolo intravenoso) es alrededor de 25 minutos. Parte de la dosis de cisteamina se transforma en una variedad de disulfuros, incluidos disulfuros mixtos con cisteína libre, con restos de cisteinilo de proteínas y con glutatona. Ninguna intervención farmacológica puede impedir ese modo de eliminación, y en cualquier caso, esa reserva de cisteamina permanece disponible para posteriores intercambios de disulfuro. Sin embargo, existe una ruta catabólica de la cisteamina que la transforma de forma irreversible y la elimina del organismo. La enzima cisteamina dioxigenasa, que oxida la cisteamina a hipotaurina, es un factor importante en la eliminación de cisteamina. La hipotaurina se oxida posteriormente a taurina. La coadministración de un precursor de cisteamina con uno o ambos de estos productos catabólicos puede retardar el catabolismo de la cisteamina mediante la inhibición del producto final. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un precursor de cisteamina se coformula, coadministra o administra en secuencia temporal óptima con hipotaurina y/o con taurina.

La Figura 13 muestra una clasificación de los precursores de cisteamina en función de sus constituyentes de tiol, la cantidad de moléculas de cisteamina que se pueden generar, las etapas metabólicas necesarias para generar cisteamina, los potenciadores potencialmente útiles de la generación de cisteamina *in vivo*, y los perfiles de liberación de cisteamina. Los compuestos que inducen una mayor expresión del o de los transportadores de cisteamina (no se muestran en la Fig. 13) son útiles para todos los tipos de precursores de cisteamina. Los compuestos que alcalinizan el contenido intestinal, y de ese modo promueven el intercambio tiol-disulfuro y/o la reducción del enlace de disulfuro (no se muestran en la Fig. 13), son útiles para los precursores de cisteamina disulfuro.

En resumen, la flexibilidad en el control de los niveles sanguíneos de cisteamina se puede lograr mediante la coformulación o coadministración de (i) uno o más precursores de cisteamina con propiedades seleccionadas, (ii) uno o más potenciadores de la degradación del precursor de cisteamina *in vivo* y/o la absorción de cisteamina, (iii) uno o más inhibidores del catabolismo de la cisteamina, utilizando (iv) uno o más tipos de formulación (por ejemplo, inmediata, retardada, sostenida, gastrorretentiva, o dirigida al colon, o una combinación) y (v) un programa de dosificación que permita la coadministración óptima de precursor o precursores y potenciador o potenciadores de cisteamina a segmentos específicos del tracto gastrointestinal en cantidades que se puedan degradar y absorber de manera efectiva. La consecuencia de la aplicación individualizada de estas herramientas es mantener los niveles sanguíneos de cisteamina en el intervalo terapéutico durante un período prolongado, lo que da como resultado un efecto farmacológico superior sobre la enfermedad en comparación con los compuestos y formulaciones existentes.

### Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones formuladas para lograr una concentración plasmática terapéuticamente eficaz de cisteamina durante un período prolongado de tiempo con el fin de: (i) reducir los efectos secundarios asociados con altas concentraciones máximas de cisteamina, (ii) reducir el subtratamiento causado por concentraciones mínimas subterapéuticas de cisteamina, y (iii) mejorar la comodidad del paciente y, por lo tanto, el cumplimiento de la terapia al reducir el número de dosis por día. Los compuestos y formulaciones de la invención también están diseñados para (i) proporcionar propiedades organolépticas mejoradas en comparación con las formulaciones de cisteamina existentes, (ii) reducir el contacto de la cisteamina libre con el epitelio gástrico, una fuente conocida de efectos secundarios gastrointestinales, (iii) minimizar la dosis de precursor de cisteamina requerida para lograr niveles terapéuticos de cisteamina en sangre haciendo coincidir la dosis y el sitio o sitios de administración con los procesos digestivos y de absorción relevantes en el tracto gastrointestinal, propósito que puede lograrse (iii) optimizando la descomposición y absorción del precursor de cisteamina mediante coformulación o coadministración con potenciadores de esos procesos.

Para las composiciones de la invención, se incluye un excipiente farmacéutico en todas las formulaciones, para evitar la exposición de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, en la boca. Los métodos de formulación para enmascarar sabores amargos u otros sabores desagradables incluyen recubrimientos, que pueden aplicarse en varias capas. También se pueden utilizar aromatizantes y colorantes. Se conocen en la técnica métodos para producir composiciones farmacéuticas con una sensación en boca y/o un sabor aceptables (por ejemplo, véanse

los libros de texto sobre formulación farmacéutica, citados en otra parte; la bibliografía de patentes también proporciona métodos para producir composiciones farmacéuticas organolépticamente aceptables (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. N.º 20100062988).

## 5 **Composiciones gastrorretentivas**

Una primera composición proporciona un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, en una formulación gastrorretentiva. En la técnica se conocen diversas tecnologías gastrorretentivas, varias de las cuales se han utilizado con éxito en productos comercializados. Para revisiones, véanse, por ejemplo, Pahwa et al., Recent Patents in Drug Delivery and Formulation, 6:278 (2012); y Hou et al., Gastric retentive dosage forms: a review. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 20:459 (2003).

Una formulación gastrorretentiva proporciona una liberación sostenida de un precursor de cisteamina en el estómago. Dependiendo del tipo de precursor de cisteamina, la posterior generación de cisteamina in vivo puede comenzar en el estómago o en el intestino delgado, que es el tejido desde el cual la cisteamina se absorbe más eficientemente. Algunos precursores de cisteamina pueden seguir convirtiéndose en cisteamina en el intestino grueso, incluso si se liberan de una composición farmacéutica en el estómago o el intestino delgado. Por ejemplo, los precursores de cisteamina disulfuro liberados en el estómago pueden permanecer predominantemente en estado oxidado en el ambiente ácido y oxidante del estómago y luego comenzar a liberar cisteamina después de encontrar agentes reductores (por ejemplo, glutatona biliar) en el intestino delgado. La composición gastrorretentiva producirá niveles elevados de cisteamina en sangre durante las horas 1 - 4 después de la ingestión, preferiblemente las horas 1-6, más preferiblemente las horas 1-8, las horas 1-10, o más.

Contrariamente a lo que se recomienda para el bitartrato de cisteamina (véase, por ejemplo, la Información de prescripción completa de Procysbi® de la FDA), las formulaciones gastrorretentivas de precursores de cisteamina deben administrarse con alimentos, preferiblemente con una comida que contenga suficiente contenido calórico y densidad de nutrientes para retardar el vaciamiento gástrico. Una comida rica en nutrientes activa los osmorreceptores y quimiorreceptores en el intestino delgado (y en menor medida en el estómago), lo que tiene el efecto de estimular señales neuronales y hormonales que disminuyen la motilidad gástrica, retrasando así el vaciamiento. Retrasar el vaciamiento gástrico es un mecanismo para prolongar el efecto de una composición gastrorretentiva. Sin embargo, llenar el estómago con un gran volumen de alimento o líquido tiende a promover la motilidad gástrica y acelerar el vaciado, por lo que la densidad de nutrientes es una propiedad más importante de una comida que el volumen. Los alimentos sólidos, que deben triturarse en pequeñas partículas en el antro y el píloro antes de vaciarse en el duodeno, prolongan la residencia gástrica en comparación con los alimentos líquidos o semilíquidos. Entre los alimentos líquidos, los líquidos de alta viscosidad pueden retardar el vaciamiento gástrico en comparación con los líquidos de baja viscosidad. Los alimentos con alto contenido osmótico activan los osmorreceptores duodenales para transmitir señales que retardan el vaciamiento gástrico. La liberación de precursores de cisteamina en el estómago (por ejemplo, de una formulación gastrorretentiva) puede aumentar la osmolaridad del contenido gástrico, y por ende del contenido duodenal.

En ciertas realizaciones, los precursores de cisteamina disulfuro son preferidos para formulaciones gastrorretentivas debido a que el entorno ácido y oxidante del estómago tiende a mantener los disulfuros en su forma oxidada, limitando así la exposición del epitelio gástrico a la cisteamina, que se cree que es una de las causas de la toxicidad de la cisteamina. Al ingresar al duodeno y mezclarse con la bilis, que contiene una alta concentración (milimolar) de glutatona, cisteína y otros agentes reductores, el disulfuro se reducirá, produciendo así tioles libres en un lugar en el que están expuestos a panteteinasas y en el que los transportadores de cisteamina se expresan en los enterocitos.

La presencia de grasa en el intestino delgado es el inhibidor más potente conocido del vaciamiento gástrico, y conduce a la relajación del estómago proximal y a la disminución de las contracciones en la región pilórica. Una vez que la grasa ha sido absorbida en el intestino delgado y ya no desencadena señales inhibitorias al estómago, la motilidad gástrica reanuda su patrón normal. Por lo tanto, las formulaciones gastrorretentivas pueden administrarse idealmente con comidas que contengan alimentos grasos. Las comidas ricas en proteínas también retardan el vaciamiento gástrico, pero en menor medida; y las comidas ricas en hidratos de carbono, aún menos.

Las composiciones gastrorretentivas también pueden administrarse con compuestos que retardan el vaciamiento gástrico, incluidos ciertos lípidos, por ejemplo, los ácidos grasos con al menos 12 átomos de carbono estimulan la liberación de colecistoquinina de las células enteroendocrinas, reduciendo la motilidad gástrica, mientras que los ácidos grasos con cadenas de carbono más cortas no son tan efectivos. En algunas realizaciones, un alimento o una comida pueden complementarse con ácidos grasos o triglicéridos que contienen ácidos grasos con cadenas de carbono de 12 o más (por ejemplo, ácido oleico, ácido mirístico, miristato de trietanolamina, una sal de ácido graso).

La grasa y las proteínas, cuando llegan al duodeno, estimulan la secreción de varias hormonas intestinales, incluidas la grelina, la colecistoquinina (CCK) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP1). La CCK retarda el vaciamiento gástrico al unirse al receptor CCK1 (abreviado CCK1R, anteriormente llamado receptor CCK-A). En



algunas realizaciones, agonistas o imitadores de CCK activos por vía oral, moduladores alostéricos positivos de CCK1R, o agentes que promueven la liberación de CCK endógena, o que inhiben la degradación de CCK, o que de otro modo prolongan la acción de CCK a través de alguna combinación de esos u otros mecanismos, se administran con composiciones gastrorretentivas para retardar el vaciamiento gástrico y prolongar la residencia gástrica de la composición gastrorretentiva. La CCK es un péptido que existe en varias formas que oscilan desde 8 aminoácidos hasta 53 aminoácidos (por ejemplo, CCK-8, CCK-53). La administración oral de los péptidos no es efectiva debido a que se digieren en el tracto gastrointestinal. Varios grupos de investigación han desarrollado y probado antagonistas de CCK de tipo moléculas pequeñas. Por ejemplo, SR-146,131 y compuestos relacionados fueron desarrollados por científicos de Sanofi (patentes de EE. UU. 5.731.340 y 6.380.230).

Ciertos inhibidores de proteasas inducen la producción o liberación de CCK, o prolongan su vida media, o potencian de otro modo su efecto, incluidas tanto las mezclas derivadas de alimentos como los compuestos puros. Por ejemplo, la ingestión de un concentrado de inhibidor de proteasas derivado de la patata se asocia con niveles elevados de CCK, al igual que la ingestión de peptona de soja y peptona beta-conglicina de soja. El camostat es un inhibidor sintético de proteasas con efectos pleiotrópicos, incluida la estimulación de la liberación de CCK endógena y la consiguiente desaceleración del vaciamiento gástrico. El mesilato de camostat es una sal farmacéutica que se ha utilizado ampliamente en el hombre. FOY-251 es un metabolito activo del camostat. En algunas realizaciones, un agente que estimula la producción o liberación de CCK, o prolonga la vida media de la CCK, o potencia de otro modo el efecto de la CCK, se coformula o coadministra con una composición gastrorretentiva en una cantidad que retarda el vaciamiento gástrico. En algunas realizaciones, camostat, FOY-251, o un profármaco, derivado o metabolito activo de camostat, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se coformula o coadministra con una composición gastrorretentiva en una cantidad que oscila entre 50 - 300 mg/kg, o entre 100 - 250 mg/kg.

El vaciamiento gástrico también se ralentiza por la acidificación del quimo. Por ejemplo, se ha demostrado que los ácidos cítrico y acético retrasan el vaciamiento gástrico. En algunas realizaciones, el alimento o una comida incluye una fuente natural de ácido cítrico (por ejemplo, fruta o zumo de naranja, limón, lima, pomelo u otra fruta rica en cítricos) o ácido acético (por ejemplo, vinagre, encurtidos u otras verduras encurtidas) o ácido láctico (por ejemplo, chucrut o kimchi). En algunas realizaciones, se administra una cantidad de alimento o líquido ácido suficiente para reducir el pH del quimo gástrico por debajo de pH 4 o por debajo de pH 3,5 con una composición gastrorretentiva.

El péptido 1 similar al glucagón (GLP1) es otra hormona intestinal que liberan las células del duodeno en respuesta a los alimentos, particularmente a la grasa ingerida, y que influye en el vaciamiento gástrico. Varios grupos de investigación han descubierto agonistas del receptor GLP1 administrados por vía oral (por ejemplo, Sloop et al., Diabetes 59:3099 (2010)). Los moduladores alostéricos positivos del receptor GLP1, que no son agonistas en sí mismos pero que potencian GLP1 endógeno, son otra categoría de agentes estimulantes del GLP1R (por ejemplo, Wootten et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 336:540 (2011); Eng et al., Drug Metabolism and Disposition 41:1470 (2013); véanse también las publicaciones de patentes de EE. UU. núms. 20060287242, 20070021346, 20070099835, 20130225488 y 20130178420). Entre los compuestos que modulan positivamente la señalización del receptor GLP-1 en presencia de GLP1 endógeno se encuentra la quercetina, que actúa uniéndose a un sitio alostérico en el receptor GLP-1 e influyendo positivamente en la señalización del receptor tras la unión de ligandos endógenos (GLP-1, un péptido, está presente en varias formas). Algunos análogos de quercetina también son moduladores positivos de GLP1 endógeno. La quercetina es un flavonol presente en muchas frutas, verduras, hojas y cereales. Se utiliza como ingrediente en suplementos para la salud, bebidas y alimentos. En algunas realizaciones, un agonista del receptor GLP-1 o un modulador alostérico positivo de GLP-1 se coformula o coadministra con una composición gastrorretentiva en una cantidad suficiente para retrasar el vaciamiento gástrico. En algunas realizaciones, el agonista del receptor GLP-1 o modulador alostérico positivo es quercetina, o un análogo, derivado o metabolito activo de la quercetina. Ciertos fármacos de moléculas pequeñas también pueden retardar el tiempo de vaciamiento gástrico, y pueden coadministrarse o coformularse con composiciones gastrorretentivas.

El vaciamiento gástrico también se ralentiza por la acidificación del quimo. Por ejemplo, se ha demostrado que los ácidos cítrico y acético retrasan el vaciamiento gástrico. En algunas realizaciones, un alimento o una comida incluye una fuente natural de ácido cítrico (por ejemplo, naranja, pomelo u otras frutas ricas en cítricos) o ácido acético (por ejemplo, vinagre, encurtidos u otras verduras encurtidas) o ácido láctico (por ejemplo, chucrut o kimchi). En algunas realizaciones, el pH del quimo se reduce por debajo de 4 o por debajo de 3,5 mediante la administración de alimentos o líquidos ácidos con una composición gastrorretentiva.

La patente de EE. UU. 8.741.885 describe un método para prolongar la retención gástrica de una composición farmacéutica gastrorretentiva (por ejemplo, una composición flotante, hinchable o mucoadhesiva) combinando un ingrediente farmacéutico activo con un opioide. El propósito del opioide coformulado es retardar el vaciamiento gástrico. La gastroparesia, o motilidad gastrointestinal gravemente deprimida, es una complicación bien conocida y potencialmente grave de la terapia con opioides.

#### **Composiciones de liberación sostenida**

Una segunda composición proporciona un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, en una formulación de liberación sostenida no gastrorretentiva. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica: Wen, H. y Park, K. (editores) *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. Wiley, 2010; Augsburger, L.L. y Hoag, S.W. (editores) *Pharmaceutical Dosage Forms - Tablets*, volume 3: Manufacture and Process Control. CRC Press, 2008. El componente de liberación sostenida puede ser un comprimido, un polvo, o una cápsula llena de micropartículas. Opcionalmente, las partículas pueden variar en tamaño, en composición (por ejemplo, el tipo o concentración de un polímero de liberación sostenida), o en el tipo o grosor de un agente de recubrimiento, o en el número y composición de capas si están recubiertas con múltiples capas de agentes de recubrimiento, de modo que el fármaco se libera a diferentes velocidades, o en diferentes tiempos de inicio, a partir de partículas individuales, proporcionando así, en conjunto, la liberación del fármaco durante un período de tiempo prolongado en comparación con una formulación en la que todas las partículas son sustancialmente idénticas. La formulación de liberación sostenida puede recubrirse opcionalmente con un material sensible al pH que evita la disolución en el estómago (denominado recubrimiento entérico). Las micropartículas de una sola composición pueden variar en el tipo o grosor de uno o más agentes de recubrimiento. Por ejemplo, el pH al que se disuelve el recubrimiento puede variar. Las dos o más micropartículas utilizadas en dichas composiciones mixtas pueden fabricarse por separado según especificaciones estrictas y después mezclarse en una relación que permita lograr una liberación prolongada del fármaco *in vivo*.

Una composición de liberación sostenida puede proporcionar una liberación prolongada del precursor de cisteamina en el estómago y/o el intestino delgado (no el primero si tiene recubrimiento entérico), y en consecuencia una generación sostenida de cisteamina *in vivo*. Se puede diseñar una formulación de liberación sostenida para liberar el fármaco durante un período de tiempo aproximadamente igual a la suma de los tiempos promedio de tránsito gástrico y del intestino delgado, por ejemplo 3-5 horas si se administra en ayunas o 5-8 horas si se administra con alimentos o con una comida. Alternativamente, la formulación de liberación sostenida puede diseñarse para liberar el fármaco durante más tiempo que la suma de los tiempos promedio de tránsito del estómago y del intestino delgado, a fin de continuar liberando precursores de cisteamina en el intestino grueso. En algunas realizaciones, dicha composición de liberación sostenida puede liberar un precursor de cisteamina durante entre 4-8 horas cuando se administra en ayunas o entre 6-10 horas, o más, cuando se administra con una comida.

La formulación de liberación sostenida puede producir niveles elevados de cisteamina en sangre durante las horas 1-4 después de la ingestión, preferiblemente las horas 1-6, más preferiblemente las horas 1-8, aún más preferiblemente las horas 1-10 o más. Las formulaciones de liberación sostenida de precursores de cisteamina pueden administrarse con alimentos o entre comidas, y opcionalmente con potenciadores de la degradación del precursor de cisteamina o de la absorción de cisteamina. Los alimentos tienden a inhibir la absorción de cisteamina libre, particularmente los alimentos grasos, y generalmente se recomienda ingerir sales de cisteamina con el estómago vacío, aunque se permiten pequeñas cantidades de puré de manzana o alimentos similares.

#### **Formulaciones mixtas**

Algunas composiciones tienen necesariamente elementos de dos tipos de formulación, una dirigida principalmente a controlar la velocidad de liberación del fármaco y la otra dirigida principalmente a controlar el sitio anatómico de liberación del fármaco. Por ejemplo, las formulaciones gastrorretentivas siempre contienen el fármaco en una formulación de liberación sostenida; de lo contrario, no tendría sentido una residencia gástrica prolongada. Sin embargo, existen formas de combinar componentes de liberación inmediata y sostenida en una única formulación gastrorretentiva. Por ejemplo, el componente de liberación inmediata puede formar una capa externa que se disuelve rápidamente o que se disgrega rápidamente en el estómago, dejando un componente central de liberación sostenida que permanece en el estómago mediante uno o más de los mecanismos gastrorretentivos descritos aquí. Sin embargo, no todos los tipos de formulaciones pueden combinarse productivamente. Por ejemplo, una formulación gastrorretentiva con recubrimiento entérico sería contraproducente porque las formulaciones gastrorretentivas están diseñadas para liberar el fármaco en el estómago, y la liberación gástrica estaría bloqueada por un recubrimiento resistente a la disolución en un medio ácido.

Las composiciones con diferentes perfiles de liberación de fármaco anatómicos o temporales pueden, cuando se combinan con precursores de cisteamina adecuados, y opcionalmente con potenciadores de la generación o absorción de cisteamina, proporcionar niveles de cisteamina en sangre en el intervalo terapéutico durante 0,5 - 6 horas, más preferiblemente 0,5 - 8 horas, y lo más preferible 0,5 - 12, 0,5 - 15 horas o más. A continuación se presentan ejemplos de combinaciones productivas de formulaciones, incluidas formulaciones mixtas con hasta dos componentes de liberación de fármaco, y composiciones formuladas por separado que se pueden combinar en diversas cantidades y relaciones para adaptar la cantidad y el momento de la generación y absorción de cisteamina *in vivo* a las necesidades de un paciente individual.

Una tercera composición proporciona una formulación mixta de un primer componente con recubrimiento entérico formulado para la liberación retardada de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, en el intestino delgado; y un segundo componente de micropartículas con recubrimiento entérico formulado para la liberación sostenida de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, en todo el intestino delgado y la parte proximal del intestino grueso. La formulación mixta proporciona un primer componente para lograr inicialmente niveles elevados de

cisteamina en la sangre, mientras que el segundo componente mantiene los niveles de cisteamina en la sangre a lo largo del tiempo.

Una cuarta composición proporciona una formulación mixta que incluye (i) una formulación gastrorretentiva de liberación sostenida de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, (ii) una formulación de liberación inmediata de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, diseñada para liberar el fármaco en el estómago. El segundo componente de la formulación mixta se encuentra en la superficie exterior de la composición, y comienza a disolverse inmediatamente al entrar en contacto con el contenido del estómago. Es el primero en generar cisteamina, aunque no necesariamente en el estómago. El primer componente (gastrorretentivo) proporciona una liberación prolongada del precursor de cisteamina en el estómago y la consiguiente generación de cisteamina in vivo en todo el intestino delgado y, dependiendo de las características del precursor de cisteamina, en el intestino grueso. La generación y absorción in vivo combinadas de cisteamina a partir de los dos componentes comienza dentro de 1 hora después de la administración de la composición mixta, y continúa durante al menos 5 horas, permaneciendo preferiblemente dentro del intervalo de concentración terapéutica durante 8, 10, 12 o más horas.

En una quinta composición, un primer componente está formulado para liberación inmediata en el estómago, e incluye un precursor de cisteamina, preferiblemente un disulfuro mixto de cisteamina o un disulfuro de panteteína, o una sal del mismo, y un segundo componente está formulado para liberación sostenida de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo. El primer componente está en la superficie exterior de la composición, de modo que el segundo componente permanece intacto después de la disolución o disgregación del primer componente. La formulación mixta de esta quinta composición puede producir una elevación inicial de la concentración plasmática de cisteamina del componente de liberación inmediata y mantener niveles elevados de cisteamina del segundo componente (liberación sostenida), con una producción continua de cisteamina in vivo durante 6 horas, 8 horas, 10 horas o más. La liberación de un precursor de cisteamina (o varios precursores de cisteamina diferentes) a lo largo del tracto gastrointestinal, desde el estómago hasta el intestino grueso, permite que la cantidad de precursor de cisteamina se adapte a los niveles de panteteinasa y transportadores de cisteamina en todos los segmentos del intestino, maximizando así la generación y absorción de cisteamina. La generación y absorción intestinal continua de cisteamina evita la dependencia de una C<sub>max</sub> alta para prolongar la exposición, disminuyendo así los efectos secundarios de la cisteamina asociados con niveles máximos altos. Por lo tanto, las formulaciones mixtas de precursores de cisteamina permiten la administración de cisteamina a numerosos trastornos que son sensibles a los efectos de la cisteamina.

En una sexta composición, un primer componente está formulado para liberación inmediata en el estómago, e incluye un precursor de cisteamina, preferiblemente un disulfuro mixto de cisteamina o un disulfuro de panteteína, o una sal del mismo; un segundo componente está formulado para la liberación de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo en el íleon y/o el colon. La formulación mixta de esta sexta composición puede producir una elevación inicial de los niveles de cisteamina plasmática del componente de liberación inmediata, y una segunda elevación de los niveles de cisteamina plasmática del componente dirigido al íleon y al colon alrededor del momento en que el primer pico está disminuyendo rápidamente. El segundo componente puede comenzar a liberar el precursor de cisteamina cuatro a ocho horas después de la administración, dependiendo de si se administró con o sin alimentos. La liberación controlada de un precursor de cisteamina (o diferentes precursores de cisteamina) a lo largo del tracto gastrointestinal, desde el estómago hasta el intestino grueso, permite que la cantidad de precursor de cisteamina se adapte a los niveles de panteteinasa y transportadores de cisteamina en todos los segmentos del intestino para maximizar la generación y absorción de cisteamina.

### **Compuestos**

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la invención incluyen uno o más precursores de cisteamina, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las sales de la invención pueden incluir, sin limitación, sales de metales alcalinos, por ejemplo sodio, potasio; sales de metales alcalino-térreos, por ejemplo calcio, magnesio y bario; y sales de bases orgánicas, por ejemplo bases de amina y bases inorgánicas. Se pueden encontrar sales ejemplares en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17.<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, 1985, pág. 1418, Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1 (1977), y Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl y C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008.

Las composiciones de la invención pueden incluir un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, en un componente de una formulación gastrorretentiva o mixta para lograr concentraciones plasmáticas de cisteamina en el intervalo terapéutico dentro de las primeras 4 horas después de la administración, preferiblemente dentro de las primeras 2 horas después de la administración, y más preferiblemente dentro de la primera hora. La concentración plasmática de cisteamina permanece preferiblemente en el intervalo terapéutico durante al menos 5 horas, preferiblemente 6 horas, más preferiblemente 8 horas, 10 horas o más. La formulación puede incluir un precursor de cisteamina tiol que puede degradarse enzimáticamente para producir cisteamina, tal como panteteína, o un compuesto que puede degradarse a panteteína (y de ahí a cisteamina) en el tracto gastrointestinal, tal como 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, o derivados o profármacos de los mismos que pueden degradarse a panteteína en el tracto gastrointestinal (y luego a cisteamina). Alternativamente, el precursor de

cisteamina se puede formar haciendo reaccionar cisteamina, o un compuesto que se puede degradar para producir cisteamina, con otro compuesto organoazufrado que contiene tiol para formar un compuesto de disulfuro. Un precursor de cisteamina disulfuro, o una sal del mismo, se puede formar haciendo reaccionar la cisteamina con un precursor de cisteamina tiol tal como panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A o N-acetilcisteamina, o haciendo reaccionar la cisteamina con otros tioles, incluyendo N-acetilcisteína (NAC), amida de N-acetilcisteína, éster etílico de N-acetilcisteína, homocisteína, glutatona (GSH), alil mercaptano, furfuril mercaptano, bencil mercaptano, tioterpineol (mercaptano de pomelo), 3-mercaptopiruvato, L-cisteína, éster etílico de L-cisteína, éster metílico de L-cisteína, tiocisteína, cisteinilglicina, gamma-glutamilcisteína, éster etílico de gamma-glutamilcisteína, éster monoetilico de glutatona, éster dietílico de glutatona, mercaptoetilgluconamida, ácido tiosalicílico, tiopronina o ácido dietilditiocarbámico. Los precursores de cisteamina tiol, o cisteamina, también pueden reaccionar con ditioles como el ácido dihidrolipoico, el ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), el ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico (DMPS), el 2,3-dimercapto-1-propanol (dimercaprol), la buclamina o la N,N'-bis(2-mercaptoetil)isofotalamida (BDTH<sub>2</sub>), para formar precursores de cisteamina disulfuro. Véase la Figura 17 para obtener una lista de tioles que se pueden usar para formar precursores de cisteamina disulfuro, y las Figuras 18 a 21 para obtener tablas que resumen pares de tioles que se pueden unir para formar precursores de cisteamina disulfuro. En la técnica se conocen otros tioles adecuados para formar precursores de cisteamina. Por ejemplo, la publicación de patente PCT n.º WO 1993006832 describe tioles útiles adicionales no incluidos en la Figura 17, incluidos N,N-dimetilcisteamina, tiocolina, aminopropanotiol, aminobutanotiol y aminopentanotiol, entre otros.

Los disulfuros formados pueden retrasar la liberación de cisteamina en el estómago y/o facilitar su generación y absorción in vivo en el intestino delgado, dependiendo de las propiedades del precursor de cisteamina utilizado (por ejemplo, el número de etapas degradativas necesarias para formar cisteamina). La Figura 13 muestra una clasificación de los precursores de cisteamina, y resume propiedades farmacológicamente relevantes seleccionadas. Las Figuras 18 - 21 proporcionan información sobre el rendimiento de cisteamina de muchos precursores de cisteamina disulfuro. El estómago es generalmente un ambiente más oxidante y más ácido que el intestino delgado. Cuando el contenido gástrico pasa al duodeno se mezcla con el jugo pancreático, que contiene bicarbonato que neutraliza el ácido del estómago, y con la bilis, que contiene el agente reductor fisiológico glutatona en concentraciones milimolares, así como tioles relacionados, incluida la cisteína. En consecuencia, los disulfuros tienden a permanecer oxidados en el estómago, y tienen más probabilidades de reducirse o de participar en reacciones de intercambio de disulfuro con tioles en el intestino delgado. Las reacciones de intercambio de disulfuro generalmente son catalizadas por el ion tiolato, que es mucho más nucleófilo que la forma tiol; la formación de iones tiolato no se ve favorecida en el entorno ácido del estómago.

Por ejemplo, la panteteína, un precursor de cisteamina tiol, puede formar un disulfuro homodimérico en el que dos panteteínas están unidas covalentemente para formar una pantetina (un precursor de cisteamina disulfuro). En algunas realizaciones preferidas, el precursor de cisteamina proporciona más de una cisteamina, como la proporcionada, por ejemplo, por los disulfuros de cisteamina mixtos formados al unir cisteamina con panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, o por los disulfuros de panteteína mixtos correspondientes formados al oxidar panteteína con 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A, o un profármaco o análogo adecuado convertible al compuesto original en el tracto gastrointestinal. Además, la 4-fosfopanteteína se puede unir mediante enlaces de disulfuro a la desfosfo-coenzima A o a la coenzima A, o la desfosfo-coenzima A se puede unir mediante enlaces de disulfuro a la coenzima A para producir precursores de cisteamina capaces de producir dos cisteaminas in vivo. La Figura 13 muestra la cantidad de cisteaminas que se pueden generar in vivo a partir de diferentes clases de precursores de cisteamina. Las Figuras 18 - 21 muestran precursores específicos de cisteamina disulfuro; aquellos que producen dos cisteaminas in vivo se enumeran en la parte superior de las tablas y también se muestra el rendimiento fraccional de cisteamina (en porcentaje) para cada disulfuro, así como el número de etapas degradativas necesarias para producir cisteamina. En algunas realizaciones, el grupo tiol reactivo de cisteamina o un organoazufre puede modificarse para incluir un sustituyente tal como un grupo acetilo, un grupo éster, glutamilo, succinilo, fenilalanilo, polietilenglicol (PEG) y/o un folato.

En realizaciones preferidas, la composición de la invención puede incluir una panteteína, un disulfuro que contiene panteteína, o una sal de la misma, en un componente de la formulación gastrorretentiva y/o un componente de una formulación mixta para mantener niveles elevados de cisteamina en sangre durante 5-10 horas después de la administración o más. La composición puede ser un precursor de cisteamina que requiere reducción química o conversión enzimática del compuesto original en al menos una cisteamina, retrasando así la liberación de cisteamina. La formulación puede incluir panteteína, o un compuesto que puede degradarse a panteteína en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A; colectivamente precursores de panteteína), en el que el grupo tiol de panteteína, o un precursor de panteteína, reacciona con un grupo tiol de otro compuesto de organoazufre para formar un compuesto de disulfuro. Dado que la panteteinasa se expresa en niveles más altos en el intestino que en el estómago, y la luz del intestino delgado es un entorno más reductor que el estómago, el componente de panteteína de un precursor de cisteamina disulfuro puede convertirse en cisteamina y posteriormente absorberse en el intestino delgado. Por ejemplo, la panteteína puede formar un disulfuro homodimérico en el que dos panteteínas están unidas covalentemente para formar una pantetina. Los precursores de cisteamina que contienen panteteína también pueden incluir disulfuros mixtos de panteteína, en los que el tiol de panteteína reacciona con un grupo tiol para formar un disulfuro. En realizaciones preferidas, el precursor de panteteína proporciona más de una cisteamina, como la proporcionada, por ejemplo,

por el disulfuro mixto formado a partir de cisteamina y panteteína, que cuando se reduce y posteriormente se escinde por panteteinasa produce 2 cisteaminas y un ácido pantoténico; o por el disulfuro mixto de panteteína-coenzima A, que cuando se reduce y posteriormente se degrada y después se escinde por panteteinasa produce 2 cisteaminas, 2 ácidos pantoténicos y ADP. En las Figuras 18 - 21 se muestran otros precursores de cisteamina disulfuro que producen dos cisteaminas tras su degradación en el intestino. En algunas realizaciones, el grupo tiol reactivo de la panteteína o un compuesto de organoazufre puede modificarse para incluir un sustituyente tal como un grupo acetilo, éster metílico, éster etílico, glutamilo, succinilo, fenilalanilo, polietilenglicol (PEG) y/o un folato.

La distinción entre los precursores de cisteamina que requieren la escisión por panteteinasa para generar cisteamina y los precursores de cisteamina que requieren sólo una reducción química para generar cisteamina (disulfuros mixtos de cisteamina) es significativa debido a que la cinética de conversión del compuesto precursor a cisteamina es generalmente más rápida con la segunda categoría, siempre que exista un entorno reductor adecuado (o pueda crearse farmacológicamente) en el intestino. Se puede hacer una distinción adicional entre los precursores de cisteamina que requieren reducción seguida de escisión por panteteinasa (por ejemplo, pantetina) frente a los precursores de cisteamina que requieren primero reducción y después degradación a panteteína y luego escisión por panteteinasa (por ejemplo, 4-fosfopantetina, desfosfo-coenzima A o coenzima A que contiene disulfuros). Las etapas de degradación adicionales requeridas por la última clase de precursores de cisteamina disulfuro retardan y extienden el período de producción de cisteamina durante un período de tiempo más largo.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar de diversas maneras conocidas por una persona con conocimientos normales en la técnica de la síntesis química. Los métodos para preparar tioles, incluyendo cisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A o coenzima A y otros tioles (véase la Figura 17) son bien conocidos en la técnica. La coenzima A, la pantetina, la N-acetilcisteamina y el glutatona están disponibles comercialmente como suplementos dietéticos. La mayoría de los demás tioles de la Figura 17 están fácilmente disponibles en empresas químicas.

#### ***Síntesis de precursores de cisteamina***

Los presentes compuestos, incluidos los precursores de cisteamina tiol y disulfuro, se pueden preparar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles utilizando métodos y procedimientos conocidos en la técnica, como los descritos por Mandel et al., Organic Letters, 6:4801 (2004). Los métodos para fabricar pantetina se describen en las patentes de EE. UU. núms. 3.300.508 y 4.060.551. En las publicaciones de patentes japonesas números JP-A-S50-88215 y JP-A-S55-38344 se describen métodos para convertir panteteína líquida en una forma sólida. Se apreciará que cuando se dan condiciones de procedimiento típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, relaciones molares de agentes reaccionantes, disolventes, presiones, etc.), también se pueden utilizar otras condiciones de procedimiento a menos que se indique lo contrario. Las condiciones de reacción óptimas pueden variar según los reactivos o el disolvente particulares utilizados, pero dichas condiciones se pueden determinar por un experto en la técnica mediante procedimientos de optimización de rutina.

En realizaciones preferidas, la composición de la invención incluye uno o más precursores de cisteamina disulfuro. Los disulfuros, al ser formas oxidadas de tioles, se forman fácilmente a partir de los tioles constituyentes sin necesidad de reactivos o equipos costosos. Además, los disulfuros no están sujetos a la oxidación que puede limitar la estabilidad a largo plazo de los compuestos de tiol expuestos al aire. Por lo tanto, con respecto a la fabricación, el costo, el costo de almacenamiento, el transporte, y la conveniencia del paciente (es decir, la larga vida útil), las formas de disulfuro de los precursores de cisteamina son preferibles a las formas de tiol.

En algunas realizaciones, los precursores de cisteamina disulfuro mixto se sintetizan mediante la unión de dos tioles diferentes, formando tres productos de reacción: los tioles A y B pueden unirse para formar disulfuros A-A, A-B y B-B. Por ejemplo, los disulfuros formados mediante la reacción de cisteamina con panteteína incluyen: cisteamina-cisteamina (denominada cistamina), cisteamina-panteteína y panteteína-panteteína (denominada pantetina). Los tres compuestos son útiles para proporcionar cisteamina, y de hecho, las diferentes etapas involucradas en la conversión de cada compuesto en cisteamina pueden ser farmacológicamente beneficiosas al expandir el período de tiempo durante el cual se genera cisteamina in vivo mediante la reducción del enlace de disulfuro o mediante una combinación de etapas de reducción y degradación enzimática. Por lo tanto, la coformulación de los tres productos de oxidación sin purificación (excepto para eliminar los tioles que no reaccionaron y/o impurezas no deseadas tal como el disolvente) puede ser farmacológicamente útil. Esto es particularmente así cuando los dos tioles reaccionados son cada uno convertible en cisteamina (por ejemplo, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, N-acetilcisteína o análogos y profármacos adecuados), o cuando la propia cisteamina se hace reaccionar con un tiol convertible en cisteamina. En consecuencia, en ciertas realizaciones, los tres disulfuros formados al hacer reaccionar dos tioles diferentes, cada uno convertible en cisteamina (o uno de los cuales es cisteamina), se coformulan en una única composición. Este método de síntesis y formulación no requiere las etapas sintéticas más complejas ni las etapas de purificación posteriores a la síntesis necesarias para separar un disulfuro mixto de los dos disulfuros homodiméricos que se crean simultáneamente en la reacción de oxidación.

**(Por supuesto, los tioles que no hayan reaccionado y otras impurezas deben eliminarse antes de formular una composición farmacéutica).**

Las ventajas de fabricar y coformular una mezcla de tres disulfuros no se aprovechan tan plenamente en el caso de los precursores de cisteamina disulfuro obtenidos haciendo la reaccionar un tiol convertible en cisteamina con un segundo tiol no convertible en cisteamina. Por ejemplo, los tres disulfuros formados al hacer reaccionar panteteína con N-acetilcisteína (NAC) son: panteteína-panteteína (pantetina), panteteína-NAC y NAC-NAC. Los dos primeros compuestos son precursores de cisteamina, el tercero (NAC-NAC) no lo es. Sin embargo, NAC-NAC puede tener propiedades farmacológicas beneficiosas con respecto a la modulación del entorno redox intestinal, o propiedades médicas beneficiosas como consecuencia de proporcionar, tras la reducción química, dos moléculas de NAC. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los tres productos de disulfuro formados al hacer reaccionar cisteamina o un tiol convertible en cisteamina in vivo con un segundo tiol no convertible en cisteamina in vivo se coformulan en una única composición.

La relación esperada de productos de reacción cuando se oxidan dos tioles diferentes depende de la relación molar de los dos tioles, la concentración absoluta de los dos tioles, el pH y/o el entorno químico alrededor del grupo sulfhidrilo de cada tiol. Si la relación de tiol A a tiol B es 1:1, la relación molar esperada de los productos de reacción A-A, B-B, A-B es alrededor de: 1:1:2. (Pueden producirse desviaciones de la relación esperada como resultado de diferencias en los enlaces químicos adyacentes al tiol que pueden afectar, por ejemplo, la cinética de formación de enlaces de disulfuro, que puede verse influida por la electronegatividad del átomo unido al sulfhidrilo. Cualquier desviación se puede predecir o medir utilizando métodos conocidos en la técnica). La relación de los productos de reacción se puede alterar cambiando la relación molar de los dos tioles. Por ejemplo, para aumentar la proporción de A-A y A-B con respecto a B-B, la concentración molar de tiol A puede aumentarse con respecto a la de tiol B. Cuando se hacen reaccionar dos tioles, uno de los cuales es cisteamina o un compuesto degradable a cisteamina (tiol A), y el otro un tiol no degradable a cisteamina (tiol B), la concentración molar del primer tiol puede aumentarse con respecto a la del segundo tiol para aumentar la proporción de precursores de cisteamina producidos. Por ejemplo, la reacción de los tioles A y B en una relación molar de 2:1 aumenta la proporción de A-A y A-B (ambos precursores de cisteamina) con respecto a B-B (no es un precursor de cisteamina).

En ciertas realizaciones, se puede promover la oxidación de dos tioles diferentes y/o alterar la mezcla de productos de reacción mediante la inclusión de un catalizador (revisado en Musiejuk y Witt (2015)). Por ejemplo, se puede añadir un oxidante como peróxido de hidrógeno o dimetilsulfóxido (DMSO), o un metal tal como cobre, manganeso o telururo, o yodo, azodicarboxilato de dietilo (o compuestos relacionados), o diclorodicianoquinona (DDQ). El rendimiento óptimo del catalizador se puede lograr determinando empíricamente el mejor sistema de disolvente, la concentración del catalizador y las condiciones de reacción.

En otras realizaciones, se puede producir un disulfuro asimétrico a través de una reacción de intercambio tiol-disulfuro entre un tiol y un disulfuro simétrico. Este tipo de reacción, al igual que la oxidación de dos tioles diferentes, proporciona una mezcla de todos los productos posibles (disulfuros simétricos y asimétricos). Sin embargo, al proporcionar un exceso molar del disulfuro simétrico sobre el tiol, se favorece la formación del disulfuro asimétrico, y puede incluso ser el principal producto de reacción en condiciones optimizadas. Los Ejemplos 15 y 16 describen la síntesis de disulfuro de panteteína-cisteamina mediante intercambio tiol-disulfuro. El método funciona con cisteamina como tiol y pantetina como disulfuro, y con panteteína como tiol y cisteamina como disulfuro. En realizaciones preferidas de la reacción de intercambio de tiol:disulfuro, la relación molar de tiol a disulfuro (por ejemplo, cisteamina:pantetina) está entre 2:1 y 4:1, entre 2,5:1 y 3,5:1, entre 2,7:1 y 3,3:1. En ciertas realizaciones, el disolvente es metanol, y el tiempo de reacción es entre 1 - 20 horas, o entre 1-12 horas, o entre 1 - 6 horas. En ciertas realizaciones, el producto de la reacción de intercambio tiol:disulfuro (por ejemplo, TTI-0102) se precipita posteriormente (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 17).

Alternativamente, en otra realización, la relación de precursores de cisteamina utilizados en una composición farmacéutica se puede ajustar combinando los tres productos de reacción de una reacción de oxidación de disulfuro mixto con un disulfuro puro. Por ejemplo, si los tioles cisteamina (C) y panteteína (P) se oxidan en una relación molar de 1:1, se combinarán para formar 3 productos: C-C, P-P y C-P en una relación de aproximadamente 1:1:2. Se puede añadir pantetina (P-P) pura a la mezcla en cualquier cantidad deseada para prolongar las propiedades de generación de cisteamina in vivo de la mezcla. Duplicar la cantidad inicial de pantetina daría como resultado una relación de 1:2:2. Añadir cuatro veces la cantidad inicial de pantetina daría como resultado una relación de 1:2:5.

También se pueden combinar dos productos de reacción de disulfuro mixtos generados independientemente para lograr nuevas proporciones de precursores de cisteamina. Por ejemplo, si los productos de reacción de cisteamina-panteteína (C-C, P-P y C-P) se combinan con una cantidad equimolar de productos de reacción de una reacción de oxidación de N-acetilcisteína (NAC) - cisteamina (C) (C-C, NAC-NAC y C-NAC en una relación de 1:1:2), la mezcla contendrá cinco compuestos, uno de los cuales, NAC-NAC, no se puede convertir en cisteamina. Los otros cuatro disulfuros, P-P, C-C, C-P, C-NAC, están presentes en una relación molar de aproximadamente 1:2:2:2. Opcionalmente, se puede añadir panteteína para obtener una relación de, por ejemplo, 2:2:2:2 (expresada de forma más sencilla como 1:1:1:1), o añadirse en mayor cantidad para obtener una relación de 1:1:1:5. Por lo tanto,

la relación molar de disulfuros en una composición farmacéutica se puede controlar mediante una variedad de métodos. En otro ejemplo, los productos de reacción de cisteamina-panteteína (C-C, P-P y C-P) pueden combinarse con una cantidad equimolar de productos de reacción de una reacción de oxidación de 4-fosfopanteteína (4P) - cisteamina (C) (es decir, C-C, 4P-4P y C-4P en una relación de 1:1:2), para producir una mezcla de cinco disulfuros en una relación de 1:1:1:2:2.

En resumen, cuando se oxida un tiol para formar un disulfuro precursor de cisteamina, sólo hay un producto (por ejemplo, panteteína + panteteína = pantetina). Al oxidar dos tioles se producen tres productos, de los cuales dos o tres son precursores de cisteamina, dependiendo de si uno o ambos tioles son degradables a cisteamina o son cisteamina. Las mezclas de precursores de cisteamina se preparan más fácilmente combinando los productos de estos dos tipos de reacciones. Las mezclas pueden incluir varias relaciones molares de disulfuro puro o mezclas de disulfuro de tres componentes. Sin embargo, los precursores de cisteamina heterodiméricos también pueden usarse en forma pura, después de la purificación, o combinados con otros precursores de cisteamina homodiméricos o heterodiméricos.

Alternativamente, mediante el uso de métodos químicos más sofisticados, se pueden sintetizar selectivamente disulfuros mixtos específicos (también denominados disulfuros asimétricos) (por ejemplo, la cisteamina y la panteteína se pueden combinar para formar sustancialmente sólo el disulfuro cisteamina-panteteína). Estos métodos emplean una amplia gama de grupos protectores de azufre y estrategias para su eliminación. El enfoque más utilizado implica la sustitución de un derivado de sulfenilo con un tiol o su derivado. Los derivados de sulfenilo comúnmente utilizados incluyen: cloruros de sulfenilo, tiosulfatos de S-alquilo y tiosulfatos de S-arilo (sales de Bunte), isotioureas de S-(alquilsulfanil)-2-ilo, disulfuros de benzotriazolilo, ditioperoxiésteres, sales de (alquilsulfanil)dialquilsulfonio, disulfuros de 2-piridilo y derivados, disulfuros de N-alquiltetrazolilo, sulfenamidas, sulfenildimesilaminas, tiocianatos de sulfenilo, 4-nitroarenosulfenilidas, tiolsulfonatos y tiolsulfonatos, sulfanilsulfonamidas, tionitritos, tiocarbonatos de sulfenilo, tioimidias, sales de tiofosfonio y disulfuros de 5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-ilo. Otros procedimientos incluyen: la reacción de un tiol con un sulfenilbenzimidazol, intercambio de disulfuro catalizado por rodio, métodos electroquímicos, y el uso de azodicarboxilato de dietilo. Estos y otros métodos son revisados por Musiejuk, M. y D. Witt. *Organic Preparations and Procedures International* 47:95 (2015). De esta manera, con un esfuerzo modesto se puede crear un disulfuro mixto (asimétrico) específico de interés. Los Ejemplos 1 y 2 proporcionan procedimientos sintéticos para disulfuros mixtos de la invención.

En todavía otras realizaciones, se puede sintetizar un disulfuro mixto a partir de un disulfuro simétrico acoplando preferentemente un sustituyente (por ejemplo, un grupo acilo) a un extremo del disulfuro simétrico (es decir, hemiacilación). Por ejemplo, dado que la cisteamina y la panteteína se diferencian por un resto de pantotenato, el disulfuro de cistamina puede ser hemiacilado por pantotenato para producir disulfuro de cisteamina-panteteína. Cuando se optimiza la concentración de reactivos y se añaden agentes de acoplamiento para facilitar la acilación, este procedimiento puede producir rendimientos superiores al 95 por ciento. La cistamina es un punto de partida atractivo para crear disulfuros asimétricos porque contiene grupos amino reactivos en ambos extremos. El Ejemplo 14 describe la síntesis eficiente de disulfuro de panteteína-cisteamina a través de la hemiacilación de cistamina por el sustituyente ácido pantoténico mediante un intermedio reactivo. En ciertas realizaciones, la relación molar del grupo acilo al disulfuro está entre 1:2 y 1:4. En ciertas realizaciones, la reacción de acilación se facilita mediante la adición de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en una relación molar de DCC:grupo acilo entre 3:1 y 5:1. En ciertas realizaciones, la reacción de acilación se facilita mediante la adición de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en una relación molar de HOBt:grupo acilo entre 1:1 y 1:3.

### ***Estereoquímica***

Algunos de los compuestos de la invención existen en más de una forma enantiomérica. En particular, la panteteína, la 4-fosfopanteteína, la desfosfo-coenzima A y la coenzima A contienen un carbono quiral en el resto de pantotenilo. Por tanto, cada uno de estos compuestos puede existir como enantiómero D o L, o como una mezcla racémica de los dos con respecto al grupo pantetenilo. Sin embargo, las panteteinasas humanas (codificadas por los genes VNN1 y VNN2) son específicas para la D-panteteína. (Bellussi et al., *Physiological Chemistry and Physics* 6:505 (1974)). Por lo tanto, sólo la D-panteteína (y no la L-panteteína) es un precursor de cisteamina, y en consecuencia, la presente invención se refiere sólo a la D-panteteína, y sólo a los enantiómeros D de 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A y cualquier análogo o profármaco convertible a esos compuestos en el tracto gastrointestinal. Del mismo modo, todos los disulfuros que contienen una panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A, o cualquier análogo o profármaco adecuado, sólo emplean el enantiómero D-.

Se prefiere el enantiómero L- de los aminoácidos y derivados de aminoácidos. Por lo tanto, "cisteína" aquí se refiere a L-cisteína, homocisteína a L-homocisteína, y los derivados de cisteína tales como N-acetilcisteína, amida de N-acetilcisteína, éster etílico de N-acetilcisteína, éster metílico de cisteína, éster etílico de cisteína, cisteinilglicina y gamma glutamil cisteína se forman todos utilizando el enantiómero L- de cisteína.

Para el ácido dihidrolipoico, se prefiere el enantiómero R, ya que es el enantiómero producido en el cuerpo humano. En general, para los compuestos que normalmente están presentes en el cuerpo humano o que están presentes en los alimentos, se prefiere el enantiómero natural.

## 5 **Formas de sal y cristalización**

Las propiedades farmacéuticas de cualquier compuesto, incluidos los precursores de cisteamina de la invención, pueden mejorarse mediante la asociación con un contraión o una sal. Las propiedades específicas que se pueden mejorar incluyen la estabilidad (por ejemplo, menos higroscópico, menos susceptible a la oxidación, más resistente al calor, la humedad y los valores extremos de pH), mejor tendencia a formar cristales, facilidad de formulación (por ejemplo, relacionada con las propiedades de las formas sólidas del compuesto, tales como los polvos).

El potencial de una forma de sal para mejorar las propiedades de cristalización de un compuesto es particularmente importante, ya que la cristalización es un método de purificación menos costoso, más rápido y más escalable que, por ejemplo, la cromatografía en columna. Se conocen en la técnica métodos para inducir la precipitación de moléculas pequeñas (por ejemplo, véanse las revisiones de Chen et al. y otros en *Crystal Growth and Design*, 11(4), 2011). La cristalización se puede inducir enfriando una disolución saturada de un compuesto diana, o mediante adición de un antidisolvente (un líquido en el que el compuesto diana es poco soluble) a una disolución del compuesto (Mostafa et al. *Chemical Engineering Science* 63: 5457-5467, 2008), o introduciendo una superficie que promueva la formación de cristales (por ejemplo, vidrio rayado), o mediante adición de semillas de cristales, o mediante adición de un compuesto que cocrystalizará con el compuesto diana (Korotkova y Karatchvil, *Procedia Chemistry* 10:473 - 476, 2014), incluidos polímeros (Edueng et al. *Journal of Controlled Release* 256:193-202, 2017). Los procedimientos de cristalización industrial pueden llevarse a cabo en formato discontinuo o, cada vez más, mediante procedimientos continuos (Zhang et al. *Engineering* 3: 354-364, 2017).

La cristalización se puede utilizar de dos maneras: el compuesto disulfuro de interés se puede cristalizar selectivamente en presencia de impurezas, que permanecen en disolución y por lo tanto se pueden eliminar fácilmente después de la cristalización, o una o más impurezas se pueden cristalizar mientras el compuesto de interés permanece en disolución. Los dos enfoques se pueden combinar secuencialmente (uno tras otro).

Dado que los precursores de cisteamina a menudo se administran en dosis relativamente grandes (más de 1 gramo por día, y posiblemente hasta diez gramos en adultos), cualquier sal debe ser segura. Por lo tanto, se prefieren las sales que son productos naturales, presentes en niveles significativos en la dieta, y con propiedades organolépticas agradables. Los ejemplos de dichas sales incluyen, sin limitación, acetato, citrato y tartrato. Las formas de sal de los precursores de cisteamina que inducen la formación de cristales pueden no solaparse con las formas de sal farmacéuticamente preferidas, en cuyo caso se puede producir específicamente una forma de sal para ayudar a la cristalización, después se puede redisolverse en disolvente, y la sal se puede cambiar a una sal farmacéuticamente preferida. Las sales grandes que tienden a promover la formación de cristales incluyen el benzoato y el naftoato (ácido naftoico).

## 40 **Métodos de separación**

La mayoría de las rutas sintéticas descritas anteriormente no son capaces de producir disulfuro mixto con una pureza mayor que 99 por ciento (es decir, en el intervalo requerido por los organismos reguladores de fármacos). La cristalización también puede no ser lo suficientemente selectiva para reducir las impurezas del fármaco a un nivel aceptable. Por lo tanto, también pueden requerirse métodos de separación robustos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, cualquier método sintético puede combinarse con un esquema eficiente para la separación del producto deseado (es decir, un precursor de cistamina disulfuro mixto) de otros compuestos producidos en la síntesis (incluidos otros disulfuros). Los métodos de separación útiles distintos de la cristalización incluyen una variedad de procedimientos cromatográficos, incluidas resinas que separan moléculas pequeñas en función del tamaño, la carga, la hidrofobia, la afinidad u otras características.

## **Formulaciones**

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los precursores de cisteamina, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o profármaco de los mismos, se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones se pueden preparar de diversas maneras bien conocidas en la técnica farmacéutica, y se pueden obtener de modo que liberen el fármaco en segmentos específicos del tracto gastrointestinal en tiempos controlados mediante una variedad de excipientes y tecnologías de formulación. Por ejemplo, las formulaciones pueden adaptarse para abordar una enfermedad específica, para lograr los niveles sanguíneos de cisteamina necesarios para lograr la eficacia terapéutica, para permitir una duración deseada del efecto del fármaco, y para proporcionar un conjunto de composiciones con diferentes características de liberación de fármaco que pueden administrarse en diferentes combinaciones para tener en cuenta la variación entre pacientes en el metabolismo de la cisteamina. La administración se realiza principalmente por vía oral, y puede complementarse con supositorios. Los precursores de cisteamina también pueden coformularse con agentes que mejoran la generación o absorción



de cisteamina in vivo, incluidos, por ejemplo, agentes reductores, amortiguadores, inductores de panteteinasa o inductores de la captación de cisteamina por las células epiteliales intestinales.

La composición farmacéutica puede contener uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Al preparar una composición farmacéutica para uso en un método de la invención, el precursor de cisteamina, la sal farmacéuticamente aceptable, el solvato o el profármaco del mismo normalmente se mezcla con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encierra dentro de dicho portador en forma de, por ejemplo, una cápsula, comprimido, bolsita, papel, vial u otro recipiente. El componente activo de la invención puede administrarse solo, o en una mezcla, en presencia de un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. El excipiente o portador se selecciona en función del modo y la vía de administración, la región del tracto gastrointestinal destinada a la liberación del fármaco, y el perfil temporal previsto para la liberación del fármaco. Cuando el excipiente actúa como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido (por ejemplo, disolución salina normal), que actúa como vehículo, portador, matriz u otro medio para el ingrediente activo. Así, las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos, polvos, gránulos, pastillas, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes y cápsulas de gelatina blandas y duras. Como se sabe en la técnica, el tipo y la cantidad de excipientes varían dependiendo de las características de liberación del fármaco previstas. Las composiciones resultantes pueden incluir agentes adicionales, tales como conservantes o recubrimientos.

Los portadores farmacéuticos adecuados, así como los productos farmacéuticos necesarios para su uso en formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.<sup>a</sup> edición, Gennaro, Ed., Lippencott Williams & Wilkins (2005), un conocido texto de referencia en este campo, y en la USP/NF (Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional) o documentos de referencia europeos o japoneses correspondientes. Ejemplos de excipientes adecuados son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, carbonato de calcio, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, derivados de celulosa, polivinilpirrolidona, ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, aceites vegetales, polietilenglicol, matriz inerte hidrófoba, carbómero, hipromelosa, gelucire 43/01, docusato de sodio, y cera blanca. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y propilo; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Otros excipientes ejemplares, y detalles de su uso, se describen en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6<sup>a</sup> edición, Rowe et al., Eds., Pharmaceutical Press (2009).

La composición farmacéutica puede incluir sales precursoras de cisteamina, opcionalmente coformuladas o coadministradas con otros agentes que mejoran la degradación in vivo de los precursores de cisteamina a cisteamina o mejoran la absorción intestinal de cisteamina. La composición farmacéutica también puede incluir otros agentes terapéuticos que complementen los efectos farmacológicos de la cisteamina en enfermedades específicas. Se proporcionan aquí potenciadores ejemplares de la producción o absorción de cisteamina in vivo, y agentes terapéuticos ejemplares que pueden incluirse en las composiciones descritas aquí.

Las composiciones de la invención pueden contener un único componente activo (es decir, un único precursor de cisteamina), o una combinación de un primer y un segundo componente activo en una única forma de dosificación unitaria, o una combinación de un primer, segundo, tercer y, opcionalmente, un cuarto componente activo y opcionalmente un quinto componente en una única forma de dosificación unitaria. En composiciones con dos componentes activos, ambos componentes pueden ser precursores de cisteamina, o un componente puede ser un potenciador de la producción de cisteamina in vivo (por ejemplo, un agente reductor que promueve la reducción de precursores de cisteamina disulfuro, o un agente que induce una mayor expresión intestinal de panteteinasa) o un potenciador de la absorción intestinal de cisteamina (por ejemplo, un agente que induce una mayor expresión de uno o más transportadores de cationes orgánicos, tales como OCT1, OCT2 u OCT3). En composiciones con tres o cuatro componentes activos, todos los componentes pueden ser precursores de cisteamina, o uno o dos componentes pueden ser potenciadores de la producción de cisteamina in vivo y/o de la absorción intestinal. En composiciones con dos o más precursores de cisteamina, los tipos de precursores de cisteamina se seleccionan para lograr la producción de cisteamina in vivo durante un período de tiempo sostenido. Por ejemplo, un precursor de cisteamina disulfuro mixto, que sólo requiere la reducción del enlace de disulfuro para generar una cisteamina, y por lo tanto comenzará a generar cisteamina poco después de alcanzar una región del tracto gastrointestinal con un entorno redox propicio para la reducción del enlace de disulfuro, se puede mezclar con panteteína, o con un disulfuro de panteteína, que requiere tanto la reducción del enlace de disulfuro como la escisión por panteteinasa para producir cisteamina, y opcionalmente también se puede combinar con un compuesto degradable a panteteína en el intestino, o un disulfuro que contenga dicho compuesto, que requiere etapas adicionales para generar panteteína y por lo tanto cisteamina. Los compuestos degradables a panteteína en el intestino incluyen 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A y análogos y derivados adecuados. El curso temporal de la producción de cisteamina in vivo variará según el número de etapas degradativas entre el precursor de cisteamina y la cisteamina. En algunas realizaciones, las composiciones que contienen múltiples precursores de cisteamina se formulan como un polvo, como gránulos o como un líquido, es decir, tipos de formulación que pueden acomodar grandes cantidades de sustancia farmacológica.

La composición farmacéutica también puede incluir uno o más agentes que mejoran el rendimiento de la formulación. Por ejemplo, una composición gastrorretentiva puede incluir un compuesto que retarda el vaciamiento gástrico para prolongar la residencia de la composición en el estómago.

En composiciones con dos componentes precursores de cisteamina, el primer y el segundo componente pueden estar presentes en una relación de, por ejemplo, alrededor de 1:1,5 a alrededor de 1:4. En composiciones con tres componentes precursores de cisteamina, el primer, segundo y tercer componente pueden estar presentes en una relación de, por ejemplo, entre alrededor de 1:1:2 y alrededor de 1:4:4. En composiciones con cuatro componentes activos, los componentes activos primero a cuarto pueden estar presentes en una relación de, por ejemplo, alrededor de 1:1:1:2 a alrededor de 1:2:5:5. En composiciones con cinco componentes activos, los componentes activos primero a quinto pueden estar presentes en una relación de, por ejemplo, alrededor de 1:1:2:2:2 a alrededor de 1:1:2:5:8.

En algunas realizaciones, las composiciones que contienen dos o más precursores de cisteamina incluyen un precursor seleccionado para una rápida producción de cisteamina in vivo (por ejemplo, simplemente requiriendo una reducción del enlace de disulfuro), y un segundo precursor seleccionado para una conversión in vivo intermedia o más lenta en cisteamina (por ejemplo, requiriendo una reducción química y al menos una etapa degradativa enzimática). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que contiene dos o más precursores de cisteamina, al menos un precursor es un disulfuro mixto de cisteamina, que puede producir cisteamina tras la reducción del enlace de disulfuro. En realizaciones relacionadas adicionales, al menos un componente adicional es un disulfuro que contiene panteteína o un compuesto degradable a panteteína en el tracto gastrointestinal.

Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria sólida (por ejemplo, un comprimido o una cápsula), conteniendo cada dosis, por ejemplo, 50-800 mg del ingrediente activo del primer componente. Por ejemplo, las dosis pueden contener de alrededor de 50 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 500 mg; de alrededor de 75 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 500 mg; de alrededor de 100 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 500 mg; de alrededor de 250 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 500 mg; de alrededor de 400 mg a alrededor de 800 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 600 mg; de alrededor de 450 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 450 mg a alrededor de 600 mg del ingrediente activo de un primer componente.

En realizaciones alternativas, las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria líquida o en polvo, conteniendo cada unidad de dosificación de alrededor de 250 mg a alrededor de 10.000 mg de precursor de cisteamina. Por ejemplo, las dosis pueden contener de alrededor de 250 mg a alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 250 mg hasta alrededor de 8.000 mg, de alrededor de 250 mg hasta alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 250 mg hasta alrededor de 5.000 mg; de alrededor de 500 mg hasta alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 500 mg hasta alrededor de 8.000 mg, de alrededor de 500 mg hasta alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 500 mg hasta alrededor de 5.000 mg; de alrededor de 750 mg hasta alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 750 mg hasta alrededor de 8.000 mg, de alrededor de 750 mg hasta alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 750 mg hasta alrededor de 5.000 mg; de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 8.000 mg, de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 5.000 mg; de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 10.000 mg, de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 8.000 mg, de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 6.000 mg; de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 5.000 mg, de alrededor de 3.000 mg a alrededor de 6.000 mg del ingrediente activo de un primer componente.

En composiciones con un primer y un segundo componente precursor de cisteamina, la cantidad del segundo componente activo en una forma de dosificación unitaria sólida puede variar, por ejemplo, de 50 a 700 mg. Por ejemplo, la dosificación puede contener de alrededor de 50 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 450 mg; de alrededor de 75 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 600 mg; de alrededor de 100 mg a alrededor de 700 mg; de alrededor de 100 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 400 mg; de alrededor de 250 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 400 mg; de alrededor de 400 mg a alrededor de 700 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 450 mg a alrededor de 700 mg; de alrededor de 450 mg a alrededor de 600 mg, de alrededor de 450 mg a alrededor de 500 mg. En una composición con un precursor de cisteamina como primer componente activo y un potenciador de la generación de cisteamina in vivo como segundo componente activo, la cantidad del segundo componente activo en una forma de dosificación unitaria puede variar, por ejemplo, de 0,1 mg - 400 mg.

En realizaciones alternativas que incluyen un primer y un segundo componente precursor de ciseamina, la cantidad del segundo componente activo en una forma de dosificación unitaria líquida o en polvo puede variar, por ejemplo de alrededor de 250 mg a alrededor de 6000 mg. Por ejemplo, la dosificación puede contener de alrededor de 250 mg a alrededor de 6000 mg por dosis, de alrededor de 250 mg a alrededor de 5000 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 4000 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 3000 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 2000 mg; de alrededor de 500 mg a alrededor de 6000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 5000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 4000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 3000 mg; de alrededor de 750 mg a alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 750 mg a alrededor de 5.000 mg, de alrededor de 750 mg a alrededor de 4.000 mg, de alrededor de 750 mg a alrededor de 3.000 mg; de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 5.000 mg, de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 4.000 mg, de alrededor de 1.250 mg a alrededor de 3.000 mg; de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 6.000 mg, de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 5.000 mg, de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 4.000 mg; de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 3.000 mg, de alrededor de 2.500 mg a alrededor de 5.000 mg del ingrediente activo de un segundo componente

En composiciones sólidas con un tercer, o tercer y cuarto componente precursor de cisteamina, las dosis unitarias pueden contener de desde alrededor de 50 mg a desde alrededor de 400 mg de cada uno del tercer y, si está presente, cuarto componente activo. Por ejemplo, las dosis pueden contener de alrededor de 50 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 350 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 250 mg; de alrededor de 75 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 350 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 250 mg; de alrededor de 100 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 350 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 250 mg; de alrededor de 250 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 350 mg o de alrededor de 250 mg a alrededor de 300 mg. En composiciones con cinco componentes activos, las dosis unitarias de los cinco componentes pueden oscilar de alrededor de 50 mg a alrededor de 300 mg. En una composición con un potenciador de la generación de cisteamina in vivo como el cuarto, y opcionalmente también el tercer componente activo, la cantidad del cuarto, y opcionalmente del tercer componente activo, en una forma de dosificación unitaria puede variar, por ejemplo, de 0,1 mg - 400 mg.

En realizaciones alternativas que incluyen un tercer componente precursor de cisteamina, o un tercer y cuarto componente precursor de cisteamina en una forma de dosificación unitaria líquida o en polvo, las dosificaciones unitarias del tercer y opcionalmente cuarto componente activo pueden variar, por ejemplo, de alrededor de 250 mg a alrededor de 4000 mg. Por ejemplo, la dosificación puede contener de alrededor de 250 mg a alrededor de 4000 mg por dosis, de alrededor de 250 mg a alrededor de 3000 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 2000 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 1000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 4000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 3000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 2000 mg, de alrededor de 500 mg a alrededor de 1000 mg; de alrededor de 750 mg a alrededor de 4.000 mg, de alrededor de 750 mg a alrededor de 3.000 mg, de alrededor de 750 mg a alrededor de 2.000 mg, de alrededor de 750 mg a alrededor de 1.000 mg; de alrededor de 1.000 mg a alrededor de 4.000 mg, de alrededor de 1.000 mg a alrededor de 3.000 mg, de alrededor de 1.000 mg a alrededor de 2.000 mg, de alrededor de 1.000 mg a alrededor de 1.500 mg; de alrededor de 1.500 mg a alrededor de 4.000 mg, de alrededor de 1.500 mg a alrededor de 3.000 mg, de alrededor de 1.500 mg a alrededor de 2.000 mg; de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 4.000 mg, de alrededor de 2.000 mg a alrededor de 3.000 mg del ingrediente activo de un tercer y opcionalmente cuarto componente activo.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de modo de proporcionar una liberación inmediata, retardada, gastrorretentiva, sostenida o colónica (denominadas colectivamente liberación controlada) del componente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el ingrediente o los ingredientes activos (por ejemplo, varios precursores de cisteamina) se pueden mezclar con uno o más excipientes farmacéuticos para formar una composición de formulación sólida a granel que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de formulación a granel como homogéneas, el ingrediente activo normalmente se dispersa de manera uniforme en toda la composición, de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente efectivas, tales como comprimidos, cápsulas o micropartículas. Esta formulación sólida a granel se subdivide después en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente.

Alternativamente, se pueden preparar dos lotes homogéneos de ingrediente o ingredientes activos mezclados con uno o más excipientes farmacéuticos, utilizando cada uno una concentración diferente de ingrediente o ingredientes activos. La primera mezcla puede usarse entonces para formar un núcleo, y la segunda mezcla una cubierta alrededor del núcleo, para formar una composición con características de liberación del fármaco variables. Si el lote de alta concentración se encuentra en el núcleo y el lote de menor concentración en la cubierta, una velocidad inicial moderada de liberación del fármaco será seguida de una velocidad mayor de liberación del fármaco una vez que la cubierta se haya disuelto o erosionado sustancialmente. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica contiene una mayor concentración de ingrediente o ingredientes activos en el núcleo

que en la cubierta. La relación de concentraciones de precursor de cisteamina en el núcleo:capa puede, por ejemplo, oscilar entre alrededor de 1,5:1 y 4:1. Los excipientes también pueden diferir en tipo o en concentración entre los dos lotes, lo que puede influir en la velocidad de liberación del fármaco. En algunas realizaciones, los polímeros u otros ingredientes formadores de matriz en el núcleo liberan el o los ingredientes activos más lentamente que desde la cubierta. En tales realizaciones, una mayor concentración de precursor o precursores de cisteamina en el núcleo se equilibra parcial o completamente con una velocidad más lenta de liberación del fármaco, para extender la duración de la liberación del precursor de cisteamina, y por lo tanto la duración de la generación de cisteamina in vivo, la absorción intestinal y los niveles sanguíneos elevados. Se pueden aplicar uno o más recubrimientos al núcleo antes de aplicar la capa de cubierta, y se pueden aplicar recubrimientos adicionales a la cubierta para permitir un procedimiento de fabricación eficiente y/o para ayudar a proporcionar las propiedades farmacológicas deseadas, incluido el momento y la ubicación de la liberación del fármaco en el tracto gastrointestinal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen aquellas formuladas para liberar una mezcla de precursores de cisteamina que difieren en el mecanismo o número de etapas degradativas que conducen a la producción de cisteamina. Específicamente, una mezcla de dos, tres, cuatro o cinco precursores de cisteamina, cada uno de los cuales está a una, dos, tres o más etapas degradativas químicas y/o enzimáticas de liberar cisteamina. Por ejemplo, una etapa puede ser la reducción del enlace de disulfuro (en el caso de un disulfuro mixto de cisteamina) o la escisión por panteteinasa (en el caso de la panteteína). Las dos etapas pueden ser la reducción del enlace de disulfuro seguida de la escisión por panteteinasa (en el caso de un disulfuro de panteteína), o la escisión por fosfatasa seguida de la escisión por panteteinasa (en el caso de 4-fosfopanteteína). Las tres etapas pueden ser la reducción del enlace de disulfuro precedida o seguida por la degradación a panteteína (por ejemplo, por una fosfatasa), seguida de la escisión por panteteinasa (por ejemplo, en el caso de un disulfuro de 4-fosfopanteteína). Las cuatro etapas pueden ser una reducción del enlace de disulfuro seguida de dos etapas degradativas a panteteína (por ejemplo, la eliminación del resto de nucleótido de adenina por la ectonucleótido difosfatasa, seguida de la eliminación del fosfato 4' por una fosfatasa), seguida de la escisión por panteteinasa (por ejemplo, en el caso de un disulfuro de coenzima A o desfosfo-coenzima A). El propósito de combinar precursores de cisteamina que tienen diferentes rutas de degradación química y/o enzimática de la cisteamina es extender el tiempo durante el cual la cisteamina se produce y se absorbe en el intestino, y en consecuencia prolongar la duración de los niveles sanguíneos de cisteamina terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención contiene al menos dos precursores de cisteamina; en otras realizaciones, una composición farmacéutica contiene tres precursores de cisteamina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para liberación mixta, lo que significa que una composición contiene dos perfiles de liberación de fármaco. Por ejemplo, una formulación de liberación inmediata puede combinarse con una formulación de liberación sostenida. (Véase la composición F en la Figura 14, por ejemplo.) En dicha composición, el primer componente activo puede formularse para una liberación inmediata que comienza entre alrededor de 5 minutos y alrededor de 30 minutos después de la ingestión. Por ejemplo, el primer componente activo puede liberarse a partir de los 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, o 45 minutos después de la ingestión de la composición. El primer componente activo está formulado de tal manera que las concentraciones plasmáticas de cisteamina en el intervalo terapéutico se alcanzan entre alrededor de 15 minutos y 3 horas después de la ingestión, preferiblemente entre 30 minutos y 2 horas. Por ejemplo, las concentraciones terapéuticas de cisteamina plasmática pueden alcanzarse 0,5 horas, 1 hora, 2 horas, o 3 horas después de la ingestión de la composición. El tipo de precursor de cisteamina utilizado (por ejemplo, tiol, disulfuro mixto de cisteamina, disulfuro de panteteína, disulfuro de coenzima A, disulfuro de N-acetilcisteamina, etc.) influirá en el tiempo necesario para alcanzar concentraciones sanguíneas terapéuticas de cisteamina, y en el tiempo durante el cual se mantienen las concentraciones sanguíneas terapéuticas.

En una composición con dos, tres y opcionalmente cuatro o cinco componentes activos (por ejemplo, múltiples precursores de cisteamina y/o potenciadores de la generación y absorción de cisteamina in vivo), cada uno de los componentes activos segundo, tercero y/o cuarto y/o quinto está formulado para una liberación controlada de la composición que comienza entre alrededor de 1 hora y alrededor de 8 horas después de la ingestión. Una composición de liberación controlada puede incluir una formulación de liberación retardada y/o una formulación de liberación sostenida. Por ejemplo, el segundo, tercer y/o cuarto componente activo puede liberarse a partir de 1 hora, 1,5 horas, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, u 8 horas después de la ingestión de la composición. El segundo, tercer y/o cuarto componente activo se formula de manera que la concentración plasmática de cisteamina (que refleja las contribuciones de todos los componentes activos) se mantenga en el intervalo terapéutico comenzando entre alrededor de 30 minutos y 2 horas después de la ingestión y extendiéndose entre alrededor de 6 y 10 horas, más preferiblemente extendiéndose entre 8 y 12 horas después de la ingestión, o durante periodos más largos. Por ejemplo, la concentración plasmática de cisteamina puede mantenerse en el intervalo terapéutico durante 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 15 horas, 20 horas, o 24 horas después de la ingestión de los componentes activos de la composición. Dependiendo de la edad y el tamaño del paciente, la enfermedad a tratar, y la velocidad de metabolización de cisteamina del paciente, pueden necesitarse dos o más composiciones para administrar suficiente precursor de cisteamina para lograr niveles sanguíneos terapéuticos durante varias horas.

Como alternativa o complemento a las composiciones farmacéuticas que comprenden formulaciones mixtas, en algunas realizaciones se pueden producir composiciones que consisten en un solo tipo de formulación. Es decir, las formulaciones basadas en el tiempo, tales como las formulaciones de liberación inmediata o de liberación sostenida, y las formulaciones dirigidas anatómicamente, tales como las formulaciones gastrorretentivas, de liberación retardada, y dirigidas al colon, se pueden preparar para su administración como composiciones separadas. La formulación de una colección de composiciones farmacéuticas con diferentes propiedades de liberación de fármacos (ya sea basadas en el tiempo o en la anatomía/fisiología) tiene ciertas ventajas. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden administrar en diferentes combinaciones y relaciones a diferentes pacientes para lograr niveles de cisteamina en sangre dentro del intervalo terapéutico durante un período prolongado de tiempo. Es decir, un régimen terapéutico consistente en una, dos, tres o más composiciones administradas según un programa específico puede adaptarse a la capacidad de generación, absorción y metabolización de cisteamina de un paciente individual. Dado que se sabe que estas capacidades varían entre pacientes, la formulación de múltiples composiciones homogéneas que contienen diferentes precursores de cisteamina y diferentes propiedades de liberación del fármaco, que se pueden combinar en diferentes relaciones para diferentes pacientes, aborda una limitación conocida de las formulaciones de cisteamina existentes.

Preferiblemente, una combinación de dos o más composiciones farmacéuticas puede mantener los niveles sanguíneos de cisteamina en el intervalo terapéutico durante al menos 2-8 horas después de la ingestión, más preferiblemente desde 1-8 horas después de la ingestión, aún más preferiblemente desde 2-10 horas, y lo más preferible desde 1-10 horas, 1 - 12 horas, 1 - 14 horas, o más. Las composiciones farmacéuticas formuladas por separado que contienen diferentes precursores de cisteamina con diferentes perfiles de liberación del fármaco proporcionan la flexibilidad de dosificación necesaria para individualizar los regímenes de dosificación para lograr concentraciones sanguíneas de cisteamina terapéuticamente efectivas durante períodos prolongados.

Está bien documentado que el tiempo de vaciamiento gástrico y el tiempo de tránsito del intestino grueso varían considerablemente entre individuos sanos (hasta el doble o más). También se sabe que el entorno redox intestinal y los niveles de actividad de la panteteinasa varían entre individuos. Estos y otros factores probablemente expliquen la amplia variación interindividual en los niveles plasmáticos de cisteamina observados después de una dosis de cisteamina. Por ejemplo, en un estudio sobre la farmacocinética del bitartrato de cisteamina de liberación inmediata en voluntarios sanos, el nivel máximo de cisteamina en sangre (C<sub>max</sub>) después de una dosis oral de 600 mg administrada con una comida varió más de 8 veces, desde 7 micromolar hasta 57,3 micromolar. (Dohil R. y P. Rioux, *Clinical Pharmacology in Drug Development* 2:178 (2013)). En el mismo estudio, la C<sub>max</sub> después de 600 mg de bitartrato de cisteamina de liberación retardada administrado con una comida varió 12 veces, de 2,1 uM a 25,4 uM. La variación interpaciente en los niveles plasmáticos de cisteamina fue menos extrema cuando se administró cisteamina a pacientes en ayunas, pero aún así fue hasta cuatro veces mayor. (Cuando la cisteamina se dosifica cada seis horas, como con Cystagon®, o incluso cada 12 horas, como con Procybsi®, es difícil evitar por completo las horas de las comidas).

Los métodos actuales de formulación y administración de cisteamina proporcionan sólo una herramienta para abordar la variabilidad interindividual: aumentar o disminuir la dosis. Los precursores de cisteamina, los potenciadores de la generación y absorción de cisteamina in vivo, los métodos de formulación de fármacos y los métodos de administración de fármacos descritos aquí proporcionan múltiples herramientas para lograr niveles terapéuticos de cisteamina en sangre adaptando compuestos, formas de dosificación y regímenes de dosificación a pacientes individuales sin incurrir en la toxicidad inaceptable a menudo asociada con una C<sub>max</sub> alta, o en el efecto terapéutico inadecuado asociado con niveles sanguíneos prolongados por debajo del umbral terapéutico.

Otra ventaja de las composiciones formuladas por separado es que pueden administrarse en momentos diferentes con respecto a las comidas. Esta es una opción útil porque las diferentes clases de precursores de cisteamina y los diferentes tipos de formulaciones interactúan de manera diferente con las comidas. Por ejemplo, una formulación gastrorretentiva debe administrarse con una comida o poco después de ella, preferiblemente una comida rica en nutrientes para maximizar la duración de la retención gástrica. Por el contrario, una formulación de liberación inmediata que contiene un disulfuro mixto de cisteamina que puede convertirse rápidamente en cisteamina mediante reducción del enlace de disulfuro no debe administrarse preferiblemente con una comida abundante. Las comidas abundantes interfieren con la absorción de cisteamina en algunas personas; sin embargo, las comidas son compatibles con ciertos precursores de cisteamina que producen poca o ninguna cisteamina en el estómago, por ejemplo los disulfuros de panteteína, que tienden a convertirse en cisteamina en el intestino delgado.

Los regímenes de dosificación individualizados posibles con los compuestos y formulaciones de la invención son particularmente útiles debido a que, si bien la variación interindividual extensa en la absorción intestinal de cisteamina está bien documentada, está igualmente bien documentado que la variación intraindividual es moderada en comparación. Es decir, un sujeto determinado absorberá y metabolizará una dosis de cisteamina de manera sustancialmente similar cuando se administra en múltiples ocasiones en circunstancias similares. Por lo tanto, un régimen de dosificación, una vez individualizado para producir niveles de cisteamina en sangre dentro del intervalo terapéutico para un paciente específico, debería ser relativamente estable y producir resultados predecibles a lo largo del tiempo.

Se pueden diseñar formulaciones de liberación sostenida para liberar fármacos durante períodos de tiempo muy variables utilizando métodos conocidos en la técnica. (Wen, H. y Park, K., editores: Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice, Wiley, 2010; Wells, J.I. y Rubinstein, M.H., editores: Pharmaceutical Technology: Controlled Drug Release, volúmenes I y II, Ellis and Horwood, 1991, y Gibson, M., editor: Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form, 2.ª edición, Informa, 2009.)

Las Figuras 14, 15 y 16 proporcionan ejemplos de composiciones farmacéuticas de la invención, destinadas a ilustrar aspectos tales como ingredientes activos (precursores de cisteamina, potenciadores de la conversión del precursor de cisteamina a cisteamina, y potenciadores de la absorción intestinal de cisteamina), intervalos de dosis (para todos los componentes activos combinados), tipos de formulación (incluyendo formulaciones mixtas), combinaciones de composiciones y métodos de administración (por ejemplo, con alimentos o con una comida). Los ingredientes activos incluyen precursores de cisteamina, así como potenciadores de la generación de cisteamina in vivo y potenciadores de la absorción intestinal de cisteamina.

### **Formulaciones para administración oral**

Las composiciones farmacéuticas contempladas por la invención incluyen aquellas formuladas para administración oral ("formas de dosificación oral"). Las formas de dosificación oral pueden ser, por ejemplo, en forma de comprimidos, cápsulas, una disolución o suspensión líquida, un polvo, o cristales o gránulos líquidos o sólidos, que contienen el o los ingredientes activos en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Si se formula como líquido, polvo, cristales o gránulos, la dosis puede envasarse de manera que delimite claramente una dosis unitaria. Por ejemplo, un polvo o gránulos o micropartículas pueden envasarse en una bolsita. Un líquido puede envasarse en un recipiente de vidrio o plástico.

Los excipientes se seleccionan para proporcionar propiedades organolépticas aceptables, para controlar las propiedades de liberación del fármaco, para facilitar una fabricación eficiente, y para garantizar la estabilidad a largo plazo de las composiciones farmacéuticas, entre otras consideraciones conocidas por los expertos en las artes de la farmacología, la farmacia y la fabricación de fármacos. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio, o fosfato de sodio); agentes de granulación y disgregación (por ejemplo, derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos, o ácido alginico); agentes aglutinantes (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, goma arábica, ácido alginico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio y aluminio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona, o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados, o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, conservantes, agentes amortiguadores, agentes estabilizantes y similares. Muchos de estos excipientes son vendidos por múltiples fabricantes de excipientes en una variedad de formas químicas, y/o pueden usarse en diferentes concentraciones, y/o en diferentes combinaciones con otros excipientes, con las consiguientes diferencias en las características de rendimiento. Es posible que excipientes específicos cumplan más de un propósito en una formulación.

Las formulaciones para administración oral también pueden presentarse como comprimidos masticables, como cápsulas de gelatina duras en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blandas en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva. Se pueden preparar polvos, granulados y peletes utilizando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de manera convencional utilizando, por ejemplo, un mezclador, un aparato de lecho fluido o un equipo de secado por pulverización.

Una categoría de formulaciones útiles controla principalmente la velocidad de liberación del fármaco (por ejemplo, formulaciones de liberación inmediata y sostenida), aunque con implicaciones significativas en cuanto a dónde se libera el fármaco. Una segunda categoría de formulaciones útiles controla principalmente el sitio anatómico de liberación del fármaco (por ejemplo, formulaciones gastrorretentivas para la liberación del fármaco en el estómago, formulaciones dirigidas al colon para el intestino grueso), aunque con implicaciones en el momento de la liberación. Las formulaciones con recubrimiento entérico tienen elementos importantes de ambos: están diseñadas para permanecer intactas en el ambiente ácido del estómago, y a menudo para disolverse en el intestino delgado más alcalino, lo que es un tipo de orientación anatómica, aunque a menudo se las denomina formulaciones de liberación retardada, lo que resalta el elemento de control del tiempo. Sin embargo, las formulaciones dirigidas al colon también pueden tener un recubrimiento entérico para evitar la disolución en el estómago, lo que resalta la compleja relación entre la orientación anatómica y el control de la velocidad de liberación del fármaco. Además, existe un amplio solapamiento entre los excipientes utilizados en formulaciones basadas en el tiempo y en formulaciones dirigidas anatómica o fisiológicamente. Estos tipos de formulaciones se pueden combinar de diversas maneras

para crear una pluralidad de composiciones con diferentes perfiles de liberación del fármaco, tanto en el tiempo como en el espacio. Estas composiciones pueden a su vez combinarse en diferentes cantidades y relaciones para individualizar los regímenes terapéuticos para acomodar la variación bioquímica y fisiológica entre pacientes, así como la variación en el tipo, extensión y actividad de la enfermedad.

### **Formulaciones gastrorretentivas**

Se pueden emplear formulaciones gastrorretentivas para la liberación de un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, de una composición de la invención en el estómago y para controlar la liberación del componente o componentes activos de la composición en el estómago durante un período prolongado de tiempo. En otras palabras, dado que el objetivo de una formulación gastrorretentiva es la residencia gástrica prolongada, los excipientes que la acompañan deben proporcionar una liberación sostenida de los ingredientes activos durante todo el período de tiempo que se espera que la forma de dosificación gastrorretentiva permanezca en el estómago, y opcionalmente durante más tiempo, incluido el tiempo de tránsito a través del intestino delgado y hasta el colon. La gastrorretención de los componentes activos de la invención puede lograrse mediante diversos mecanismos, tales como mucoadhesión, flotación, sedimentación, hinchazón y expansión, y/o mediante la administración simultánea de agentes farmacológicos que retrasan el vaciamiento gástrico. Los excipientes utilizados en formulaciones gastrorretentivas, así como el tamaño y la forma de las composiciones farmacéuticas, varían según el mecanismo de gastrorretención.

### **Formulaciones gastrorretentivas mucoadhesivas/bioadhesivas**

La mucoadhesión se refiere a la adhesión de un polímero utilizado en la formulación a la capa de moco gastrointestinal hasta que se elimina espontáneamente de la superficie como resultado de la producción continua de moco. La bioadhesión, a veces utilizada indistintamente con la mucoadhesión, también abarca la adhesión de un polímero u otro componente de una composición farmacéutica a moléculas en la superficie de las células epiteliales gastrointestinales. El propósito de la mucoadhesión y la bioadhesión es aumentar el tiempo que una composición farmacéutica está cerca de las células epiteliales gastrointestinales, incluidos los tipos de células capaces de escindir el precursor de cisteamina (es decir, las células que expresan panteteinasa en su superficie), y la captación y transporte de cisteamina en la circulación (por ejemplo, células que expresan transportadores de cationes orgánicos). Los polímeros mucoadhesivos se pueden utilizar para formular formas de dosificación grandes, tales como comprimidos o cápsulas, y formas de dosificación pequeñas, tales como micropartículas o microesferas. Diversos factores fisiológicos tales como la peristalsis, el tipo de mucina, la tasa de recambio de mucina, el pH gastrointestinal, el estado de ayuno/alimentación y el tipo de alimentos en el estado alimentado afectan el grado y la persistencia de la mucoadhesión. Se cree que el mecanismo de mucoadhesión es a través de la formación de enlaces electrostáticos y de hidrógeno en el límite polímero-moco. Generalmente, la mucoadhesión se logra con polímeros que tienen afinidad por la mucosa gastrointestinal y seleccionados de materiales bioadhesivos sintéticos o naturales tales como ácidos poliacrílicos, ácidos metacrílicos y derivados de ambos, polibreno, polilisina, policarbófilos, carbómeros, alginatos, quitosano, colestiramina, gomas, lectinas, óxidos de polietileno, sucralfato, tragacanto, dextrinas (por ejemplo, hidroxipropil beta-ciclodextrina), polietilenglicol (PEG), gliadina, celulosa y derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), o mezclas de los mismos. Por ejemplo, los copolímeros de ácido acrílico y metacrílico reticulados disponibles con los nombres comerciales CARBOPOL (por ejemplo, Carbopol 974P y 971P) y POLYCARBOPHIL se han utilizado en formulaciones mucoadhesivas. (Hombach J. y A. Bernkop-Schnürch. Handbook of Experimental Pharmacology 197:251 (2010)). Otros polímeros catiónicos bioadhesivos incluyen gelatina ácida, poligalactosamina, poliaminoácidos tales como polilisina, poliornitina, compuestos policuaternarios, prolamina, poliimina, dietilaminoetil-dextrano (DEAE), DEAE-imina, polivinilpiridina, politiodietilaminometil-etileno (PTDAE), polihistidina, DEAE-metacrilato, DEAE-acrilamida, poli-p-aminoestireno, polioxetano, Eudragit RL, Eudragit RS, GAFQUAT, poliamidoaminas, almidones catiónicos, DEAE-dextrano, DEAE-celulosa y copolimetacrilatos, incluidos copolímeros de HPMa, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida (por ejemplo, véase la patente de EE. UU. 6.207.197).

La mucoadhesión es más eficaz cuando se aplica a partículas pequeñas (por ejemplo, micropartículas). Las formulaciones mucoadhesivas se pueden combinar con uno o más métodos de formulación gastrorretentiva descritos a continuación, incluidas formulaciones flotantes, formulaciones expansivas/hinchables, o cualquier tipo de formulación de liberación sostenida.

### **Formulaciones gastrorretentivas flotantes**

La flotación como mecanismo de retención gástrica es eficaz en formulaciones del componente activo (por ejemplo, precursor de cisteamina) que tiene una densidad aparente menor que la del líquido gástrico y/o el quimo (alimento parcialmente digerido en el estómago) para permanecer flotante en el estómago. Generalmente es deseable una densidad de menos de 1 gramo por centímetro cúbico, más preferiblemente una densidad de menos de 0,9 gramos por centímetro cúbico. La flotabilidad se puede lograr (i) utilizando materiales de baja densidad, incluidos los lípidos, (ii) preformando una o más burbujas de gas en el centro de una composición, o (iii) utilizando excipientes efervescentes para generar burbujas de gas in vivo. Las composiciones farmacéuticas de este último tipo deben diseñarse de modo que el gas generado por los excipientes efervescentes permanezca en la composición y

contribuya así a su flotabilidad. Por ejemplo, los excipientes efervescentes pueden incorporarse en una matriz de polímeros para atrapar las burbujas en la composición. El último tipo de formulaciones flotantes generalmente utiliza matrices preparadas con polímeros o polisacáridos hinchables y parejas efervescentes, por ejemplo bicarbonato de sodio y ácido cítrico o tartárico, o matrices que contienen cámaras de aire atrapado, o líquidos que generan gas al entrar en contacto con contenido gástrico líquido a temperatura corporal. Las formulaciones gastroretentivas flotantes se han revisado ampliamente (por ejemplo, Kotreka, UK Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 28:47 (2011)).

Las composiciones farmacéuticas flotantes diseñadas para la retención gástrica se conocen en la técnica desde hace algún tiempo. Por ejemplo, las patentes de EE. UU. núms. 4.126.672, 4.140.755 y 4.167.558 describen un sistema de administración de fármacos "hidrodinámicamente equilibrado" (HBS) en forma de comprimido que tiene una densidad menor que la del líquido gástrico (es decir, menos de 1 gramo por centímetro cúbico). En consecuencia, la composición flota en el líquido gástrico o quimo, evitando así su expulsión a través del píloro durante las contracciones musculares del estómago. El fármaco se libera continuamente desde un hidrocoloide derivado de celulosa, tal como metilcelulosa, hidroxialquilcelulosas (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa) o carboximetilcelulosa sódica, que, al entrar en contacto con el líquido gástrico, forma una barrera impermeable al agua en la superficie de la composición que se erosiona gradualmente, liberando lentamente el fármaco. En la patente de EE. UU. N.º 4.140.755 también se describe un comprimido flotante de dos capas, con una capa exterior formulada para liberación inmediata y una capa interior formulada para liberación sostenida.

También se ha descrito una formulación flotante hidrodinámicamente equilibrada similar para la administración sostenida de L-dopa y un inhibidor de la descarboxilasa (véase la patente de EE. UU. N.º 4.424.235). Los hidrocoloides, tales como goma arábica, goma tragacanto, goma de algarrobbilla, goma guar, goma karaya, agar, pectina, carragenina, alginatos solubles e insolubles, carboxipolimetileno, gelatina, caseína, zeína y bentonita pueden ser útiles en la preparación de formulaciones flotantes de la invención. La formulación flotante puede incluir hasta alrededor de 60% de un material graso o una mezcla de materiales grasos seleccionados de cera de abejas, alcohol cetílico, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, aceite de ricino hidrogenado, y aceite de semilla de algodón hidrogenado (las grasas y los aceites tienen una densidad menor que el líquido gástrico). Las formulaciones flotantes pueden promover la liberación sostenida del precursor de cisteamina y proporcionar niveles elevados de cisteamina plasmática durante un período de tiempo más prolongado. Los niveles plasmáticos elevados y prolongados de cisteamina permiten una dosificación menos frecuente.

Las composiciones flotantes de la presente invención pueden contener agentes generadores de gas. Se conocen en la técnica métodos para formular composiciones flotantes utilizando compuestos generadores de gas. Por ejemplo, en la patente de EE. UU. 4.106.120 se describen minicápsulas flotantes que contienen bicarbonato de sodio. Gránulos flotantes similares, basados en la generación de gas, se describen en la patente de EE.UU. No. 4.844.905. Las cápsulas flotantes se han descrito en la patente de EE. UU. 5.198.229.

Las composiciones flotantes pueden contener opcionalmente una fuente de ácido y un agente de carbonato o bicarbonato generador de gas, que juntos actúan como una pareja efervescente, produciendo gas de dióxido de carbono que proporciona flotabilidad a la formulación. Las parejas efervescentes que consisten en un ácido orgánico soluble y una sal de carbonato de metal alcalino forman dióxido de carbono cuando la mezcla entra en contacto con agua o cuando el componente alcalino entra en contacto con un líquido ácido (por ejemplo, jugo gástrico). Los ejemplos típicos de ácidos utilizados incluyen ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, ácido fumárico o ácido adipico. Los ejemplos típicos de álcalis generadores de gas utilizados incluyen bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de glicina y sodio, sesquicarbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, bicarbonato de amonio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, y similares. El agente generador de gas interactúa con una fuente de ácido desencadenada por el contacto con el agua, o con el ácido clorhídrico del jugo gástrico, para generar dióxido de carbono o dióxido de azufre, que queda atrapado en la matriz de la composición y mejora sus características de flotación. En una realización, el agente generador de gas es bicarbonato de sodio, y la fuente de ácido es ácido cítrico.

La cinética de flotación es importante porque si la composición no es más ligera que el líquido gástrico y/o el quimo poco después de llegar al estómago, existe la posibilidad de que se expulse rápidamente a través del píloro. Algunas composiciones tienen una densidad menor que el líquido gástrico y el quimo tras la ingestión, tales como las composiciones que contienen burbujas de gas preformadas o que contienen materiales de baja densidad tales como los lípidos. Para aquellas composiciones flotantes que deben alcanzar una densidad inferior a la del líquido gástrico y/o quimo después de llegar al estómago (es decir, formulaciones efervescentes), una densidad menor que 1 gramo por centímetro cúbico se alcanza preferiblemente dentro de los 30 minutos, más preferiblemente dentro de los 15 minutos, y lo más preferible dentro de los diez minutos después del contacto con el líquido gástrico. La duración de la flotación también es importante, y debe coincidir con la duración de la liberación del fármaco. Es decir, si la composición está diseñada para liberar el fármaco durante 6 horas, también debería poder flotar durante seis horas. Preferiblemente, una composición flotante mantiene una densidad menor que 1 durante al menos 5 horas, más preferiblemente 7,5 horas, aún más preferiblemente 10 horas o más.



Puede ser necesaria una dosis grande de precursor de cisteamina (por ejemplo, 2-10 gramos) para tratar eficazmente algunas enfermedades sensibles a la cisteamina, y/o para lograr niveles sanguíneos adecuados en sujetos adultos grandes. Dado que la cantidad de cualquier agente activo que puede estar contenido en formas de dosificación estándar (por ejemplo, comprimidos, cápsulas) está limitada por la capacidad de los pacientes para tragar composiciones grandes, y además dado que la administración de múltiples comprimidos o cápsulas puede ser incómoda o desagradable (o imposible para pacientes con disfagia), son útiles las formas de dosificación alternativas que no limitan la cantidad de agente activo en una forma de dosificación unitaria. Los polvos, gránulos y líquidos son ejemplos de formas de dosificación sin tamaño limitado, que sin embargo pueden administrarse en cantidades de dosificación unitaria mediante un envasado adecuado, por ejemplo en una bolsita o un vial. En algunas realizaciones de la presente invención, una composición gastrorretentiva flotante de la invención se administra en forma líquida. En una realización adicional, la composición líquida incluye alginato. En otras realizaciones, los ingredientes farmacéuticos activos se suministran en forma de polvo o gránulos que se pueden espolvorear sobre los alimentos.

Un tipo de sistema de administración de fármacos flotantes gastrorretentivos líquidos utiliza alginato como excipiente. El ácido algínico es un copolímero de polisacárido de bloques lineal formado por restos de ácido beta-D-manurónico y ácido alfa-L-gulurónico conectados por enlaces glicosídicos 1,4. Se utiliza para una amplia variedad de fines en composiciones farmacéuticas, incluso como polímero de liberación sostenida (véase Murata et al., Eur J Pharm Biopharm 50:221 (2000)). Gaviscon es el nombre comercial de una formulación de alginato líquido flotante que contiene un antiácido. Se ha utilizado para tratar el reflujo gastroesofágico durante décadas, por lo que la seguridad de la ingestión crónica de alginato está bien establecida. Se han descrito formulaciones flotantes de alginato con fármacos de moléculas pequeñas (véase Katayama et al., Biol Pharm Bull. 22:55 (1999); y: Itoh et al., Drug Dev Ind Pharm. 36:449 (2010)). Las formulaciones flotantes que forman una capa sobre la superficie del contenido del estómago a veces se denominan formulaciones formadoras de balsas. Prajapati et al., J Control Release 168:151 (2013), y Nagarwal et al., Curr Drug Deliv, han descrito composiciones de liberación sostenida flotantes/gelificantes formadoras de balsas. 5:282 (2008).

La patente de EE. UU. N.º 4.717.713 describe formulaciones líquidas (bebibles) que, al entrar en contacto con el contenido gástrico, forman una matriz semisólida similar a un gel en el estómago, lo que produce una liberación controlada de un fármaco desde la matriz gelatinosa. Se describen vehículos formadores de gel, que incluyen goma xantana, alginato de sodio, pares de coacervados complejos tales como gelatina u otros polímeros y carragenina, y metilcelulosa gelificante térmica, todos o un subconjunto de los cuales se pueden combinar en diversas relaciones para influir en la velocidad de disolución y/o difusión del o de los agentes farmacéuticamente activos suspendidos. Otros excipientes utilizados incluyen compuestos de carbonato tal como carbonato de calcio, eficaz tanto como promotor de la gelificación como agente generador de gas para hacer flotar el gel. Los xiloglucanos y las gomas gellán también pueden utilizarse como agentes gelificantes o en combinaciones de agentes gelificantes.

Las formulaciones flotantes líquidas (bebibles) pueden incluir micropartículas, que pueden proporcionarse como una suspensión líquida (ya sea un concentrado o listo para uso) o como un polvo que puede añadirse a un líquido (por ejemplo, agua, zumo u otra bebida). Las composiciones gastrorretentivas flotantes también pueden suministrarse en forma de polvos para espolvorear sobre el alimento o mezclarlos de otro modo con él.

Las formulaciones gastrorretentivas flotantes pueden incluir polímeros mucoadhesivos u otros ingredientes mucoadhesivos (véanse las patentes de EE. UU. núms. 6.207.197 y 8.778.396), y pueden utilizar polímeros tales como óxido de polietileno, alcohol polivinílico, alginato de sodio, etilcelulosa, ácidos poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácidos polilácticos, polimetacrilatos, policaprolactonas, poliésteres, ácidos poliacrílicos y poliamidas.

#### ***Composiciones gastrorretentivas que se hinchan y se expanden***

La hinchazón y expansión es un mecanismo de retención gástrica en el que, al entrar en contacto con el líquido gástrico, la composición se hincha hasta un punto que impide su salida del estómago a través del píloro. Como resultado, la composición se retiene en el estómago durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo hasta que la superficie de la composición se erosiona para reducir su diámetro a menos del diámetro del píloro, o hasta que el alimento se vacía sustancialmente del estómago, momento en el cual fuertes contracciones musculares (a veces llamadas la "onda limpiadora") recorren el estómago, limpiando su contenido. La composición queda excluida de pasar a través del esfínter pilórico, ya que excede un diámetro de aproximadamente 14-16 mm en estado hinchado o expandido. Preferentemente, la composición debe tener un diámetro superior a 16-18 mm. El hinchamiento puede combinarse con la flotación, lo que mantiene la formulación alejada del píloro, en particular en estado posprandial.

El concepto de una formulación que se hincha al entrar en contacto con el líquido gástrico, y en consecuencia se retiene en el estómago, se conoce desde la década de 1960. La patente de EE. UU. N.º 3.574.820 describe comprimidos que se hinchan en contacto con el líquido gástrico hasta un tamaño tal que no pueden pasar el píloro, y por lo tanto quedan retenidos en el estómago. De manera similar, la patente estadounidense n.º 5.007.790 describe comprimidos o cápsulas compuestos por polímeros reticulados, hidrófilos y hinchables en agua, que se

hinchán rápidamente para promover la retención gástrica, al tiempo que permiten la disolución lenta de las moléculas del fármaco mezcladas con los polímeros.

La publicación de patente de EE. UU. N.º 20030104053 describe comprimidos en forma de dosificación unitaria para la administración de productos farmacéuticos, en las que el componente activo está disperso en una matriz unitaria sólida que está formada por una combinación de poli(óxido de etileno) e hidroxipropilmetilcelulosa. Se afirma que esta combinación ofrece beneficios únicos en términos de control de la velocidad de liberación y reproducibilidad, al tiempo que permite tanto la hinchazón del comprimido para efectuar la retención gástrica como la desintegración gradual del comprimido para eliminarlo del tracto gastrointestinal después de que se haya producido la liberación del fármaco. La patente estadounidense N.º 6.340.475, también asignada a DepoMed, destaca formas de dosificación orales unitarias de componentes activos desarrollados incorporándolos en matrices poliméricas compuestas por polímeros hidrófilos que se hinchan al absorber agua hasta un tamaño lo suficientemente grande como para promover la retención de la forma de dosificación en el estómago durante el modo de alimentación. La matriz polimérica está formada por un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli(óxido de etileno), celulosa, ácidos poliacrílicos reticulados, goma xantana y celulosas sustituidas con alquilo, como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa y celulosa microcristalina.

Además, los investigadores de DepoMed también han desarrollado sistemas de gastrorretentivos hinchables basados en gomas. La patente de EE. UU. N.º 6.635.280 describe formas de dosificación orales de liberación controlada para fármacos altamente solubles en agua que comprenden uno o más polímeros que forman una matriz polimérica sólida que se hincha al absorber agua hasta un tamaño lo suficientemente grande como para promover la retención de la forma de dosificación en el estómago durante el modo de alimentación. Una matriz polimérica puede estar formada por un polímero seleccionado de los siguientes: óxido de polietileno, celulosa, celulosas sustituidas con alquilo, ácidos poliacrílicos reticulados, y goma xantana. La patente de EE. UU. N.º 6.488.962 describe formas óptimas de comprimidos que evitan el paso a través del píloro y al mismo tiempo son fáciles de tragar. Los comprimidos se obtienen utilizando polímeros hinchables en agua, incluidos polímeros de celulosa y sus derivados, polisacáridos y sus derivados, óxidos de polialquileno, polietilenglicoles, quitosano, poli(alcohol vinílico), goma xantana, copolímeros de anhídrido maleico, poli(vinilpirrolidona), almidón y polímeros a base de almidón, maltodextrinas, poli(2-etil-2-oxazolina), poli(etilenimina), hidrogeles de poliuretano, ácidos poliacrílicos reticulados y sus derivados, así como copolímeros de los polímeros enumerados anteriormente, incluidos copolímeros de bloques y polímeros de injerto.

La patente de EE. UU. N.º 6.723.340 describe mezclas de polímeros óptimas para obtener composiciones gastrorretentivas hinchables. Las mezclas proporcionan un control óptimo de los parámetros de hinchazón y liberación del fármaco, así como un control de los parámetros de disolución/erosión, a fin de garantizar el paso de la composición al intestino delgado tras una liberación sustancialmente completa del fármaco. Las mezclas de polímeros preferidas incluyen combinaciones de óxido de polietileno e hidroxipropilmetilcelulosa. Se proporcionan intervalos de peso molecular e intervalos de viscosidad preferidos para las mezclas de polímeros.

Los métodos descritos en las publicaciones de patentes anteriores se han utilizado para formular cuatro formulaciones gastrorretentivas hinchables aprobadas por la FDA de EE. UU. descritas en múltiples publicaciones (por ejemplo, revisadas en: Berner et al., Expert Opin Drug Deliv. 3:541 (2006)).

La publicación de patente de EE. UU. N.º 20080220060 describe formulaciones gastrorretentivas que comprenden una sustancia activa granulada con una mezcla de un agente gelificante débil, un agente gelificante fuerte, y un agente generador de gas. Aquí, el agente gelificante fuerte se selecciona del grupo que consiste en metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa con la exclusión de hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, hidroxietilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, goma xantana, goma guar, goma de carragenina, goma de algarroilla, alginato de sodio, agar-agar, gelatina, almidones modificados, copolímeros de polímeros de carboxivinilo, copolímeros de acrilatos, copolímeros de oxietileno y oxipropileno, y mezclas de los mismos. La patente también describe métodos de fabricación. La patente de EE. UU. N.º 7.674.480 describe métodos de formulación gastrorretentiva hinchable que proporcionan un hinchamiento muy rápido utilizando mezclas que incluyen un superdisgregante, ácido tánico y uno o más hidrogeles. La publicación de patente de EE. UU. N.º 20040219186 proporciona un dispositivo de retención gástrico expandible que comprende un gel formado a partir de un polisacárido, a base de goma xantana o goma de algarroilla o una combinación de las mismas. La publicación de patente de EE. UU. N.º 20060177497 describe formas de dosificación orales de liberación controlada basadas en goma gellán como una tecnología de plataforma para la retención gástrica. La forma de dosificación comprende además polímeros hidrófilos tales como goma guar, hidroxipropilmetilcelulosa, sal sódica de carboximetilcelulosa, y goma xantana.

La patente de EE. UU. N.º 6.660.300 describe una tecnología de formulación gastrorretentiva de hinchamiento bifásico, adecuada para administrar fármacos solubles en agua, en la que el hinchamiento y la liberación del fármaco se logran mediante compartimentos separados de una composición: una fase particulada sólida interna contiene el fármaco y uno o más polímeros hidrófilos, uno o más polímeros hidrófobos y/o uno o más materiales hidrófobos tales como ceras, alcoholes grasos y/o ésteres de ácidos grasos. Se forma una fase continua sólida

externa (en la que están incrustados los gránulos de la fase interna que contiene el fármaco) utilizando uno o más polímeros hidrófobos y/o uno o más materiales hidrófobos tales como ceras, alcoholes grasos y/o ésteres de ácidos grasos. Se describen comprimidos y cápsulas.

Otros excipientes útiles en una formulación de matriz hinchable o expandible incluyen (i) una matriz polimérica hinchable en agua y (ii) polímeros hidrófilos seleccionados de los siguientes: óxidos de polialquileño, particularmente copolímeros de óxido de polietileno), polietilenglicol y óxido de polietileno)-poli(óxido de propileno); polímeros celulósicos; polímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros y ésteres de los mismos, preferiblemente formados a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, y copolímeros de los mismos, entre sí o con especies de acrilato adicionales tales como acrilato de aminoetilo; copolímeros de anhídrido maleico; ácido polimaleico; poli(acrilamidas) tales como poliacrilamida per se, poli(metacrilamida), poli(dimetilacrilamida) y poli(N-isopropilacrilamida); poli(alcoholes olefinico)s tales como poli(alcohol vinílico), poli(N-vinil lactamas) tales como poli(vinil pirrolidona), poli(N-vinil caprolactama), y copolímeros de las mismas; polioles tales como glicerol, poliglicerol (particularmente poliglicerol altamente ramificado), propilenglicol y trimetilenglicol sustituidos con uno o más óxidos de polialquileño, por ejemplo glicerol mono-, di- y tripolioxietilado, propilenglicol mono- y dipolioxietilado, y trimetilenglicol mono- y dipolioxietilado; sorbitol polioxietilado y glucosa polioxietilada; polioxazolin, incluyendo poli(metiloxazolina) y poli(etiloxazolina); polivinilaminas; acetatos de polivinilo, incluyendo acetato de polivinilo per se así como copolímeros de etileno-acetato de vinilo, ftalato-acetato de polivinilo, y similares, poliiminas, tales como polietilenimina; almidón y polímeros a base de almidón; hidrogeles de poliuretano; quitosano; gomas de polisacáridos; zeína; y goma laca, goma laca amoniacal, goma laca-alcohol acetílico, y goma laca-estearato de n-butilo. La formulación gastrorretentiva también puede incluir cualquier combinación de una formulación flotante, una formulación mucoadhesiva, una formulación de matriz expansible, una formulación de forma modificada y/o una formulación magnética.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición gastrorretentiva que se retiene en el estómago como resultado de la hinchamiento hasta un tamaño que inhibe el paso a través del píloro. En otras realizaciones, la composición gastrorretentiva se retiene en el estómago mediante mecanismos de hinchamiento y flotación.

#### ***Formulaciones gastrorretentivas que se despliegan y cambian de forma***

También se han descrito composiciones farmacéuticas que se despliegan, descomprimen o cambian de otro modo de tamaño y/o forma al entrar en contacto con contenido gástrico líquido, y son vehículos de administración adecuados para los compuestos y formulaciones de la invención. Estas composiciones emplean un principio similar al de las formulaciones gastrorretentivas hinchables/expansivas, ya que cambian de forma en el estómago a un tamaño y/o geometría que no permite fácilmente el paso a través del píloro. Se conocen en la técnica métodos y materiales para obtener composiciones gastrorretentivas desplegadas, desenrollables o que cambian de forma. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3.844.285 describe una variedad de dichos dispositivos destinados al uso veterinario en rumiantes; sin embargo, los principios básicos también se aplican a formulaciones gastrorretentivas humanas. La patente de EE. UU. N.º 4.207.890 describe un sistema de administración de fármaco de liberación controlada que consiste en una "envoltura de polímero colapsada, expandible e imperforada que contiene en su interior una cantidad eficaz de expansión de un agente expansivo" que se hincha y se despliega al entrar en contacto con el jugo gástrico, y en consecuencia se retiene en el estómago en estado expandido. La composición se administra dentro de una cápsula en forma colapsada. Se han revisado composiciones gastrorretentivas que se despliegan y cambian de forma (por ejemplo, Klausner et al., Journal of Controlled Release 90:143 (2003)).

Intec Pharma (Jerusalén, Israel) está desarrollando una tecnología gastrorretentiva ejemplar denominada "píldora del acordeón". Las estructuras planas multicapa de diversas formas (en las que al menos una capa contiene un fármaco) se pliegan en forma de acordeón o escalera y se envasan dentro de una cápsula, como se describe en: Kagan, L. Journal of Controlled Release 113:208 (2006). Las características adicionales de la píldora de acordeón y tecnologías relacionadas se describen en la patente de EE. UU. N.º 6.685.962, incluidos los excipientes farmacéuticos utilizados preferentemente en su construcción. La cápsula se disuelve al entrar en contacto con el contenido del estómago, liberando una composición plegada que se despliega rápidamente y luego queda retenida en el estómago hasta 12 horas cuando se administra con una comida normal.

Otras tecnologías gastrorretentivas incluyen hidrogeles superporosos y sistemas de resinas de intercambio iónico. Los hidrogeles superporosos se hinchan rápidamente (en el plazo de un minuto después de entrar en contacto con el líquido) debido a la rápida absorción de agua a través de numerosos poros interconectados. Las composiciones pueden hincharse hasta 100 veces o más su tamaño original, pero conservar la resistencia mecánica suficiente para soportar las fuerzas de la contracción gástrica debido a la coformulación con polímeros hidrófilos tal como la croscarmelosa sódica (por ejemplo, nombre comercial: Ac-Di-Sol). Las perlas de resina de intercambio iónico se pueden cargar con fármacos con carga negativa y hacer que floten utilizando agentes generadores de gas (por ejemplo, bicarbonato, que reacciona con el ion cloruro en el líquido gástrico para generar gas de dióxido de carbono). Las perlas están encapsuladas en una membrana semipermeable que atrapa el gas, lo que da como resultado una flotación a largo plazo de las perlas.

Las formulaciones gastrorretentivas también pueden incluir cualquier combinación de una formulación de hidrogel superporoso o de resina de intercambio iónico mucoadhesiva, flotante, formadora de balsa, hinchable, desplegable/que cambia de forma. Los expertos en la técnica conocen estas combinaciones. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8.778.396 ("Forma farmacéutica de dosificación gastrorretentiva multiunitaria que comprende micropartículas") describe una formulación gastrorretentiva flotante mucoadhesiva combinada que consiste en micropartículas.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir polímeros hidrófilos que tienen propiedades de hinchamiento y/o mucoadhesivas para promover aún más la gastrorretención. Los polímeros hidrófilos que tienen propiedades de hinchamiento y/o mucoadhesivas adecuados para su incorporación en las composiciones de la presente invención incluyen óxidos de polialquileno; polímeros celulósicos; polímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, y ésteres de los mismos, polímeros de anhídrido maleico; ácido polimaleico; poli(acrilamidas); poli(alcoholes olefinicos); poli(N-vinil lactamas); polioles; sacáridos polioxietilados; polioxazolinás; polivinilaminas; polivinilacetatos; poliiminas; almidón y polímeros a base de almidón; hidrogeles de poliuretano; quitosano; gomas de polisacárido; zeína; polímeros a base de goma laca; óxido de polietileno, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa de calcio, metilcelulosa, ácido poliacrílico, maltodextrina, almidón pregelatinizado y alcohol polivinílico, copolímeros y mezclas de los mismos.

La liberación de ingredientes activos de una composición se puede lograr mediante el uso de retardantes adecuados que incluyen excipientes bien conocidos en la técnica farmacéutica por sus propiedades retardantes de liberación. Los ejemplos de dichos retardantes de liberación incluyen retardantes de liberación poliméricos, retardantes de liberación no poliméricos o cualquier combinación de los mismos.

Los retardantes de liberación poliméricos empleados para los fines de la presente invención incluyen derivados de celulosa; alcoholes polihidroxilados; sacáridos, gomas y derivados de los mismos; derivados de vinilo, polímeros, copolímeros o mezclas de los mismos; copolímeros de ácido maleico; óxidos de polialquileno o copolímeros de los mismos; polímeros de ácido acrílico y derivados de ácido acrílico; o cualquier combinación de los mismos. Los derivados de celulosa incluyen etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa (CMC), o combinaciones de las mismas. Los alcoholes polihidroxilados incluyen polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol; o cualquier combinación de los mismos. Los sacáridos, gomas y sus derivados incluyen dextrina, polidextrina, dextrano, pectina y derivados de pectina, ácido alginico, alginato de sodio, almidón, hidroxipropil almidón, goma guar, goma de algarrobilla, goma xantana, goma karaya, tragacanto, carragenina, goma acacia, goma arábiga, fibras de fenogreco o goma gellán o similares; o cualquier combinación de los mismos. Los derivados de vinilo, polímeros, copolímeros o mezclas de los mismos incluyen acetato de polivinilo, alcohol polivinílico, mezclas de acetato de polivinilo (8 partes p/p) y polivinilpirrolidona (2 partes p/p) (Kollidon SR), copolímeros de vinilpirrolidona, copolímeros de acetato de vinilo, polivinilpirrolidona (PVP); o combinaciones de los mismos. Los óxidos de polialquileno o copolímeros de los mismos incluyen óxido de polietileno, óxido de polipropileno, copolímeros de bloques de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno) (poloxámeros) o combinaciones de los mismos. Los copolímeros de ácido maleico incluyen copolímero de anhídrido de ácido maleico y acetato de vinilo, copolímero de anhídrido de ácido maleico y estireno y acrilato de butilo o similares o cualquier combinación de los mismos. Los polímeros de ácido acrílico y los derivados del ácido acrílico incluyen carbómeros, ácidos metacrílicos, ácidos polimetacrílicos, poliacrilatos, polimetacrilatos o similares o combinaciones de los mismos. Los polimetacrilatos, incluyen a) copolímero formado a partir de monómeros seleccionados de ácido metacrílico, ésteres de ácido metacrílico, ácido acrílico y ésteres de ácido acrílico, c) copolímero formado a partir de monómeros seleccionados de acrilato de etilo, metacrilato de metilo y cloruro de metacrilato de trimetilamonioetilo, o similares o cualquier combinación de los mismos. Los retardantes de liberación no poliméricos empleados para los fines de la presente invención incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes monohidroxilados de cadena larga y sus ésteres o combinaciones de los mismos. En una realización, los retardantes de liberación no poliméricos empleados en la presente invención incluyen Cutina (aceite de ricino hidrogenado), Hydrobase (aceite de soja hidrogenado), Castorwax (aceite de ricino hidrogenado), Croduret (aceite de ricino hidrogenado), Carbowax, Compritol (behenato de glicerilo), Sterotex (aceite de semilla de algodón hidrogenado), Lubritab (aceite de semilla de algodón hidrogenado), Apifil (cera amarilla), Akofine (aceite de semilla de algodón hidrogenado), Softtisan (aceite de palma hidrogenado), Hydrocote (aceite de soja hidrogenado), Corona (lanolina), Gelucire (macrogolglicéridos laúricos), Precirol (palmitoestearato de glicerilo), Emulcire (alcohol cetílico). Plurol diisostearique (diisostearato de poliglicerilo) y Geleol (estearato de glicerilo), y mezclas de los mismos.

Las composiciones gastrorretentivas de la presente invención pueden estar en una forma tal como una forma de dosificación monolítica o multicapa o un sistema integrado. En una realización de la presente invención, las composiciones gastrorretentivas están en forma de una forma de dosificación sólida bicapa o tricapa. En una realización ilustrativa, una composición farmacéutica sólida en forma de un sistema bicapa expansible para administración oral está adaptada para administrar un componente farmacéutico activo desde una primera capa inmediatamente después de llegar al tracto gastrointestinal, y para administrar un agente farmacéutico adicional que puede ser igual o diferente de una segunda capa, de una manera modificada durante un período de tiempo

específico. La segunda capa puede formularse para expandirse en la composición, prolongando así la retención de la composición en el estómago.

En una realización ilustrativa adicional, una composición farmacéutica sólida para administración oral contiene dos capas: una que comprende un componente activo junto con un retardante de liberación adecuado, y la otra capa que comprende un agente hinchable en combinación con otros excipientes. En otra realización de la presente invención, una composición farmacéutica sólida para administración oral contiene un sistema in-lay que es una forma de dosificación especializada que comprende un primer comprimido que contiene uno o más componentes activos que se coloca dentro de un segundo comprimido que comprende excipientes que aseguran la retención gástrica. En este sistema, el comprimido que contiene el componente activo es pequeño y está cubierto por todos los lados excepto al menos un lado con una mezcla de excipiente que comprende polímeros hinchables o un sistema de flotación, o ambos, que asegura la retención gástrica.

En otra realización más de la presente invención, la forma de dosificación puede estar opcionalmente recubierta. Los recubrimientos superficiales se pueden emplear con fines organolépticos (particularmente con olores o sabores desagradables), con fines de etiquetado de fármacos (por ejemplo, un sistema de codificación por colores para formas de dosificación), con fines estéticos, para estabilizar dimensionalmente la forma de dosificación comprimida o para retardar la liberación del fármaco. El recubrimiento de la superficie puede ser cualquier recubrimiento convencional que sea adecuado para uso entérico. El recubrimiento puede realizarse utilizando cualquier técnica convencional que emplee ingredientes convencionales. Un recubrimiento de superficie se puede obtener, por ejemplo, utilizando una película de disolución rápida utilizando polímeros convencionales tales como hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, polimetacrilatos o similares. Los excipientes de recubrimiento y los métodos para utilizarlos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo: McGinity, James W. and Linda A. Felton, Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms, Tercera Edición, Informa Healthcare, 2008.

Además, en otra realización de la presente invención, las composiciones están en forma de multipartículas que incluyen peletes, microesferas, microcápsulas, microperlas, micropartículas o nanopartículas que tienen un tránsito prolongado en el intestino para administrar eficazmente agentes activos que requieren tiempos de retención más prolongados en el tracto intestinal. Los sistemas multiparticulados pueden ser (i) bioadhesivos o mucoadhesivos, retrasando así el tránsito gastrointestinal, o (ii) pueden flotar sobre el contenido gástrico, formando opcionalmente una capa similar a un gel, o (iii) pueden estar recubiertos con una capa o capas externas sensibles al pH que se disuelven en el entorno ligeramente ácido del intestino delgado, o en el entorno neutro a ligeramente básico del íleon (normalmente el segmento intestinal con el pH más alto), o (iv) pueden formarse utilizando un polímero que contiene un fármaco que no es digerible por enzimas humanas pero que es digerible por enzimas producidas por bacterias entéricas, lo que lleva a la liberación del fármaco en el íleon distal y el colon. En una realización, las composiciones de la presente invención, en forma de multipartículas, son gastrorretentivas. Estos sistemas multiparticulados pueden prepararse mediante métodos que incluyen peletización, granulación, secado por pulverización, congelación por pulverización y similares.

Se puede emplear un agente de control de liberación polimérico adecuado en las composiciones de la presente invención. En una realización, el agente de control de liberación polimérico es independiente del pH o dependiente del pH o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el agente de control de liberación polimérico empleado en las composiciones de la presente invención puede ser hinchable o no hinchable. En una realización adicional, los agentes de control de liberación poliméricos que pueden emplearse en las composiciones de la presente invención incluyen derivados de celulosa, sacáridos o polisacáridos, copolímeros de bloques de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno) (poloxámeros), derivados de vinilo o polímeros o copolímeros de los mismos, óxidos de polialquileño y derivados de los mismos, copolímeros maleicos, derivados de ácido acrílico o similares o cualquier combinación de los mismos.

Se pueden construir composiciones de liberación controlada para uso oral para liberar el fármaco activo controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia activa del fármaco. Se pueden aplicar diversas estrategias para obtener una liberación controlada, y de ese modo optimizar la concentración plasmática en función del perfil temporal. En un ejemplo, la liberación controlada se obtiene mediante la selección apropiada de diversos parámetros de formulación e ingredientes, incluidos, por ejemplo, diversos tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. De esta forma, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, tras su administración, libera el fármaco de manera controlada. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias o múltiples, disoluciones oleosas, líquidos, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, polvos y gránulos. En ciertas realizaciones, las composiciones incluyen recubrimientos de polímeros biodegradables, sensibles al pH y/o a la temperatura.

La liberación controlada por disolución o difusión se puede lograr mediante el recubrimiento apropiado de una formulación de comprimidos, cápsulas, peletes o granulados de compuestos, o mediante la incorporación del compuesto en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, cera de glicol, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo,

palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato-butarato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

Alternativamente, ciertos precursores de cisteamina o potenciadores de la generación o absorción de cisteamina in vivo pueden formularse y administrarse como alimentos médicos. Los alimentos médicos están regulados por la FDA de EE. UU. como alimentos, no como fármacos. Se conocen en la técnica métodos para formular alimentos médicos. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. N.º 20100261791, para obtener descripciones de métodos para preparar y administrar compuestos activos en alimentos o bebidas. Nutracia, una empresa de alimentos médicos con sede en los Países Bajos, tiene más de 250 solicitudes de patentes y patentes que describen métodos para combinar agentes farmacológicamente activos con alimentos o bebidas.

### **Recubrimientos**

Las composiciones farmacéuticas formuladas para administración oral, tales como comprimidos o cápsulas de la presente invención, pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una liberación retardada o prolongada. El recubrimiento puede adaptarse para liberar la sustancia activa del fármaco en un patrón predeterminado (por ejemplo, para lograr una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar la sustancia activa del fármaco hasta después del paso por el estómago, por ejemplo mediante el uso de un recubrimiento entérico (por ejemplo, polímeros que son sensibles al pH ("liberación controlada por pH"), polímeros con una velocidad lenta o dependiente del pH del hinchamiento, disolución o erosión ("liberación controlada por tiempo"), polímeros que son degradados por enzimas ("liberación controlada por enzimas" o "liberación biodegradable") y polímeros que forman capas firmes que se destruyen por un aumento de la presión ("liberación controlada por presión")). Los recubrimientos entéricos ejemplares que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas descritas aquí incluyen recubrimientos de azúcar, recubrimientos de película (por ejemplo, basados en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o recubrimientos basados en copolímero de ácido metacrílico, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-ftalato de polivinilo, goma laca, y/o etilcelulosa. Además, se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Por ejemplo, el comprimido o cápsula puede comprender un componente de dosificación interna y un componente de dosificación externa, estando esta última en forma de una envoltura sobre la primera. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que su liberación se retrase.

Cuando se utiliza un recubrimiento entérico, es deseable que una cantidad sustancial del fármaco se libere en el tracto gastrointestinal inferior. Como alternativa, se pueden utilizar recubrimientos entéricos permeables para proporcionar un perfil de liberación intermedio entre las formulaciones de liberación inmediata y de liberación retardada. Por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. 20080020041 A1 describe formulaciones farmacéuticas recubiertas con un material entérico que libera al menos una parte de un ingrediente activo al entrar en contacto con el fluido gástrico, y el resto se libera al entrar en contacto con el fluido intestinal.

Además de los recubrimientos que efectúan una liberación retardada o prolongada, las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de la sustancia activa del fármaco). El recubrimiento se puede aplicar sobre la forma de dosificación sólida de una manera similar a la descrita en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, vols. 5 y 6, Eds. Swarbrick y Boyland, 2000.

Para formulaciones de liberación controlada, el componente activo de la composición puede estar dirigido a su liberación en el intestino delgado. La formulación puede contener un recubrimiento entérico de modo que la composición sea resistente al entorno de pH bajo que se encuentra en el estómago, pero sensible al entorno de pH más alto del intestino delgado. Para controlar la liberación del componente activo en el intestino delgado, se puede emplear una formulación multiparticulada para evitar la liberación simultánea del componente activo. Una composición multiparticulada puede incluir una pluralidad de núcleos recubiertos entéricos individuales que incluyen una fase hidrófoba que contiene un precursor de cisteamina, o una sal del mismo, disperso en un gel a base de celulosa microcristalina y una fase hidrófila que contiene un hidrogel. La celulosa microcristalina (MCC) funciona como un polímero de control de liberación para el precursor de cisteamina, o una sal del mismo, evitando la liberación de dosis y estabilizando el precursor de cisteamina, o una sal del mismo, mientras los núcleos se disuelven o erosionan en el intestino. Se pueden combinar dos o más composiciones multiparticuladas que difieren con respecto a los excipientes en el núcleo o la capa de recubrimiento en una composición farmacéutica (por ejemplo, una cápsula, un polvo o un líquido) para liberar ingredientes activos (por ejemplo, precursores de

cisteamina) durante un período de tiempo más largo. Alternativamente, se puede lograr el mismo efecto utilizando diferentes concentraciones de excipientes en dos o más lotes de micropartículas, y combinando después las micropartículas de diferentes lotes en una relación elegida (por ejemplo, 1:1) para lograr un perfil de liberación del fármaco específico.

La composición puede incluir una pluralidad de núcleos recubiertos entéricos individuales que contienen alrededor de 15% p/p a alrededor de 70% p/p de precursor de cisteamina, o una sal del mismo, alrededor de 25% p/p y alrededor de 75% p/p de celulosa microcristalina, y alrededor de 2% p/p y alrededor de 15% p/p de metilcelulosa, en el que el % p/p es el % p/p de los núcleos recubiertos entéricos.

En algunos casos, incluir una capa de subrecubrimiento proteico continua que cubra los núcleos individuales y separe los núcleos individuales de sus respectivos recubrimientos entéricos puede ser ventajoso debido a que la capa de subrecubrimiento proteico mejora aún más la estabilidad del precursor de cisteamina, o una sal del mismo. El subrecubrimiento proteico continuo está adaptado para evitar que el precursor de cisteamina, o una sal del mismo, se mezcle con el recubrimiento entérico. Algunos subrecubrimientos proteicos preferidos tienen los siguientes atributos: el subrecubrimiento puede comprender una película de gelatina adherida al núcleo y/o el subrecubrimiento puede comprender un gel proteico seco.

En una realización particular, los núcleos con recubrimiento entérico liberan no más de alrededor del 20% del precursor de cisteamina, o una sal del mismo, dentro de alrededor de dos horas de ser colocados en una disolución de HCl 0,1 N y, posteriormente, no menos de alrededor del 85% del precursor de cisteamina, o una sal del mismo, dentro de alrededor de ocho horas de ser colocados en un entorno de pH sustancialmente neutro.

Preferiblemente, los núcleos con cubierta entérica son esferoidales, y no tienen más de 3 mm de diámetro.

Para evitar la adherencia de composiciones administradas por separado en el estómago, las composiciones de la invención pueden recubrirse con un agente antiadherente. También se pueden utilizar antiadherentes para evitar que las micropartículas se adhieran entre sí. Por ejemplo, las composiciones pueden recubrirse con una fina capa externa de polvo de celulosa microcristalina. Alternativamente, se puede prevenir la adherencia recubriéndolo con un polímero que sea insoluble en el jugo gástrico pero permeable e hinchable. Por ejemplo, se ha demostrado que una dispersión de poliácido al 30% (por ejemplo, Eudragit NE30D, Evonik Industries) previene la adherencia de minicomprimidos flotantes en el estómago (véase Rouge et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 43:165 (1997)).

Las formas comerciales de los excipientes enumerados utilizados en recubrimientos entéricos incluyen, por ejemplo, varias marcas de polimetacrilatos (un grupo químicamente heterogéneo de compuestos que incluye copolímero de metacrilato de amonio, copolímero de metacrilato de amonio, dispersión de copolímero de acrilato de etilo, dispersión de copolímero de metacrilato de metilo, copolímero de ácido metacrílico y dispersión de copolímero de ácido metacrílico) que se venden como líneas de productos por empresas que incluyen, sin limitación, Ashland, BASF Fine Chemicals (línea de productos Kollicoat), ColorCon (línea de productos Acryl-EZE), Eastman Chemical (línea de productos Eastacryl) y Evonik Industries (línea de productos Eudragit).

### **Formulaciones para liberación de fármacos en el íleon y el colon**

En algunas realizaciones, se pueden utilizar formulaciones dirigidas al íleon y/o al colon para administrar precursores de cisteamina al íleon distal y al colon. (La expresión "dirigida al colon" se utiliza aquí para referirse tanto a las formulaciones dirigidas al íleon como a las formulaciones dirigidas al colon; cualquier composición que comience a liberar el fármaco en el íleon probablemente también lo libere en el colon, y es probable que parte del fármaco liberado en el íleon llegue al colon). Las ventajas de la administración de fármacos de las composiciones dirigidas al colon incluyen el contacto prolongado con el epitelio del intestino grueso y la presencia de bacterias colónicas que pueden aprovecharse para la administración en un sitio específico.

Desde una perspectiva farmacocinética, la absorción colónica de cisteamina es deseable debido a que, debido a su vida media extremadamente corta, la cisteamina debe producirse continuamente en el tracto gastrointestinal (y absorberse) para mantener los niveles sanguíneos en el intervalo terapéutico. Una composición farmacéutica ingerida (si no es una composición gastrorretentiva) puede llegar al colon de tres a cinco horas después de la ingestión (en promedio, en la mayoría de los sujetos) si se ingiere en ayunas, o de seis a diez horas (en promedio, en la mayoría de los sujetos) después de la ingestión con alimentos. La única forma de mantener los niveles de cisteamina en sangre dentro del intervalo terapéutico después de que la forma de dosificación llega al colon es garantizar que la cisteamina se genere y se absorba en el colon. Algunos precursores de cisteamina liberados en el intestino delgado pueden pasar intactos al colon y degradarse a cisteamina en el colon. Sin embargo, para proporcionar una generación robusta de cisteamina en el colon, los precursores de cisteamina deben formularse para su liberación en el colon (o íleon), en el que pueden degradarse a cisteamina y absorberse. Las composiciones dirigidas al colon no están destinadas a utilizarse solas como terapia para enfermedades sensibles a la cisteamina, sino más bien para complementar formulaciones dirigidas a otras áreas del tracto gastrointestinal.

Se han desarrollado ampliamente dos enfoques para la administración dirigida al colon, y se describen a continuación.

El primer enfoque implica la explotación de enzimas producidas en el colon por bacterias entéricas. Las bacterias entéricas pueden digerir una variedad de polímeros que no son digeribles por las enzimas humanas presentes en la saliva, el jugo gástrico, el líquido intestinal o el jugo pancreático. Las composiciones farmacéuticas que contienen dichos polímeros no se pueden digerir -y por lo tanto los ingredientes activos mezclados con los polímeros no pueden escapar- hasta que encuentran enzimas producidas por bacterias entéricas en el íleon distal (en el que la densidad de bacterias comienza a aumentar) o el colon (en el que puede haber 1.000.000.000.000 de bacterias por mililitro de contenido del colon).

Un precursor de cisteamina y/u otro ingrediente activo (por ejemplo, un potenciador de la generación o absorción de cisteamina in vivo) se puede mezclar con un polímero que retarda la liberación del fármaco y sólo es digerible (en el tracto gastrointestinal humano) por enzimas producidas por bacterias entéricas. Los polímeros utilizados para la administración de fármacos dirigida al colon basada en la degradación selectiva por bacterias entéricas incluyen hidrogeles de dextrano (Hovgaard, L. y H. Brondsted, J. Controlled Rel. 36:159 (1995)), condroitina reticulada (Rubinstein et al., Pharm. Res. 9:276 (1992)) e hidrogeles que contienen restos azoaromáticos (Brondsted, H. y J. Kopoecek, Pharm Res. 9:1540 (1992); y Yeh et al., J. Controlled Rel. 36:109 (1995)).

Enlace covalente de un fármaco con un portador para formar un precursor que es estable en el estómago y el intestino delgado y libera el fármaco en el intestino grueso tras la escisión enzimática por la microflora intestinal; ejemplos de estos precursores incluyen conjugados azoicos, conjugados de ciclodextrina, conjugados de glicósidos, conjugados de glucuronato, conjugados de dextrano, conjugados polipeptídicos y poliméricos. El principio básico es que el enlace covalente que une el fármaco al portador debe ser indigerible para las enzimas humanas, pero digerible para las enzimas bacterianas entéricas.

El segundo enfoque implica la explotación del alto pH en el íleon con respecto a otras partes del tracto gastrointestinal. En sujetos sanos, el pH en el tracto gastrointestinal aumenta desde el duodeno (aproximadamente pH 5,5 a 6,6 desde el duodeno proximal al distal) hasta el íleon terminal (aproximadamente pH 7 - 7,5), luego disminuye en el ciego (alrededor de pH 6,4) y luego aumenta nuevamente desde el lado derecho al izquierdo del colon con un valor final de alrededor de pH 7.

Las composiciones pueden recubrirse con un polímero sensible al pH que se disuelve sólo a un pH neutro a ligeramente alcalino (por ejemplo, por encima de pH 6,5, por encima de pH 6,8 o por encima de pH 7). Debajo del recubrimiento sensible al pH hay una formulación de liberación sostenida desde la cual el fármaco se libera lentamente por difusión, erosión o una combinación. Este enfoque se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.900.252.

Los métodos de direccionamiento al colon basados en pH y bacterias entéricas se pueden combinar. Véase, por ejemplo: Naeem et al., Colloids Surf B Biointerfaces S0927 (2014). El estudio describe nanopartículas recubiertas formadas utilizando polímeros digeribles por bacterias. Otra tecnología que combina el pH y la digestión con enzimas bacterianas para administrar cápsulas rellenas de líquido que contienen fármacos al colon se describe en la publicación de patente de EE. UU. N.º 20070243253, que describe formulaciones que utilizan polímeros que incluyen almidón, amilosa, amilopectina, quitosano, sulfato de condroitina, ciclodextrina, dextrano, pululano, carragenina, escleroglucano, quitina, curdlano y levano, junto con recubrimientos sensibles al pH que se disuelven por encima de un pH de alrededor de 5 o mayor.

Otros enfoques para la administración de fármacos dirigidos al colon emplean: (i) sistemas de liberación prolongada, en los que una vez que una formulación multicapa pasa el estómago, la capa exterior comienza a disolverse y, en función del grosor y la composición de los recubrimientos, el fármaco se libera después de un tiempo de retraso de 3-5 horas, que es alrededor del tiempo de tránsito del intestino delgado; (ii) polímeros sensibles a la oxidación-reducción, en los que una combinación de polímeros azoicos y disulfuros proporciona la liberación del fármaco en respuesta al bajo potencial de oxidación-reducción del colon; (iii) polímeros bioadhesivos que se adhieren selectivamente a la mucosa colónica, retardando el tránsito de la forma de dosificación para permitir la liberación del fármaco; y/o (iv) administración de fármacos controlada osmóticamente, en la que el fármaco se libera a través de una membrana semipermeable debido a la presión osmótica.

El libro "Oral Colon-Specific Drug Delivery" de David R. Friend (CRC Press, 1992) proporciona una descripción general de los métodos de administración de fármacos específicos para el colon más antiguos (muchos de los cuales aún son útiles), tales como los sistemas de administración basados en dextrano, la administración basada en glicósidos/glicosidasas, los profármacos azo-enlazados, los copolímeros de hidroxipropilmetacrilamida y otras matrices para la administración en el colon. La administración de fármacos dirigida al colon ha sido revisada más recientemente, por ejemplo por: Bansal et al., Polim Med. 44:109 (2014). Los enfoques recientes incluyen el uso de nuevos polímeros digeribles sólo por enzimas producidas por bacterias entéricas, incluidos polímeros naturales encontrados en una variedad de plantas, así como micropelotas, nanopartículas y otras micropartículas.



La presente invención definida en las reivindicaciones se refiere a nuevas composiciones para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos sensibles a la cisteamina. El tratamiento consiste en la administración oral de precursores de cisteamina, convertibles en cisteamina en el tracto gastrointestinal. Una clase importante de precursores de cisteamina son los disulfuros mixtos que, tras la reducción in vivo, proporcionan dos tioles. Ambos

tioles pueden convertirse en cisteamina in vivo, o sólo uno. Los precursores de cisteamina en los que ambos tioles son convertibles en cisteamina son una clase preferida de agentes terapéuticos para enfermedades que incluyen cistinosis, fibrosis quística, malaria, e infecciones virales y bacterianas. Los ejemplos no limitativos de dichos disulfuros mixtos incluyen cisteamina-panteteína y cisteamina-4-fosfopanteteína.

Para algunas otras enfermedades, se puede seleccionar un segundo tiol, no convertible en cisteamina, para complementar o aumentar los efectos terapéuticos de la cisteamina. En ciertas realizaciones, los precursores de cisteamina disulfuro mixto para la terapia de enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas incluyen un segundo tiol del siguiente grupo: N-acetilcisteína, éster metílico de cisteína, éster etílico de cisteína, gamma glutamilcisteína, éster etílico de gamma glutamilcisteína, homocisteína, cisteína y ácido dihidrolipoico.

Las combinaciones de precursores de cisteamina disulfuro mixto brindan mayor flexibilidad para abordar la fisiopatología de enfermedades específicas, o para adaptar los regímenes de tratamiento para tener en cuenta la variación entre pacientes en el estado de la enfermedad, la actividad de la enfermedad, el metabolismo de los fármacos o la sensibilidad a los fármacos. Por ejemplo, un disulfuro mixto en el que ambos tioles son convertibles en cisteamina in vivo puede coadministrarse con un disulfuro mixto en el que sólo un tiol es convertible en cisteamina in vivo. La relación de los dos tipos de disulfuro mixto puede variar de alrededor de 1:1 a alrededor de 1:10.

Los precursores de cisteamina pueden coadministrarse con agentes que mejoran los procesos bioquímicos necesarios para (i) la conversión in vivo del precursor en cisteamina y (ii) la posterior absorción de cisteamina por los enterocitos. Estos potenciadores pueden seleccionarse y dosificarse para aumentar o complementar los efectos terapéuticos de un precursor de cisteamina en una enfermedad particular, o para individualizar un régimen terapéutico para un paciente específico. Por ejemplo, los precursores de cisteamina disulfuro pueden coadministrarse con agentes reductores que mejoran la reducción del enlace de disulfuro. El agente reductor puede ser un compuesto fisiológico tal como los tioles glutatona, cisteína, homocisteína, gamma-glutamilcisteína, o puede ser un análogo de uno de esos compuestos tales como N-acetilcisteína, éster metílico de cisteína, éster etílico de cisteína o éster etílico de gamma glutamilcisteína, o puede ser un ditiol tal como ácido dihidrolipoico, o un agente reductor no tiol tal como vitamina C (ácido ascórbico).

La cisteamina y otros tioles liberados de los disulfuros mixtos de la invención pueden proporcionar efectos terapéuticos a través de cualquiera de varios mecanismos.

La cisteamina tiene efectos químicos y farmacológicos pleiotrópicos en el cuerpo, incluyendo (i) antioxidante, (ii) agente reductor y participante en los intercambios tiol-disulfuro, (iii) inhibidor enzimático y (iv) quelante de cobre. La cisteamina también modula los niveles plasmáticos de ciertas sustancias químicas y proteínas asociadas a enfermedades. Por ejemplo, la cisteamina: (v) reduce los triglicéridos y el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad, cuyos niveles elevados se han asociado con enfermedades cardíacas y aterosclerosis, y (vi) reduce la adiponectina total, así como la abundancia relativa de multímeros de adiponectina, cuyos niveles elevados se asocian con el síndrome metabólico y otras enfermedades. La cisteamina también tiene efectos (v) antiparasitarios, (vi) antibacterianos y (vii) antivirales, así como (viii) antifibróticos, todos a través de mecanismos inciertos.

(i) La cisteamina puede actuar directamente como antioxidante, neutralizando las especies reactivas de oxígeno (ROS) al proporcionar un grupo reductor.

(ii) La cisteamina puede aumentar el nivel de otros antioxidantes fisiológicos, incluido el glutatona (GSH), el principal antioxidante del cuerpo, y la cisteína, un antioxidante importante en el suero y en el tracto gastrointestinal. Las propiedades antioxidantes y restauradoras de GSH de la cisteamina son relevantes para una amplia gama de enfermedades en las que niveles elevados de lípidos oxidados, proteínas o moléculas pequeñas, a menudo acompañados de niveles bajos de GSH, contribuyen a la patogénesis. Las enfermedades en las que los productos de oxidación anormales son factores contribuyentes incluyen enfermedades neurodegenerativas, fibrosis quística y función inmune deteriorada asociada con la infección por VIH (véase Herzenberg et al., Proc Natl Acad Sci USA. 94:1967 (1997); y Bhaskar et al., J Biol Chem. 290:1020 (2015)). La GSH, un tripéptido, se degrada a sus aminoácidos constituyentes por proteasas en el intestino. Por lo tanto, la GSH oral no es una forma eficiente de suministrar GSH al cuerpo. La terapia con cisteamina es una forma eficaz de aumentar los niveles de GSH.

(iii) La cisteamina puede reducir químicamente o participar en reacciones de intercambio de tiol-disulfuro con glutatona que contiene disulfuro y cisteína que contiene disulfuros (incluida la cistina), produciendo así glutatona y cisteína libres, que a su vez pueden reducir otros compuestos oxidados o neutralizar especies reactivas de oxígeno. La cisteína libre (por ejemplo, la generada a partir del intercambio cisteamina-

cistina) también se puede utilizar en la síntesis de glutatona. Además de promover los intercambios de tiol-disulfuro con cistinas y cisteínas libres, la cisteamina también puede interactuar con restos de cistina y cisteinilo en proteínas, incluidas una variedad de proteínas detectoras de oxidorreducción que controlan los mecanismos de defensa antioxidante celular. La cisteamina también inhibe la acumulación patológica de cistina en la cistinosis a través de una reacción de intercambio tiol-disulfuro con la cistina lisosomal para formar cisteína y disulfuro mixto de cisteína-cisteamina, los cuales pueden salir de los lisosomas en ausencia de un gen de cistinosina funcional. (El disulfuro de cisteína-cisteamina es transportado por un transportador de lisina/proteína heptahelicoidal codificado por el gen PQLC2).

- (iv) La cisteamina inhibe la transglutaminasa tisular (también llamada transglutaminasa 2 o TG2), una enzima citoplasmática implicada en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. La cistamina, el disulfuro de dos cisteaminas, también es un inhibidor de TG2, y se ha probado más ampliamente que la cisteamina en modelos de enfermedad de Huntington. Sin embargo, en el entorno fuertemente reductor del citoplasma, prácticamente toda la cistamina se reduce a cisteamina. Por lo tanto, la cisteamina es probablemente la forma activa de la cistamina (véase: Jeitner et al., *Biochem Pharmacol.* 69:961 (2005)). La cistamina mejora la función motora y prolonga la vida útil en varios modelos de ratones con enfermedad de Huntington. Estos efectos beneficiosos pueden estar mediados por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que aumenta con el tratamiento con cistamina. La cistamina también inhibe la enzima citoplasmática caspasa-3, probablemente a través de la creación de cisteamina. El producto patógeno anormal del gen de la enfermedad de Huntington, la huntingtina, induce la activación de la caspasa-3 y la consiguiente liberación del citocromo c de las mitocondrias en las células cultivadas, lo que en última instancia conduce a la apoptosis. En concentraciones altas (por ejemplo, 25 milimolar), la cisteamina también inhibe las metaloproteinasas de la matriz (MMP), un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc con funciones fisiológicas en la angiogénesis, la cicatrización de heridas y la remodelación de tejidos. Las MMP se sobreexpresan en algunos tipos de cáncer, y contribuyen a la invasión y la metástasis al degradar la matriz extracelular. La cisteamina inhibe la migración y la invasión de células de cáncer pancreático in vitro y el crecimiento de xenoinjertos de cáncer pancreático in vivo (Fujisawa et al., *PLoS One.* 7:e34437 (2012)).
- (v) La cisteamina, al igual que otros tioles, es un potente quelante de cobre, que puede ser causa de importantes efectos secundarios en algunos pacientes con cistinosis, que ya tienen niveles bajos de cobre y ceruloplasmina como consecuencia de su insuficiencia renal asociada a la enfermedad. Sin embargo, la quelación del cobre puede ser terapéuticamente beneficiosa en enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer.
- (vi) La cisteamina reduce los niveles de proteínas oxidadas e inhibe la proliferación de miofibroblastos a través de mecanismos independientes de TGF-beta en dos modelos de ratón con enfermedad renal crónica. Los miofibroblastos producen matriz extracelular, incluido colágeno, y la proliferación anormal de miofibroblastos se asocia con cicatrización, contracción y pérdida de la función orgánica en una variedad de enfermedades fibróticas crónicas, incluidas enfermedades del riñón (por ejemplo, enfermedad de Alport, glomeruloesclerosis focal y segmentaria), pulmón (por ejemplo, fibrosis quística, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica) y hígado (por ejemplo, enfermedad del hígado por ácidos grasos no alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica y esteatohepatitis alcohólica).
- (vii) La cisteamina inhibe la proliferación del parásito que causa la malaria, *Plasmodium falciparum*, tanto in vitro como en modelos de malaria en ratones, sin modular negativamente las respuestas inflamatorias del hospedante. La administración del precursor de cisteamina pantetina previene el síndrome cerebral en ratones infectados con la cepa ANKA de *Plasmodium berghei*. La cisteamina también potencia la artemisinina, una familia de antipalúdicos de importancia terapéutica. En algunas realizaciones, se utilizan combinaciones de precursores de artemisinina-cisteamina para tratar la malaria, incluidas las cepas emergentes de *Plasmodium* resistentes a la artemisinina, así como la malaria cerebral. Los precursores de cisteamina preferidos para la terapia de la malaria son aquellos a partir de los cuales se pueden generar dos cisteaminas; es decir, precursores de cisteamina disulfuro en los que ambos tioles generados durante la reducción son convertibles en cisteamina. Los precursores de cisteamina disulfuro ejemplares incluyen aquellos formados mediante la unión de cisteamina y panteteína, o cisteamina y 4-fosfopanteteína. Los potenciadores preferidos de la reducción de enlaces de disulfuro para ser coadministrados con precursores de cisteamina disulfuro incluyen los tioles panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A y coenzima A, cada uno de los cuales es en sí mismo un precursor de cisteamina.
- (viii) La cisteamina promueve la multimerización de la adiponectina, una molécula de señalización producida por los adipocitos. Los niveles bajos de adiponectina se han asociado con la resistencia a la insulina y la inflamación, y pueden contribuir a la patogénesis de la diabetes tipo I y tipo II. La adiponectina de alto peso molecular puede ayudar a mediar la señalización de la insulina. Los pacientes pediátricos con enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) tratados con cisteamina durante 24 semanas presentaron niveles aumentados de multímeros de adiponectina de alto peso molecular. La cisteamina puede ser terapéuticamente útil en afecciones asociadas con niveles bajos de adiponectina, incluidas

enfermedades metabólicas resistentes a la insulina, tales como la diabetes. Además de la adiponectina total, la distribución de los multímeros de adiponectina puede explicar independientemente la variabilidad en los rasgos metabólicos entre individuos y poblaciones.

- 5 (ix) La cisteamina tiene efectos antivirales pleiotrópicos. Por ejemplo, puede inhibir la replicación del VIH al interferir con la producción de partículas virales infecciosas, al bloquear la formación de ADN proviral o al formar disulfuros mixtos con restos de cisteína de proteínas, modificando así la arquitectura del puente de disulfuro de la membrana celular y limitando la adsorción del virus. La cisteamina también puede inhibir el crecimiento de los tipos A, B y C del virus de la gripe, incluidos los subtipos del virus de la gripe aviar tales como H5N1, H1N2, H2N2, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2 y H10N7. La cisteamina también puede inhibir la proliferación de cepas del virus de la gripe española, asiática y de Hong Kong, así como de los virus de la gripe porcina, equina y canina. La patente de EE. UU. N.º 8.415.398 describe usos antivirales de la cisteamina.

- 15 En enfermedades específicas, la cisteamina puede actuar a través de uno de los mecanismos de acción anteriores, a través de múltiples mecanismos, o a través de uno o más mecanismos que aún no se han identificado.

Las enfermedades y trastornos para los que existe evidencia de eficacia de la cisteamina incluyen cistinosis; enfermedad neurodegenerativa; trastornos del desarrollo neurológico, por ejemplo, síndrome de Rett; trastornos mitocondriales, por ejemplo, síndrome de Leigh, MELAS, MERFF, ataxia de Friedreich y afecciones asociadas con mutaciones en el gen POLG, así como algunas formas de autismo; enfermedades fibróticas del riñón (por ejemplo, enfermedad de Alport, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS)), del hígado (por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y esteatohepatitis alcohólica (ASH)) y del pulmón (fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ)); infección parasitaria (por ejemplo, malaria y malaria cerebral); anemia de células falciformes; cáncer; accidente cerebrovascular; infección bacteriana, incluidas bacterias formadoras de biopelículas tal como *Pseudomonas aeruginosa*; infección viral, incluido el virus de la gripe y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA); enfermedades metabólicas, incluido el síndrome metabólico X y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); envenenamiento por metales, incluido el cobre; y protección contra la toxicidad por radiación.

Otros tioles unidos mediante enlaces de disulfuro a la cisteamina o a un compuesto degradable a cisteamina pueden proporcionar una eficacia terapéutica complementaria. Por ejemplo, el disulfuro formado al reaccionar la cisteamina con L-cisteína, o con un derivado de L-cisteína tal como el éster metílico de L-cisteína, el éster etílico de L-cisteína, la N-acetilcisteína, el éster etílico de N-acetilcisteína o la amida de N-acetilcisteína, puede tener una eficacia complementaria en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, o en la quelación y excreción de metales tóxicos.

Las composiciones de la invención proporcionarán un tratamiento mejorado para estas enfermedades al permitir un mejor control de los niveles sanguíneos de cisteamina (es decir, manteniendo la cisteamina en el intervalo terapéutico durante períodos prolongados) y, en el caso de disulfuros mixtos, opcionalmente proporcionando un segundo resto de tiol terapéutico, mejorando así la eficacia y la conveniencia del paciente al tiempo que se reducen los efectos secundarios y el incumplimiento del paciente con la terapia.

### **Enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas incluyen la enfermedad de Huntington (HD), la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Alzheimer (AD) y la neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro (NBIA), también conocida como síndrome de Hallervorden-Spatz. Estas enfermedades, que son causadas en diversos grados por mutaciones genéticas conocidas, se caracterizan por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida la muerte neuronal. La HD es atribuible enteramente a la expansión de un triplete CAG en el exón 1 del gen HTT, mientras que la NBIA está asociada a mutaciones en unos 10 genes, siendo el más común el PANK2 (30-50% de los casos). Una fracción más pequeña de casos de PD y AD son de origen genético. Las enfermedades neurodegenerativas también se asocian con una variedad de anomalías en el plegamiento incorrecto de proteínas (por ejemplo, agregación de alfa-sinucleína, hiperfosforilación y agregación de proteína tau y agregación de proteína beta amiloide), así como una mala regulación de las rutas de degradación de proteínas (por ejemplo, la ruta ubiquitina-proteasoma y las rutas de autofagia-lisosoma), daño a la membrana, disfunción mitocondrial, defectos en el transporte axonal, o mala regulación de las rutas de muerte celular programada (por ejemplo, apoptosis y autofagia).

Las células de la enfermedad de Huntington (HD) tienen niveles muy bajos de la enzima cistationina gamma-liasa (CSE), un importante generador de cisteína a partir de la cistationina. El defecto ocurre a nivel transcripcional, y puede ser un mediador importante de la neurodegeneración. La administración de cisteína a los tejidos de HD y a un modelo animal de HD revierte el estrés oxidativo y otras anomalías. También existe evidencia de la eficacia de la cisteína en otras enfermedades neurodegenerativas, incluida la neurodegeneración con acumulación de hierro, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, y los trastornos del desarrollo neurológico, por ejemplo

el síndrome de Rett y otros trastornos asociados a MECP-2. Sin embargo, la cisteína administrada por vía oral tiene baja biodisponibilidad, y en grandes dosis puede ser tóxica.

La cisteamina atraviesa la barrera hematoencefálica, puede promover la formación de cisteína in vivo (por ejemplo, mediante intercambio tiol-disulfuro con cistina), y puede proporcionar una fuente de azufre para la biosíntesis de cisteína. La cisteamina ha mostrado efectos beneficiosos en tres modelos de ratón diferentes de HD. Cuatro estudios han demostrado efectos beneficiosos en el modelo de ratón R6/2. El modelo de ratón R6/2 de HD contiene un transgén que expresa el exón 1 de un alelo HTT humano mutante con una repetición de triplete CAG muy larga. Los efectos beneficiosos de la cisteamina incluyen la mejora de la pérdida de peso y de las anomalías motoras, y la prolongación de la supervivencia. Un estudio ha demostrado beneficios en el modelo de ratón R6/1, que también contiene un transgén exón-1 con una repetición CAG expandida más pequeña y un fenotipo más leve. También se ha demostrado que la cisteamina es beneficiosa en el modelo de ratón YAC128 de HD, que contiene un gen HTT de longitud completa con una repetición CAG expandida. El mecanismo de acción de la cisteamina es incierto.

En febrero de 2014, Raptor Pharmaceutical Corp. anunció los resultados de un análisis provisional planificado de 18 meses de un ensayo clínico de fase 2/3 de 3 años en curso de RP103 (bitartrato de cisteamina de liberación retardada) en la enfermedad de Huntington. Un total de 96 pacientes con HD se asignaron aleatoriamente al tratamiento con RP103 o placebo. A los pacientes tratados con RP103 se les administró una dosis de 1200 mg de cisteamina/día, aproximadamente la mitad de la dosis utilizada para la cistinosis. Ochenta y nueve pacientes completaron la fase inicial de 18 meses. El análisis de los 96 pacientes inscritos en el ensayo mostró una tendencia positiva hacia un empeoramiento más lento de la Puntuación Motora Total (TMS) en los pacientes tratados con RP103, el criterio de valoración principal del estudio. La progresión de la TMS fue un 32% más lenta en los pacientes tratados con RP103 frente a los tratados con placebo después de 18 meses de tratamiento (4,51 frente a 6,68 respectivamente,  $p = 0,19$ ). En 66 pacientes que no tomaban tetrabenazina simultáneamente, el tratamiento con RP103 dio como resultado un retraso estadísticamente significativo en la progresión de la enfermedad medida mediante TMS en comparación con el grupo de placebo (2,84 puntos frente a 6,78 respectivamente,  $p = 0,03$ ).

Para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o enfermedades psiquiátricas descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + cisteína, cisteamina + N-acetilcisteína, cisteamina + amida de N-acetilcisteína, cisteamina + éster etílico de N-acetilcisteína, cisteamina + 3-mercaptopiruvato, cisteamina + éster etílico de  $\gamma$ -glutamilcisteína, panteteína + cisteína, panteteína + N-acetilcisteína, cisteamina + amida de N-acetilcisteína, panteteína + éster etílico de N-acetilcisteína, panteteína + 3-mercaptopiruvato, panteteína + éster etílico de  $\gamma$ -glutamilcisteína, 2 cisteaminas + ácido dihidrolipoico, 2 panteteínas + ácido dihidrolipoico, cisteamina + panteteína + ácido dihidrolipoico, cisteamina + AD4 + ácido dihidrolipoico, y cisteamina + éster etílico de N-acetilcisteína + ácido dihidrolipoico. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

### **Enfermedades hepáticas**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es la enfermedad hepática crónica más común en los Estados Unidos de América y en Europa, y su incidencia está aumentando rápidamente en la región de Asia-Pacífico. Las estimaciones de prevalencia de NAFLD en los Estados Unidos oscila de 23% a 33,6%. Se ha estimado que hasta el 80% de los pacientes con síndrome metabólico (aproximadamente 47 millones de personas en los Estados Unidos) también pueden tener NAFLD. En algunos pacientes, la NAFLD progresa a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), una enfermedad potencialmente mortal y una causa creciente de insuficiencia hepática, con una prevalencia estimada del 2% al 5,7% en los EE. UU.

No existe un tratamiento aprobado por la FDA para la NAFLD, la NASH o la esteatohepatitis alcohólica (AHS). Los ensayos clínicos de una variedad de agentes, incluida la vitamina E antioxidante, el agente hipoglucemiante metformina y los agonistas de PPAR gamma pioglitazona y rosiglitazona, han arrojado resultados decepcionantes. Los ensayos clínicos de fase 2 del derivado semisintético del ácido biliar, ácido obeticolico, un agonista del receptor X farnesoide, han sido prometedores. Se están probando otras terapias experimentales dirigidas contra la resistencia a la insulina.

En 2011, Dohil et al. (Aliment Pharmacol. Ther. 33:1036 (2011)) realizaron un pequeño ensayo piloto, abierto, de 24 semanas, de cisteamina con cubierta entérica en 11 niños con NAFLD. La cisteamina redujo los niveles séricos de las enzimas hepáticas ALT y AST (índices de daño a los hepatocitos) en 7 de 11 pacientes, un efecto que persistió durante seis meses después de finalizada la terapia. Sin embargo, no hubo efecto sobre el índice de masa corporal (IMC). En este ensayo clínico abierto de fase 2a participaron niños con diagnóstico confirmado por biopsia de NAFLD de moderada a grave y niveles basales de ALT y AST al menos el doble del límite superior de lo normal. Estos pacientes recibieron cisteamina con cubierta entérica dos veces al día durante seis meses, seguido de un período de seguimiento de seis meses después del tratamiento. Entre todos los pacientes hubo una reducción media del 54% en ALT ( $p = 0,004$ ), cumpliendo el objetivo primario predefinido de una reducción de ALT de al menos el 50% desde el valor inicial. Además, los pacientes observaron mejoras en los criterios de valoración secundarios, incluidos AST (reducción promedio del 41%,  $p = 0,02$ ), citoqueratina 18 (reducción promedio del 45%,

p = 0,026) y adiponectina (reducción promedio del 35%, p = 0,023). Se midieron las transaminasas séricas después de la retirada del fármaco, y las reducciones en ALT y AST persistieron durante la fase de 6 meses posterior al tratamiento. Tras este estudio de prueba de concepto realizado por Dohil et al., Raptor Pharmaceutical Corp. inició un ensayo clínico en cooperación con el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK). El ensayo, denominado Bitartrato de cisteamina de liberación retardada para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico en niños (CyNCh), ha inscrito a 160 participantes pediátricos en diez centros de EE. UU. en la Red de Investigación Clínica de NASH patrocinada por el NIDDK.

CyNCh es un ensayo clínico multicéntrico, bi-enmascarado, aleatorizado y controlado con placebo, de fase IIb, del tratamiento con cápsulas de cisteamina de liberación retardada (RP103) (300 mg por vía oral dos veces al día para pacientes ≤ 65 kg, 375 mg por vía oral dos veces al día para pacientes >65-80 kg, o 450 mg por vía oral dos veces al día para pacientes >80 kg) o placebo para niños con NAFLD confirmada histológicamente. Las dosis de cisteamina casi tres veces inferiores a las utilizadas para tratar la cistinosis fueron posibles debido a que el metabolismo de primera pasada de la cisteamina en el hígado elimina alrededor del 40% de la cisteamina absorbida por el intestino, lo que constituye un obstáculo para la terapia sistémica de las enfermedades sensibles a la cisteamina, pero una ventaja en el tratamiento de las enfermedades hepáticas.

Otras enfermedades hepáticas que podrían beneficiarse de la terapia con cisteamina incluyen la esteatohepatitis alcohólica y la insuficiencia hepática aguda o crónica.

Para el tratamiento de enfermedades hepáticas descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + cisteína, cisteamina + N-acetilcisteína, cisteamina + éster etílico de N-acetilcisteína, cisteamina + glutatona, cisteamina + éster monoetilico de glutatona, cisteamina + éster dietílico de glutatona, cisteamina + gamma-glutamyl-cisteína, cisteamina + éster etílico de γ-glutamylcisteína, cisteamina + cisteinilglicina, cisteamina + ácido dihidrolipoico, panteteína + cisteína, panteteína + N-acetilcisteína, panteteína + éster etílico de N-acetilcisteína, panteteína + glutatona, panteteína + éster monoetilico de glutatona, panteteína + éster dietílico de glutatona, panteteína + gamma-glutamyl-cisteína, panteteína + éster etílico de γ-glutamylcisteína, panteteína + cisteinilglicina, panteteína + ácido dihidrolipoico, 2 cisteaminas + ácido dihidrolipoico, 2 panteteínas + ácido dihidrolipoico, 2 N-acetilcisteínas + ácido dihidrolipoico, NAC + cisteamina + ácido dihidrolipoico, cisteamina + panteteína + ácido dihidrolipoico, N-acetilcisteína + panteteína + ácido dihidrolipoico y cisteamina + cisteína + ácido dihidrolipoico. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

### **Malaria**

Se han descrito anteriormente pruebas in vitro e in vivo de la eficacia de la cisteamina en la malaria, tanto como tratamiento único y como potenciador de la artemisinina. El tratamiento con cisteamina podría beneficiar a los pacientes con malaria y malaria cerebral.

La resistencia a la artemisinina se caracteriza por una eliminación significativamente retrasada de los parásitos después del tratamiento con artemisinina. Los derivados de la artemisinina tienen vidas medias del orden de una hora, y por lo tanto requieren una dosificación al menos diaria durante varios días. Por ejemplo, la dosis de co-artemeter (artemeter-lumefantrina) aprobada por la OMS para adultos es 4 comprimidos a las 0, 8, 24, 36, 48 y 60 horas (seis dosis). Debido a su vida media corta similar, la cisteamina podría dosificarse siguiendo el mismo esquema si se utiliza una formulación de liberación inmediata de un precursor de cisteamina, o podría dosificarse cada 12 horas durante 3 días, en dosis similares a las dosis utilizadas para el tratamiento de pacientes con cistinosis, es decir, 2,5 g/día en adultos.

### **Cistinosis**

La cistinosis es una enfermedad de almacenamiento lisosomal poco frecuente, hereditaria, autosómica recesiva. Es la causa más frecuente y potencialmente tratable del síndrome de Fanconi renal hereditario. Si no se trata, la función renal se deteriora rápidamente hacia el final de la primera década de vida, dando lugar a una enfermedad renal terminal que requiere un trasplante de riñón. Dos hitos importantes en el tratamiento de la cistinosis, la terapia de depleción de cistina con cisteamina y el trasplante de aloinjerto renal, han tenido un impacto considerable en el pronóstico de los pacientes con cistinosis. Sin embargo, el cumplimiento de la terapia con cisteamina ha sido un problema importante debido a los efectos secundarios significativos y a un régimen de dosificación estricto cada 6 horas cuando se utiliza la formulación de liberación inmediata de bitartrato de cisteamina (Cystagon®). Recientemente, la FDA en los EE. UU. y la EMA en Europa aprobaron una nueva fórmula con cubierta entérica de bitartrato de cisteamina (Procysbi®) de liberación retardada que se administra dos veces al día para el tratamiento de la cistinosis, y se ha demostrado que es una alternativa segura y eficaz a Cystagon®. La dosis de mantenimiento recomendada de cisteamina (cada 6 horas para la formulación de liberación inmediata, Cystagon®, o dos veces al día para la formulación de liberación retardada, Procysbi®) es 1,3 gramos por metro cuadrado de superficie corporal por día. La dosis puede aumentarse hasta 1,95 gramos/m<sup>2</sup>/día si el nivel de cistina en los glóbulos blancos permanece superior a 1 nanomolar ½ cistina por miligramo de proteína WBC.

Para el tratamiento de las enfermedades de cistinosis descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + alil mercaptano, cisteamina + cisteína, cisteamina + 3-mercaptopiruvato, N-acetilcisteamina + panteteína, N-acetilcisteamina + N-acetilcisteamina, N-acetilcisteamina + alil mercaptano, N-acetilcisteamina + cisteína y N-acetilcisteamina + 3-mercaptopiruvato. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

### **Enfermedades mitocondriales hereditarias**

La cisteamina elimina directamente las ROS, incluidos los radicales libres de superóxido, los aldehídos (productos tóxicos de la peroxidación lipídica) y el peróxido de hidrógeno. La cisteamina también contribuye a la formación de otros tioles reductores mediante la reducción de enlaces de disulfuro y participando en reacciones de intercambio tiol-disulfuro, incluidas reacciones con cistina que producen cisteína y disulfuro mixto de cisteína-cisteamina. Esta reacción aumenta el conjunto de cisteína celular. La cisteína es el sustrato limitante de la velocidad en la biosíntesis de la glutatona (GSH). La glutatona es un tripéptido compuesto por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina.

Los niveles bajos de GSH comprometen la función mitocondrial, lo que puede agravar las enfermedades mitocondriales hereditarias. Salmi et al. (Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2012) estudiaron una cohorte de niños con enfermedades mitocondriales confirmadas bioquímicamente y/o genéticamente, y encontraron niveles alterados de tiol plasmático y estado redox, lo que indica un aumento en el estrés oxidativo y el agotamiento de los suministros de antioxidantes. La capacidad de la cisteamina para aumentar los niveles de tioles celulares, incluida la cisteína, podría abordar potencialmente la deficiencia relativa de tioles en pacientes con enfermedades mitocondriales. La capacidad de la cisteamina para eliminar directamente las ROS puede contrarrestar el aumento del estrés oxidativo y mejorar la función mitocondrial comprometida en estas enfermedades.

En 2014, Raptor Pharmaceuticals inició un ensayo de fase 2, abierto, con aumento de dosis, con su cisteamina de liberación retardada, RP103, administrada hasta 1,3 g/m<sup>2</sup>/día en dos dosis divididas, cada 12 horas, durante hasta 6 meses en pacientes con síndrome de Leigh y otras enfermedades mitocondriales hereditarias.

Entre las enfermedades mitocondriales hereditarias ejemplares se incluyen la ataxia de Friedreich, la neuropatía óptica hereditaria de Leber, la epilepsia mioclónica y las fibras rojas rasgadas, la encefalomiopatía mitocondrial, la acidosis láctica, y el síndrome similar al accidente cerebrovascular (MELAS), el síndrome de Kearns-Sayre, la encefalopatía necrosante subaguda (síndrome de Leigh), y las miocardiopatías mitocondriales y otros síndromes debidos a múltiples delecciones del ADN mitocondrial. Otras enfermedades mitocondriales incluyen debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP), oftalmoplejía externa progresiva (PEO), y enfermedad del complejo I, enfermedad del complejo II, enfermedad del complejo III, enfermedad del complejo IV y enfermedad del complejo V, que se relacionan con la disfunción de los complejos OXPHOS. Y también, mutaciones en el gen POLG así como algunas formas de autismo.

Para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + 3-mercaptopiruvato, cisteamina + ácido dihidrolipoico, 2 cisteaminas + ácido dihidrolipoico, 2 panteteínas + ácido dihidrolipoico, cisteamina + panteteína + ácido dihidrolipoico, cisteamina + N-acetilcisteamina + ácido dihidrolipoico, y cisteamina + panteteína + ácido dihidrolipoico. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

### **Fibrosis quística y otras enfermedades respiratorias crónicas**

La fibrosis quística (FQ) es causada por mutaciones de pérdida de función en el gen CFTR, que codifica un canal de cloruro regulado por AMPc expresado en una variedad de células epiteliales. La función de CFTR defectuosa conduce a manifestaciones clínicas importantes, incluida la inflamación pulmonar crónica con mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas del tracto respiratorio, disfunción pancreática e infertilidad masculina. Una mutación por delección de tres bases,  $\Delta F508$ , es responsable de alrededor del 70-90% de los casos de FQ en el norte de Europa y América del Norte.  $\Delta F508$ -CFTR puede retener la actividad parcial del canal de cloruro si es rescatado en la membrana plasmática por moléculas correctoras, pero en este caso,  $\Delta F508$ -CFTR se recicla rápidamente desde la membrana plasmática y se desvía a la degradación lisosomal. Por lo tanto, estabilizar  $\Delta F508$ -CFTR en la membrana plasmática sigue siendo una tarea desafiante. La pérdida de CFTR funcional induce la reticulación de BECN1 mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) y por transglutaminasa 2 y el secuestro de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PtdIns3K) clase III dentro de los agosomas intracelulares, lo que conduce a la inflamación pulmonar. La cistamina puede restaurar la función de BECN1 y la autofagia, reducir la acumulación de SQSTM1 y frenar la inflamación en células humanas y en las vías respiratorias de modelos de ratón homocigotos para la mutación  $\Delta F508$ -CFTR. Además, la administración de cistamina puede rescatar el tráfico intracelular y estabilizar un  $\Delta F508$ -CFTR completamente funcional en la membrana plasmática de las células epiteliales,

complementando así los efectos beneficiosos de las moléculas correctoras de CFTR. Los efectos de la cisteamina en el rescate de la autofagia y el control de la inflamación se extienden mucho después de la suspensión del fármaco, pero son anulados por el agotamiento de CFTR durante la abstinencia. La cisteamina (Lynovex® de Novabiotics®) demostró una actividad mucolítica al menos comparable a la de los agentes mucolíticos actualmente disponibles. La cisteamina fue bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* y otros patógenos de la FQ. La actividad de la cisteamina no fue sensible a las altas concentraciones iónicas características del pulmón con FQ. La cisteamina previno la formación de biopelículas establecidas de *P. aeruginosa*, y las interrumpió. La cisteamina fue sinérgica con los antibióticos convencionales para la FQ, revirtiendo la resistencia a los antibióticos de los patógenos bacterianos de la FQ. Una forma oral (cápsula de gel) de Lynovex® ha completado los ensayos de fase IIa. Novabiotics está desarrollando Lynovex para la fibrosis quística, y también para la EPOC y otras enfermedades respiratorias crónicas como tratamiento único con efectos mucolíticos y antimicrobianos.

Para el tratamiento de las enfermedades pulmonares descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + alil mercaptano, cisteamina + cisteína, cisteamina + 3-mercaptopiruvato, N-acetilcisteamina + panteteína, N-acetilcisteamina + N-acetilcisteamina, N-acetilcisteamina + alil mercaptano, N-acetilcisteamina + cisteína y N-acetilcisteamina + 3-mercaptopiruvato. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

### **Enfermedades renales**

La cisteamina fue eficaz en dos modelos de fibrosis renal en ratones: estenosis ureteral y lesión por isquemia/reperfusión renal (Okamura et al., J. Am. Soc. Nephrol. 25:43 (2014)). Estos resultados sugieren acciones antifibróticas previamente no reconocidas de la cisteamina a través de mecanismos independientes de TGF-β, incluida la reducción del estrés oxidativo y la atenuación de la respuesta de los miofibroblastos a la lesión renal.

La fibrosis es también una de las principales manifestaciones de formas genéticas de enfermedad glomerular, incluida la glomerulosclerosis focal y segmentaria, el síndrome de Alport y la enfermedad por membrana basal delgada.

Para el tratamiento de las enfermedades renales descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + alil mercaptano, cisteamina + cisteína, cisteamina + 3-mercaptopiruvato, N-acetilcisteamina + panteteína, N-acetilcisteamina + N-acetilcisteamina, N-acetilcisteamina + alil mercaptano, N-acetilcisteamina + cisteína y N-acetilcisteamina + 3-mercaptopiruvato. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

El Ejemplo 10 describe un estudio farmacocinético en ratas de un precursor de cisteamina en el que los niveles renales de cisteamina después de la administración de un precursor de cisteamina fueron mucho mayores 10,5 horas después de la administración de la dosis que los informados después de la administración de bitartrato de cisteamina (Dohil et al. Clin. Pharmacol. Drug Dev. 4:170 (2012)).

### **Enfermedades hereditarias causadas por la mutación de arginina a cisteína**

Ciertas enfermedades hereditarias pueden tratarse utilizando composiciones de la invención. Por ejemplo, las mutaciones que causan enfermedades incluyen cambios en la secuencia de ADN que alteran el codón para arginina al codón para cisteína. Un subconjunto de estas mutaciones ocurren en proteínas que conservan una función parcial, o que como mínimo son lo suficientemente estables para ser sintetizadas completamente por los ribosomas y transportadas a su destino normal (por ejemplo, la membrana plasmática, las mitocondrias, el núcleo, etc.). La cisteamina puede formar un enlace de disulfuro con el resto de cisteína aberrante y, al hacerlo, imitar a la arginina hasta cierto punto, restaurando así en cierto grado la función normal de la proteína (por ejemplo, véase Gahl et al. Am J Med Genet 20:409 (1985)). Por lo tanto, cualquier enfermedad hereditaria con un cambio de arginina a cisteína es candidata a la terapia con precursores de cisteína. Estas enfermedades incluyen la hemofilia A, debida a la mutación de arginina a cisteína en el gen del factor VIII; la paraplejía espástica autosómica dominante pura, debida a la mutación de arginina a cisteína en el gen CPT1C; la ataxia espinocerebelosa 35, debida a la mutación de arginina a cisteína en el gen TGM6; y muchas otras enfermedades.

Los niveles sostenidos de cisteína posibles con los precursores y potenciadores de cisteína abordan mejor la necesidad de cisteílinación continua de proteínas mutantes.

Para el tratamiento de enfermedades hereditarias causadas por la mutación de arginina a cisteína descritas aquí, el precursor de cisteína se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteína + panteteína, cisteína + N-acetilcisteína, cisteína + alil mercaptano, cisteína + cisteína, cisteína + 3-mercaptopiruvato, N-acetilcisteína + panteteína, N-acetilcisteína + N-acetilcisteína, N-acetilcisteína + alil mercaptano, N-acetilcisteína + cisteína, y N-acetilcisteína + 3-mercaptopiruvato. El régimen de

tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

### **Enfermedades cardiovasculares**

5

La enfermedad cardíaca debida a la aterosclerosis asociada a la hipercolesterolemia crónica y la enfermedad cardíaca isquémica son tratables con precursores de cisteamina.

10

Para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + coenzima A, N-acetilcisteamina + coenzima A, panteteína + coenzima A, desfosfo-coenzima A + coenzima A, coenzima A + coenzima A, cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + panteteína, cisteamina + bucilamina, panteteína + bucilamina, panteteína + ácido dihidrolipoico, coenzima A + ácido dihidrolipoico, 2 cisteaminas + bucilamina, 2 cisteaminas + ácido dihidrolipoico, cisteamina + panteteína + bucilamina, y cisteamina + panteteína + ácido dihidrolipoico. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

15

### **Trastornos del desarrollo neurológico**

20

Los trastornos del desarrollo neurológico, incluido el síndrome de Rett y otros trastornos asociados a MECP2, se pueden tratar con precursores de cisteamina.

### **Otras enfermedades**

25

La exposición de eritrocitos de pacientes con anemia de células falciformes a la cisteamina provocó una marcada inhibición de la drepanocitosis en condiciones hipóxicas, una disminución de la concentración de hemoglobina corpuscular media, y un aumento significativo de la afinidad por el oxígeno. La afinidad por el oxígeno de los eritrocitos tratados con cisteamina dependía menos de su concentración de hemoglobina corpuscular media que la de las células falciformes no tratadas.

30

Se han demostrado efectos antineoplásicos de la cisteamina en líneas de células cancerosas y modelos de xenoinjerto (Fujisawa et al., e34437 (2012)). En particular, la cisteamina prolongó la supervivencia de los ratones de manera dependiente de la dosis, y sin toxicidad. La actividad de la metaloproteinasa de la matriz disminuyó significativamente en los xenoinjertos animales y en las líneas de células cancerosas tratadas con cisteamina.

35

La terapia a largo plazo con cisteamina promueve la multimerización de la adiponectina, lo que sugiere que la cisteamina puede ser terapéutica en afecciones asociadas con resistencia a la insulina, estrés oxidativo, y niveles deprimidos de adiponectina, así como lesión isquémica.

40

Para el tratamiento de las enfermedades hematológicas descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + éster etílico de N-acetilcisteína, cisteamina + amida de N-acetilcisteína, N-acetilcisteamina + N-acetilcisteamina, y cisteamina + alil mercaptano. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

45

Para el tratamiento de enfermedades infecciosas descritas aquí, el precursor de cisteamina se selecciona deseablemente del siguiente grupo de disulfuros mixtos: cisteamina + panteteína, cisteamina + N-acetilcisteamina, cisteamina + alil mercaptano, cisteamina + cisteína, cisteamina + 3-mercaptopiruvato, N-acetilcisteamina + panteteína, N-acetilcisteamina + N-acetilcisteamina, N-acetilcisteamina + alil mercaptano, N-acetilcisteamina + cisteína, y N-acetilcisteamina + 3-mercaptopiruvato. El régimen de tratamiento incluye opcionalmente un potenciador descrito aquí, tal como un agente reductor, un inductor de panteteinasa, o un agonista de PPAR.

50

### **Regímenes de dosificación**

55

Los métodos actuales para modular los niveles plasmáticos de cisteamina en el tratamiento de trastornos sensibles a la cisteamina se llevan a cabo administrando una o más composiciones que contienen uno o más precursores de cisteamina, y opcionalmente uno o más potenciadores de la generación y/o absorción de cisteamina in vivo, durante un tiempo y en una cantidad suficiente para dar como resultado niveles plasmáticos elevados de cisteamina adecuados para proporcionar un tratamiento eficaz de una enfermedad o trastorno sensible a la cisteamina. Por ejemplo, si bien las formulaciones de liberación sostenida gastrorretentivas y no gastrorretentivas pueden, por sí mismas, proporcionar una liberación del precursor de cisteamina durante 3, 5, 8 o más horas, puede ser deseable, para lograr niveles sanguíneos más constantes de cisteamina en el intervalo de concentración terapéutica durante períodos de tiempo más prolongados, coadministrar cualquiera de esos tipos de formulación con una o más composiciones diferentes, tal como una composición de liberación inmediata, de liberación retardada, o dirigida al colon. También se pueden administrar composiciones que contienen dos tipos de formulación, denominadas formulaciones mixtas.

60

65



La cantidad y frecuencia de administración de las composiciones pueden variar dependiendo, por ejemplo, de lo que se esté administrando (por ejemplo, qué precursores de cisteamina, qué potenciadores, qué tipos de formulación), de la enfermedad, el estado del paciente, y la forma de administración. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se pueden administrar a un paciente que sufre niveles elevados de cistina en los glóbulos blancos (por ejemplo, cistinosis) en una cantidad suficiente para disminuir o al menos disminuir parcialmente los niveles de cistina en los glóbulos blancos, preferiblemente por debajo de los niveles recomendados. Es probable que la dosis dependa de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad, la gravedad del dolor (por ejemplo, agudo, subagudo o crónico), la edad, el peso y el estado general del paciente en particular, la eficacia biológica relativa de la composición seleccionada, la variación interindividual en el metabolismo de la cisteamina, la formulación del excipiente, la vía de administración, y el criterio del médico tratante. Las dosis efectivas pueden estimarse a partir de curvas de dosis frente a respuesta derivadas de un sistema de prueba *in vitro* o de un modelo animal. Una dosis efectiva es una dosis que produce un resultado clínico deseable, por ejemplo, en el caso de la cistinosis, disminuyendo los niveles de cistina en los glóbulos blancos, en el caso de la NASH, deteniendo o revirtiendo la fibrosis hepática, o en el caso de una enfermedad neurodegenerativa, mejorando la función cognitiva, motora o emocional, medida mediante una prueba clínicamente validada.

La cantidad de un precursor de cisteamina, o sal del mismo, por dosis puede variar. El extremo superior del intervalo de dosis para el bitartrato de cisteamina es 1,95 gramos por metro cuadrado de superficie corporal por día (contando sólo el peso de la cisteamina), lo que equivale a alrededor de 3,7 gramos/día de cisteamina base para un adulto promedio. Sin embargo, esa cantidad de cisteamina se asocia con efectos secundarios importantes, y en algunos casos con la interrupción del tratamiento.

El peso molecular de los precursores de cisteamina varía ampliamente, al igual que la fracción convertible en cisteamina *in vivo*. Varios ejemplos pueden servir para ilustrar la variación. El peso molecular de la cisteamina base es 77,15 g/mol. El peso molecular de la tiol panteteína es 278,37 g/mol. Por lo tanto, un disulfuro de cisteamina-panteteína tiene un peso molecular de aproximadamente 353,52 (ajustando los dos protones perdidos en la reacción de oxidación), y es convertible *in vivo* en dos cisteaminas que juntas pesan 154,3. Por lo tanto, alrededor de 43,6% de un disulfuro de cisteamina-panteteína es convertible en cisteamina. Suponiendo una conversión del 100% del disulfuro de cisteamina-panteteína en cisteamina *in vivo*, y asumiendo además una biodisponibilidad equivalente, una dosis máxima de disulfuro de cisteamina-panteteína está en el intervalo de 8,5 gramos/día para un adulto de 70 kg, o alrededor de 0,12 gramos/kg/día. Se espera que la biodisponibilidad de los precursores de cisteamina, cuando se dosifica para que coincida con la capacidad de generación y absorción de cisteamina *in vivo* de un paciente, sea moderadamente mayor que la de las sales de cisteamina. Es poco probable que la conversión *in vivo* de precursores de cisteamina a cisteamina sea del 100%, pero se pueden lograr tasas de conversión muy altas mediante la calibración de los regímenes de dosificación según los parámetros farmacocinéticos y mediante la coadministración de potenciadores apropiados de la degradación y absorción de los precursores de cisteamina.

La disulfuro pantetina tiene un peso molecular de 554,723 g/mol y, tras reducción y escisión por panteteinasa, produce dos moléculas de cisteamina (es decir, el 27,8% de la pantetina se convertirá en cisteamina). Por lo tanto, haciendo las mismas suposiciones que las anteriores, una dosis máxima de pantetina está en el intervalo de 13 gramos/día para un adulto de 70 kg, o alrededor de 0,19 gramos/kg/día.

Para un gran precursor de cisteamina como coenzima A (peso molecular 767,535 g/mol), que sólo produce una molécula de cisteamina, la fracción de una dosis convertible a cisteamina es sólo alrededor de 10%, y en consecuencia, la dosis máxima de coenzima A podría ser de hasta 37 gramos/día para un adulto de 70 kg, o alrededor de 0,5 gramos/kg/día. Por esa razón, la coenzima A no se prefiere como tratamiento único para enfermedades que requieren altos niveles de cisteamina en la sangre para obtener un buen efecto terapéutico, sino que puede combinarse con otros precursores de cisteamina que la liberan de manera más eficiente.

El extremo inferior del intervalo útil de dosis del precursor de cisteamina no está determinado por los efectos secundarios y los límites de tolerabilidad, sino enteramente por la eficacia, que puede variar considerablemente de una enfermedad a otra. Por ejemplo, debido a que el metabolismo de primera pasada del hígado (que elimina alrededor del 40% de la cisteamina absorbida de la sangre) no afecta el suministro de cisteamina al hígado, el intervalo de dosis efectivas para las enfermedades hepáticas es menor que para otras enfermedades.

Por ejemplo, un sujeto puede recibir alrededor de 0,01 g/kg a alrededor de 0,5 g/kg de un precursor de cisteamina. Generalmente, el compuesto de cisteamina y panteteína se administra en una cantidad tal que la concentración plasmática máxima oscila de 1  $\mu$ M a 45  $\mu$ M. Las cantidades de dosificación ejemplares pueden estar comprendidas entre alrededor de 0,01 y alrededor de 0,2 g/kg; alrededor de 0,05 y alrededor de 0,2 g/kg; alrededor de 0,1 y alrededor de 0,2 g/kg; alrededor de 0,15 y alrededor de 0,2 g/kg; alrededor de 0,05 g/kg y alrededor de 0,25 g/kg; alrededor de 0,1 g/kg y alrededor de 0,25 g/kg; alrededor de 0,15 g/kg y alrededor de 0,25 g/kg; alrededor de 0,1 g/kg y alrededor de 0,50 g/kg; alrededor de 0,2 y alrededor de 0,5 g/kg; alrededor de 0,3 y alrededor de 0,5 g/kg; o alrededor de 0,35 y alrededor de 0,5 g/kg. Las dosis ejemplares pueden ser alrededor de 0,005 g/kg, alrededor de 0,01 g/kg, alrededor de 0,015 g/kg, alrededor de 0,02 g/kg, alrededor de 0,03 g/kg, alrededor de 0,05 g/kg,

alrededor de 0,1 g/kg, alrededor de 0,15 g/kg, alrededor de 0,2 g/kg o alrededor de 0,5 g/kg. Las concentraciones plasmáticas máximas ejemplares pueden oscilar de 5-20 µM, 5-15 µM, 5-10 µM, 10-20 µM, 10-15 µM, o 15-20 µM. Las concentraciones plasmáticas máximas pueden mantenerse durante 2-14 horas, 4-14 horas, 6-14 horas, 6-12 horas, o 6-10 horas.

La frecuencia del tratamiento también puede variar. El sujeto puede ser tratado una o más veces al día (por ejemplo, una, dos o tres veces) o cada tantas horas (por ejemplo, alrededor de cada 8, 12 o 24 horas). Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra 1 o 2 veces cada 24 horas. La duración del tratamiento puede variar, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más días, dos semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 10 meses, más de un año o de por vida. Por ejemplo, el tratamiento puede ser dos veces al día durante tres días, dos veces al día durante siete días, dos veces al día durante diez días. Los ciclos de tratamiento pueden repetirse a intervalos, por ejemplo semanalmente, bimestralmente o mensualmente, que están separados por períodos en los que no se administra ningún tratamiento. El tratamiento puede ser único, o puede durar tanto como la vida del sujeto (por ejemplo, muchos años).

### **Terapias combinadas**

Los datos in vitro sugieren que es probable que la cisteamina sea metabolizada por múltiples enzimas CYP, incluidas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, y CYP2E1, pero no por CYP2A6 o CYP3A4. La cisteamina no es un inhibidor de CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 in vitro. In vitro, la cisteamina es un sustrato de P-gp y OCT2, pero no un sustrato de BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3 y OCT1. La cisteamina no es un inhibidor de OAT1, OAT3 y OCT2.

No se conoce ninguna interacción de la cisteamina con otros compuestos, y por lo tanto, los precursores de cisteamina podrían usarse con varios otros fármacos utilizados para el tratamiento de las múltiples indicaciones enumeradas anteriormente. Por ejemplo:

La composición de la invención se puede administrar en combinación con uno o más fármacos antineurodegenerativos tales como los inhibidores de la acetilcolinesterasa donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) o galantamina (Razadyne®) para tratar la enfermedad de Alzheimer de leve a moderada; memantina (Namenda®) para tratar la enfermedad de Alzheimer de leve a grave; levodopa combinada con carbidopa (por ejemplo, Parcopa®, Sinemet®) para tratar la enfermedad de Parkinson; también agonistas de la dopamina, incluyendo pramipexol (Mirapex®), ropinirol (Requip®) y rotigotina (administrada como parche, Neupro®), agonistas de la dopamina inyectables de acción corta, por ejemplo, apomorfina (Apokyn®) utilizada para el alivio sintomático, inhibidores de la MAO-B, incluyendo selegilina (Eldepryl®, Zelapar®) y rasagilina (Azilect®), inhibidores de la catecol O-metiltransferasa (COMT), entacapona (Comtan®), anticolinérgicos (Cogentin®), amantadina, sedantes, antidepresivos, y otros medicamentos para controlar los síntomas de la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, incluyendo problemas de comportamiento asociados con esos trastornos; tetrabenazina (Xenazine®) y otros tratamientos anticoreicos no aprobados, tales como olanzapina, aripiprazol, risperidona o tiaprida para la enfermedad de Huntington.

No existe un tratamiento aprobado por la FDA para las enfermedades mitocondriales, pero se han probado agentes farmacológicamente activos tales como vitaminas, micronutrientes y coenzima Q10. Una quinona, EPI-743, inicialmente diseñada para interactuar con la cadena de transporte de electrones, podría funcionar aumentando el nivel de glutatona, y se encuentra en ensayos clínicos para enfermedades mitocondriales.

No existe un tratamiento definitivo para el síndrome de Alport; sin embargo, las investigaciones indican que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) pueden reducir la proteinuria y la progresión de la enfermedad renal.

Las artemisininas se encuentran entre los fármacos antipalúdicos más importantes debido a su eficacia y al número todavía pequeño de cepas resistentes. Las artemisininas no se recomiendan como monoterapia para reducir la aparición de cepas resistentes, aunque esto ya ha ocurrido en algunas zonas. Químicamente, la artemisinina es una lactona sesquiterpénica que contiene un puente de peróxido inusual, que se cree es importante por su actividad antipalúdica. Se han desarrollado derivados semisintéticos de la artemisinina, incluidos el artesunato (soluble en agua: para uso oral, rectal, intramuscular, o intravenoso), el artemeter (soluble en lípidos: para uso oral, rectal o intramuscular), la dihidroartemisinina, el ácido artelinico y el artemotil. También se han sintetizado otros análogos (por ejemplo, Posner et al., J. Med. Chem. 42:300 (1999)).

Los medicamentos utilizados para tratar el síndrome metabólico están diseñados para atacar los componentes específicos del síndrome metabólico que están presentes en el paciente. Los agentes reductores del colesterol, incluidas las estatinas y los fibratos, son útiles en algunos pacientes. También se pueden utilizar medicamentos de diversas clases para la tensión arterial. Los medicamentos utilizados para tratar la diabetes tipo 2 incluyen la metformina.

Los precursores de cisteamina pueden combinarse con cualquiera de los agentes anteriores.

**Biomarcadores**

Los métodos de tratamiento, no reivindicados, pueden incluir el seguimiento de uno o más biomarcadores como guía para seleccionar un régimen de dosificación o la selección de pacientes. Los biomarcadores se pueden medir de la siguiente manera:

Farmacocinética de cisteamina plasmática, basada en un modelo de dos compartimentos, para determinar las vidas medias de absorción y eliminación, y el perfil farmacocinético "flip-flop" característico de un fármaco con una tasa de producción intrainestinal y absorción más lenta que la tasa de eliminación.

Cistinosis: nivel de cistina en glóbulos blancos (WBC) previo a la dosis inferior a 1 nmol ½ cistina/mg de proteína WBC, siempre que el tratamiento sea bien tolerado. Los pacientes aún pueden beneficiarse del tratamiento si el nivel de cistina en WBC previo a la dosis es inferior a 2 nmol ½ cistina/mg de proteína.

Enfermedades mitocondriales: Los marcadores ejemplares de actividad mitocondrial incluyen niveles de tiol libre, glutatona (GSH), glutatona reducida (GSSH), glutatona total, productos de proteína de oxidación avanzada (AOPP), poder antioxidante reductor férrico (FRAP), ácido láctico, ácido pirúvico, relaciones lactato/piruvato, fosfocreatina, NADH(NADH+H+) o NADPH(NADPH+H+), niveles de NAD o NADP, ATP, umbral anaeróbico, coenzima Q reducida, coenzima Q oxidada; coenzima Q total, citocromo C oxidado, citocromo C reducido, relación citocromo C oxidado/citocromo C reducido, acetoacetato, β-hidroxibutirato, relación acetoacetato/β-hidroxibutirato, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), niveles de especies reactivas de oxígeno, niveles de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub>), niveles de producción de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), y cociente respiratorio (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>).

Enfermedades neurodegenerativas: La actividad de la cisteamina en los trastornos neurodegenerativos podría estar potencialmente relacionada con la activación de la ruta de NFκB, necesaria para la plasticidad sináptica en el SNC; con el aumento de survivina (BIRC5) y la proteína 12 similar a Bcl-2 (BCL2L12), ambas proteínas antiapoptóticas bien caracterizadas; con el aumento de la expresión de la proteína de choque térmico (HSP40, HSP90), mitigando patologías que implican mal plegamiento de proteínas, lo que beneficiaría a los trastornos neurodegenerativos que implican oligomerización de proteínas, incluyendo HD (enfermedad de Huntington), AD y PD (enfermedad de Parkinson); con el aumento de la expresión y secreción de BDNF, apoyando aún más la supervivencia y el crecimiento neuronal; con la inhibición de la transglutaminasa y la caspasa; o simplemente con el aumento de los niveles de cisteína libre en el cerebro que podrían afectar significativamente a la HD.

Enfermedades fibróticas: Se contempla que la administración del producto aumenta el nivel sistémico de cisteamina, bloqueando la señalización a través de la ruta de TGF-β, inhibiendo la activación y proliferación de miofibroblastos, inhibiendo la expresión de una amplia variedad de componentes de la matriz y aumentando MMP-1 y MMP-3.

Infección parasitaria: Se contempla que la administración del producto aumenta el nivel sistémico de cisteamina, lo que tendría un efecto sinérgico con la artemisinina y derivados para el tratamiento de la malaria y la malaria cerebral.

Para todas las indicaciones, los eventos adversos se medirán utilizando criterios apropiados. Los eventos adversos incluyen erupción cutánea, lesiones cutáneas, convulsiones, letargo, somnolencia, depresión, encefalopatía, úlcera y/o sangrado gastrointestinal, náuseas, vómitos, pérdida de apetito (anorexia), diarrea, fiebre, y dolor abdominal. La gravedad de los eventos adversos (EAs) se clasifica utilizando los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos (CTCAE), versión 3.0 [Cancer Therapy Evaluation Program, 2003] o de otra modo de la siguiente manera: LEVE (Grado 1): la experiencia es menor, y no causa incomodidad significativa al sujeto ni cambios en las actividades de la vida diaria (AVD); el sujeto es consciente de los síntomas pero los tolera fácilmente; MODERADA (Grado 2): la experiencia es un inconveniente o preocupación para el sujeto y causa interferencia con las AVD, pero el sujeto puede continuar con ellas; GRAVE (Grado 3): la experiencia interfiere significativamente con las AVD, y el sujeto está incapacitado y/o no puede continuar con ellas; AMENAZA PARA LA VIDA (Grado 4): experiencia que, en opinión del investigador, coloca al sujeto en riesgo inmediato de muerte por el evento tal como ocurrió (es decir, no incluye un evento que, de haber ocurrido en una forma más grave, podría haber causado la muerte). Según los criterios CTCAE definidos anteriormente, la categoría de Grado 5 es la muerte.

**Kits**

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas aquí puede utilizarse junto con un conjunto de instrucciones, es decir, para formar un kit. El kit puede incluir instrucciones para uso de las composiciones farmacéuticas como terapia como se describe aquí. Por ejemplo, las instrucciones pueden proporcionar regímenes de dosificación y terapéuticos para uso de los compuestos de la invención para modular la concentración de cisteamina en plasma en el tratamiento de trastornos sensibles a la cisteamina.

Los agentes formulados se pueden envasar juntos como un kit. Los ejemplos no limitativos incluyen kits que contienen, por ejemplo, dos píldoras, una píldora y un polvo, un supositorio y una píldora, un comprimido, etc. Además, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de uso único para un paciente, para usos múltiples para un paciente en particular (en una dosis constante o en la que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que progresa la terapia); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para su administración a múltiples pacientes ("envasado a granel"). Los componentes del kit pueden ensamblarse en cajas de cartón, blísters, botellas, tubos, y similares.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Síntesis eficiente de disulfuros mixtos

Varios grupos de investigación han descrito métodos versátiles para la síntesis eficiente de disulfuros mixtos (véanse las revisiones de Witt et al. *Langmuir* 23:2318 (2007); Musiejuk et al. *Org. Prep. and Proc.* 47.2:95 (2015)), incluidos los métodos específicos para cisteína y análogos de cisteína (por ejemplo, Szymelfejnik et al. *Synthesis* 22:3528 (2007); Gormer et al. *J. Org. Chem.* 75,5:1811 (2010)). Se han informado mejoras recientes, por ejemplo basadas en el uso de 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) para facilitar el intercambio de tiol-disulfuro (Musiejuk et al. *RSC Advances* 5.40:31347 (2015)).

Estos métodos permiten la síntesis preferencial del disulfuro mixto (frente a los dos disulfuros homodiméricos) cuando se combinan dos tioles diferentes. En el presente ejemplo, los tioles cisteamina y panteteína se acoplan utilizando el procedimiento descrito por Antoniow et al., *Synthesis* 3:363 (2007). Otros pares de tioles también pueden acoplarse selectivamente utilizando variantes de este procedimiento.

Los reactivos para este procedimiento son: (i) disulfuro de bis(5,5-dimetil-2-tiono-1,3,2-dioxafosforinilo) (denominado abreviadamente como "reactivo de ácido ditiofosfórico"), (ii) bromo, (iii) cisteamina, (iv) diclorometano y (v) panteteína. Todos los reactivos son de grado farmacéutico.

Etapas 1. Prepare una disolución 7 milimolar de reactivo de ácido ditiofosfórico en diclorometano seco (anhidro) a -5 °C bajo una atmósfera de nitrógeno (por ejemplo, añada 27,6 gramos de reactivo de disulfuro a 1 litro de diclorometano).

Etapas 2. Añada bromo a la disolución anterior hasta una concentración final de 6 milimolar, a -5 °C bajo una atmósfera de nitrógeno.

Etapas 3. Prepare una disolución 11 milimolar de panteteína en diclorometano seco.

Etapas 4. Treinta minutos después de completar la etapa 2, añada un volumen de la disolución de panteteína (de la etapa 3) que sea el 5 por ciento del volumen de la disolución preparada en la etapa 2 (por ejemplo, añada 50 ml de disolución de panteteína a 1 litro de la disolución de la etapa 2). Agite a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Etapas 5. Lave el producto de reacción con agua desionizada (500 mililitros), después seque sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, filtre, y evapore a vacío.

Etapas 6. Purifique el residuo mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexano, 1:1) para obtener disulfuro puro del reactivo de disulfuro - panteteína (DR-P).

Etapas 7. A una disolución 0,5 milimolar de DR-P suspendida en diclorometano añada cisteamina (0,5 milimolar, en diclorometano seco) y trietanolamina (2 milimolar) en una relación de 6:4:2 (DR-P:cisteamina:trietanolamina), y agite a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Etapas 8. Al volumen de reacción de la etapa 7 añada (i) cinco volúmenes de diclorometano, (ii) cinco volúmenes de agua destilada, y (iii) cinco volúmenes de cualquiera de los siguientes: (a) una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> o (b) HCl 1 M.

Etapas 9. Seque la capa orgánica de la etapa 8 sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, filtre, y evapore a vacío.

Etapas 10. Suspenda el residuo de la etapa 9, y purifique mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice.

Se pueden encontrar detalles sobre el protocolo anterior y referencias a numerosos otros protocolos para la síntesis selectiva de disulfuros en Musiejuk, M. y D. Witt. *Organic Preparations and Procedures International* 47:95 (2015).

### Ejemplo 2. Síntesis selectiva de disulfuros mixtos que contienen cisteína o análogos de cisteína

Entre los tioles útiles para producir precursores de cisteamina disulfuro mixtos se encuentran la cisteína, el éster etílico de cisteína, el éster metílico de cisteína, la N-acetilcisteína, el éster etílico de N-acetilcisteína, la amida de N-acetilcisteína y la homocisteína, así como compuestos que contienen cisteína, incluyendo cisteinilglicina, gamma glutamylcisteína, éster etílico de gamma glutamylcisteína, así como glutathione (que es un tripéptido de glicina, L-cisteína y L-glutamato, teniendo el L-glutamato un enlace isopeptídico con el resto amino de la L-cisteína) y derivados del glutathione.

En Szymelfejnik et al., *Synthesis* 22:3528 (2007), se describe un protocolo útil para acoplar los derivados de cisteína anteriores y otros o compuestos que contienen cisteína a cisteamina, N-acetilcisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, o análogos o derivados adecuados de esos compuestos.

Este método explota la reactividad selectiva de los derivados de 5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-ildisulfanilo hacia los derivados de cisteína para producir disulfuros casi exclusivamente asimétricos. Por ejemplo, se sintetizó una variedad de disulfuros asimétricos con N-acetilcisteína y éster etílico de cisteína con rendimientos del 93% y 98%, respectivamente (Szymelfejnik et al. *Synthesis* 2007).

En el presente ejemplo, la panteteína se acopla al éster etílico de cisteína. (Véase la Tabla 1B de disulfuros en la Figura 18; el precursor de cisteamina disulfuro "2 + 13" es disulfuro de panteteína enlazado al éster etílico de cisteína).

La primera etapa del procedimiento es la síntesis de bromuro de (5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)disulfanilo, que después se acopla a panteteína en la etapa 2. A partir de la etapa 5, la panteteína se une mediante enlace de disulfuro al éster etílico de cisteína, aprovechando las excelentes propiedades del grupo saliente del anión ditiofosfato.

Etapas 1. A una disolución de disulfuro de 5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-ilo (por ejemplo, 2,76 gramos; 7,0 milimoles) en diclorometano anhidro (100 ml), añada, a -30 °C y bajo gas nitrógeno, bromuro (0,96 gramos; 6,0 milimoles). Deje que la reacción transcurra durante 15 minutos.

Etapas 2. Añada a lo anterior una disolución de panteteína (3,062 gramos, 11 milimoles) en diclorometano anhidro (5 ml). Agite la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Etapas 3. Lave la mezcla con agua destilada desionizada (50 ml), seque con MgSO<sub>4</sub> anhidro, después filtre, y evapore a vacío.

Etapas 4. Purifique el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, utilizando una mezcla de diclorometano:hexano 1:1) para obtener (5,5-dimetil-2-tioxo-1,3,2-dioxafosforinan-2-il)disulfanil-panteteína (denominado en las etapas posteriores Disulfuro 1).

Etapas 5. A una disolución de Disulfuro 1 (0,5 milimoles) en diclorometano (6 ml), añada una disolución de hidrócloruro de éster etílico de cisteína (0,5 milimoles) y trietilamina (0,28 ml, 2,0 milimoles) en diclorometano (4 ml). Agite durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Etapas 7. Diluya la mezcla con diclorometano (50 ml), después lave con: (i) KHSO<sub>4</sub> 1 M (25 ml) o (ii) NaOH 0,25 M (25 ml).

Etapas 8. Seque con MgSO<sub>4</sub> anhidro, filtre, y evapore a vacío.

Etapas 8. Purifique el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, utilizando una mezcla 25:1 de diclorometano:metanol, o recristalice en cloroformo).

Esta síntesis a pequeña escala se puede ajustar para encontrar condiciones de síntesis óptimas (por ejemplo, con un rendimiento superior al 90%, o mayor que 95% de disulfuro mixto). Posteriormente se puede ampliar la reacción para producir cantidades farmacológicas del disulfuro. Otros análogos de cisteína se pueden acoplar a cisteamina, N-acetilcisteamina, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, o análogos o derivados adecuados utilizando variantes de este procedimiento.

Para más detalles consulte: Szymelfejnik et al., *Synthesis* 22:3528 (2007).

#### **Ejemplo 5. Coformulación del compuesto 1 y el compuesto 3.**

Se mezclan completamente a temperatura ambiente setecientos (700) partes en peso del compuesto 1 (dihidrócloruro de panteteína-cisteamina), doscientas (200) partes en peso del compuesto 3 (dihidrócloruro de n-acetilcisteamina-n-acetilcisteamina), seiscientos cuarenta (640) partes en peso de agua destilada, y 2000 partes en peso de celulosa microcristalina de calidad alimentaria. La mezcla en polvo resultante se utiliza para llenar cápsulas de gelatina dura estándar de dos piezas con 800 mg por cápsula.

**Ejemplo 6. Coformulación del compuesto 2 y el compuesto 3 y cistamina**

Se mezclan completamente a temperatura ambiente seiscientos cincuenta (650) partes en peso del compuesto 2 (dihidrocloreto de panteteína-n-acetilcisteamina), seiscientos cincuenta (650) partes en peso del compuesto 3 (dihidrocloreto de n-acetilcisteamina-n-acetilcisteamina), doscientas (200) partes en peso de cistamina y mil noventa (1090) partes en peso de agua destilada y dos mil (2000) partes en peso de celulosa microcristalina de calidad alimentaria. La mezcla en polvo resultante se utiliza para llenar bolsitas de papel, con 3.000 miligramos por bolsita.

**Ejemplo 7. Formulación gastrorretentiva del compuesto 3**

Una formulación gastrorretentiva ejemplar de la invención es Acuform® (Depomed), una tecnología basada en polímeros diseñada para optimizar la administración de fármacos. Acuform permite la administración dirigida y controlada de una composición farmacéutica del compuesto 3 al tracto gastrointestinal (GI) superior mediante el uso de polímeros hinchables únicos que permiten que un comprimido de la composición se retenga en el estómago durante aproximadamente cinco a diez horas. Durante este tiempo, el componente activo del comprimido, el compuesto 3, se administra de manera constante al tracto gastrointestinal superior a la velocidad y en el momento deseados. Esta liberación gradual y sostenida permite que una mayor cantidad del fármaco se absorba en el tracto gastrointestinal superior, lo que ofrece el potencial de una mayor eficacia del tratamiento y una mayor tolerabilidad del tratamiento, con la conveniencia de una dosificación de una o dos veces al día.

**Ejemplo 8. Tratamiento de la cistinosis nefropática**

Se describen formulaciones de dosis y regímenes de tratamiento para tres pacientes con cistinosis, para ilustrar tanto la variabilidad demográfica en la población de pacientes como cómo la variación bioquímica interindividual en la absorción, el metabolismo y la respuesta del fármaco puede superarse explotando la flexibilidad del fármaco y la forma de dosificación proporcionada por la invención. Estos ejemplos ilustran los principios de selección del precursor de cisteamina, la selección de la forma de dosificación y la individualización del régimen de dosis.

Paciente 1: un bebé de 18 meses recién diagnosticado con cistinosis después de presentar retraso en el crecimiento y micción excesiva debido al síndrome de Fanconi renal. La medicación sólida no es aceptable en este paciente. Un medicamento sólido, del tipo disponible actualmente, podría en principio triturarse y mezclarse con la comida, sin embargo la dosis real dependería entonces de una variedad de variables mal controladas, incluyendo (i) la cantidad de mezcla de fármaco y alimento ingerida, (ii) la homogeneidad de la mezcla, si no se consume toda, (iii) las posibles interacciones entre el fármaco y el alimento, y (iv) las condiciones utilizadas para almacenar y preparar la comida (por ejemplo, calentamiento), particularmente si la mezcla de fármaco y alimento no consumida se guarda para una comida futura para evitar gastar dinero en fármaco no consumido. Una complicación adicional es que los intervalos de dosificación de 6 horas (como se requiere con Cystagon®, la formulación de cisteamina de liberación instantánea) no se ajustan a los horarios de comida del bebé ni a los horarios de sueño de los padres.

Una forma de dosificación preferible sería la que se consumiera completamente, incluso cuando no fuera la hora de comer del bebé; contendría una concentración homogénea de fármaco; y estaría suficientemente diluida como para que pequeñas cantidades de fármaco no consumido o regurgitado sólo tuvieran un pequeño efecto sobre la dosis total ingerida. Además, se mejoraría el cumplimiento del tratamiento prescrito (en este caso, el cumplimiento por parte de los padres del bebé) si el intervalo entre dosis pudiera ampliarse a 12 horas en lugar de 6 horas.

La forma farmacéutica seleccionada para este bebé de 14 kg es el compuesto 3, formulado como micropartículas de liberación retardada en un jarabe bebible endulzado a una concentración de 50 mg por mililitro de jarabe.

El control de la enfermedad se controla mediante la medida periódica de los niveles de cistina en los glóbulos blancos. La diana terapéutica, como para todos los pacientes con cistinosis, es suprimir la cistina de los glóbulos blancos (WBC) a menos de 1 nanomol de ½ cistina por mg de proteína WBC. Si la primera medida de cistina, que generalmente se realiza entre 4 y 6 semanas después del inicio de la terapia, revela una supresión inadecuada de cistina, la dosis puede aumentarse a 1000 mg/día en dos dosis divididas. Si esta dosis más alta aún no es eficaz para controlar los niveles de cistina en los WBC, la dosis se puede aumentar aún más en incrementos de 150 mg/día. (Dado que las dosis altas de disulfuro de cisteamina-panteteína no generan la Cmax alta asociada con las formulaciones de bitartrato de cisteamina, hay un margen considerable para aumentar aún más la dosis, si es necesario).

Si no se logra una supresión adecuada de cistina en los glóbulos blancos con 1500 mg/día, se puede aumentar aún más la dosis, mientras se monitorizan los efectos secundarios, o se puede añadir una segunda formulación de cisteamina-panteteína para proporcionar mayores niveles plasmáticos de cisteamina al final del período de dosificación de 12 horas. Por ejemplo, una formulación de micropartículas líquidas de liberación sostenida diseñada para proporcionar cisteamina principalmente durante el intervalo de 6 a 12 horas después de la ingestión

se puede mezclar con el jarabe original en una relación determinada empíricamente midiendo los niveles de cisteamina en plasma o preferiblemente los niveles de cistina en los glóbulos blancos.

La formulación líquida es compatible con una administración rápida en cualquier momento, incluso con las comidas o entre las comidas (ya sea leche materna, leche de fórmula, o alimento para bebés). El volumen de dosis de 9-10 ml es una cantidad insignificante para que la consuma un niño de 18 meses, pero suficiente como para que si no se consume una pequeña cantidad (por ejemplo, debido a una pérdida por la boca o un eructo), no se afecte mucho la dosis total. El edulcorante aumenta el atractivo del medicamento.

Las micropartículas tienen un tamaño en el intervalo de 50 a 500 micrómetros, y preferiblemente entre 100 y 400 micrómetros, por lo que pueden permanecer suspendidas en líquido durante un período prolongado, particularmente en presencia de un agente de suspensión (por ejemplo, 3% de carboximetilcelulosa de bajo peso molecular y 0,25% de TWEEN 20). Los lotes de partículas producidas por separado dentro de ese intervalo de tamaño se mezclan en el producto final para ampliar la duración de la liberación del fármaco (por ejemplo, lotes separados de partículas de 75, 150 y 450 micrómetros se mezclan en una relación de 1:2:1). Los tamaños de partículas se pueden determinar mediante análisis de tamiz a través de un agitador de tamices que tenga tamices de malla de alambre estándar USP que cumplan con las especificaciones ASTM.

Las partículas consisten en un núcleo interno de fármaco mezclado homogéneamente con uno o más excipientes de matriz mediante un procedimiento de amasado en húmedo y rodeado por al menos tres recubrimientos. El excipiente principal es celulosa microcristalina, almidón, polivinilpirrolidona, copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, o cualquier otro excipiente compatible con el procedimiento de amasado en húmedo. La carga de fármaco (fracción de fármaco en el producto final, en masa) está entre 50 - 90 por ciento.

El primer recubrimiento ayuda a fijar el tamaño de las partículas y sirve como membrana de difusión, permitiendo la liberación regulada del fármaco; consiste en una mezcla de tres partes de (i) un derivado de celulosa (por ejemplo, ftalato de hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, acetato de carboximetilcelulosa, acetato-butilato de carboximetilcelulosa), o copolímeros de ésteres de ácido metacrílico y acrílico, o metacrilatos de metilo, (ii) un excipiente lipídico (por ejemplo, aceite de algodón hidrogenado o aceite de ricino), y (iii) un agente plastificante adecuado (por ejemplo, ftalato de dietilo o acetato de monoglicerol).

El segundo, tercer y cualquier recubrimiento adicional alternan entre capas hidrófilas y lipófilas con una capa hidrófila más externa. La capa hidrófila externa proporciona un recubrimiento entérico formado a partir de un excipiente sensible al pH que es resistente a la disolución a pH ácido pero susceptible a la disolución a pH neutro o casi neutro (por ejemplo, pH superior a 6), tales como metacrilatos de dimetilaminoetilo, ácido metacrílico, y ésteres de ácido metacrílico en relaciones variables, a veces denominados colectivamente poli(met)acrilatos o copolímeros de ácido metacrílico/acrilato de etilo, opcionalmente mezclados con hidroxipropilmetilcelulosa. Las versiones comerciales de recubrimientos entéricos obtenidos con estos excipientes se comercializan con las marcas Acryl-EZE, Acryl-EZE MP (Colorcon, Inc.), Eastacryl 30D (Eastman Chemical Co.), diversos productos Eudragit tal como Eudragit L 100 (Evonik Industries); Kollicoat MAE 30 D y Kollicoat MAE 30 DP (BASF Chemicals).

Los recubrimientos lipófilos pueden incluir ácidos grasos, cera de carnauba, cera de abejas y similares.

Las partículas se pueden fabricar en lotes separados con diferentes números de recubrimientos, diferentes grosores de recubrimiento o diferentes composiciones de recubrimiento en los diferentes lotes, para lograr un perfil de liberación de fármaco prolongado que dure al menos seis horas y preferiblemente ocho horas o más.

El medicamento puede proporcionarse como una suspensión acuosa de las micropartículas con agentes edulcorantes y agentes de suspensión, o puede proporcionarse como una mezcla seca diseñada para su reconstitución en el momento de su uso. En cualquier caso, la formulación líquida tiene propiedades reológicas que facilitan la suspensión prolongada de las micropartículas.

Las micropartículas de liberación controlada formuladas para administración líquida se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.405.619, que abarca muchos de los elementos descritos anteriormente, al tiempo que proporciona excipientes útiles adicionales y detalles sobre los métodos de formulación y fabricación.

Paciente 2: Un niño de diez años y 35 kg con cistinosis recibe tratamiento con Cystagon® durante siete años. Su dosis actual es 700 mg cuatro veces al día (2,8 gramos al día), lo que es inusualmente alto para un paciente de 35 kg. La dosis es de seis pastillas (cuatro de 150 mg y dos de 50 mg) cada seis horas, o 24 pastillas al día. El joven paciente odia que lo despierten a medianoche y a las 6 a. m. para tomar su medicación, odia tragar las pastillas, que son enormes (tamaño 0), odia el olor corporal y el mal aliento que a menudo le provoca Cystagon® (sus amigos lo notan y se burlan de él). Ha desarrollado una variedad de estrategias para saltarse dosis o, cuando eso no es posible, disminuir los efectos secundarios de la cisteamina. Ha aprendido, por ejemplo, que puede evitar algunos efectos secundarios ingiriendo su medicamento con o poco después de una comida abundante, ya que se absorbe menos cisteamina con los alimentos, especialmente proteínas o grasas. Él es capaz de lograr esto en la escuela siempre que la enfermera de la escuela no se quede para verlo tragar todas sus pastillas antes de comenzar el

almuerzo, lo que generalmente puede lograr tomándose un largo tiempo para tragar cada pastilla. Como resultado de estas medidas de evitación, su nivel de cistina en WBC suele ser superior a 2,5 nanomoles  $\frac{1}{2}$  cistina/mg de proteína. Para corregir el control metabólico inadecuado, su médico ha aumentado la dosis de cisteamina del niño a su alto nivel actual, lo que sería supratrapéutico si se ingiere según lo prescrito. Como resultado de esta dosis excesiva, el niño tiene más probabilidades de experimentar efectos secundarios en aquellas ocasiones en las que ingiera una dosis completa con el estómago vacío, según lo prescrito.

Una forma de dosificación preferible para este paciente sería aquella que elimine los altos niveles máximos de cisteamina en sangre que siguen a la ingestión del fármaco, que son la causa próxima de la mayoría de los efectos secundarios que experimenta; eliminaría la necesidad de despertarse a medianoche y a las 6 a. m., que son perjudiciales para el paciente y sus padres; reduciría la carga de tragar seis pastillas cada seis horas; eliminaría la necesidad de dosificarse en la escuela, con todo el drama asociado; y, al fomentar un mejor cumplimiento, permitiría reducir la dosis alta mientras se logra un mejor control de la enfermedad.

Las formas de dosificación seleccionadas inicialmente para este paciente son el compuesto 1 administrado en una dosis alta (por ejemplo, 50 a 150 mg/kg) y formulado para liberación inmediata (IR), seguido de ácido ascórbico administrado 3+ horas después de la administración del compuesto 1. Tanto el compuesto 1 como el ácido ascórbico pueden proporcionarse como micropartículas en forma de polvo envasadas en bolsitas codificadas por colores de diversos tamaños que pueden abrirse y combinarse con alimentos o bebidas en la cantidad requerida. Los polvos se pueden mezclar con leche y cereales azucarados (el desayuno preferido del paciente) y con la mayoría de las demás comidas, incluidas las comidas ricas en grasas y proteínas.

El régimen de dosificación puede proporcionar niveles elevados de cisteamina plasmática durante un intervalo de dosificación de 8 horas. La proporción de los dos polvos y el momento de administración se pueden ajustar fácilmente para optimizar el perfil de tiempo-concentración de cisteamina en pacientes individuales.

Esta formulación en polvo del compuesto 1 puede utilizar un núcleo de resina de intercambio iónico con una variedad de recubrimientos opcionales para proporcionar una liberación inmediata, retardada o sostenida. El polvo resultante se puede añadir directamente a los alimentos o después de suspenderlo en agua u otros líquidos.

El polvo de liberación inmediata consiste en un fármaco mezclado con una resina de intercambio iónico sin recubrimiento, tal como poliestireno sulfonato de sodio (por ejemplo, la marca de resina Amberlite® IRP 69, vendida por Rohm and Haas). Las etapas sintéticas son:

Etapas 1. Disuelva el disulfuro de cisteamina-panteteína en agua destilada.

Etapas 2. Añada Amberlite® IRP 69 gradualmente a la disolución del Etapas 1 y agite durante una hora, durante la cual se forman complejos de fármaco - resina.

Etapas 3. Retire el agua por filtración, y enjuague la mezcla de fármaco - resina dos veces con agua destilada para eliminar cualesquiera iones de sal de desplazamiento.

Etapas 4. Seque la mezcla de fármaco - resina hasta que el contenido de humedad sea 3% - 7%, después hágala pasar a través de un dispositivo CO-MIL (Quadro Engineering Corp.) equipado con un tamiz de malla estándar de 40, que restringe el paso de gránulos con un tamaño de partículas superior a alrededor de 410 micrómetros (es decir, los gránulos que pasan a través de la malla son más pequeños que alrededor de 410 micrómetros).

Paciente 3. Un paciente de 22 años con cistinosis, post-trasplante de riñón, y que sufre diabetes, hipotiroidismo y anomalías en la deglución, recibe tratamiento con más de una docena de medicamentos, muchos de ellos administrados varias veces al día. Su cistinosis se trata con Procysbi®, 2.400 mg/día en dos dosis divididas (8 cápsulas de tamaño 0 de 150 mg por dosis). Sin embargo, con frecuencia experimentaba fuertes dolores de estómago después de la ingestión de Procysbi®, así como náuseas y vómitos, y estos efectos secundarios gastrointestinales a menudo le impedían tomar sus otros medicamentos a tiempo o le hacían vomitar otros medicamentos. Esto es particularmente preocupante con respecto a su régimen inmunosupresor, sin el cual corre el riesgo de perder el riñón trasplantado.

El control de la cistina en los leucocitos es apenas adecuado, oscilando entre 1 y 1,45 nanomoles de  $\frac{1}{2}$  cistina por mg de proteína en diferentes visitas. En un esfuerzo por descubrir la causa de los efectos secundarios gastrointestinales, su médico mide su nivel de cisteamina plasmática una hora después de la ingestión y descubre que es 78 micromolar. Ese alto nivel podría ciertamente explicar sus síntomas gastrointestinales, pero su médico no está dispuesto a reducir su dosis de Procysbi® en vista del control marginal de cistina.

Una forma de dosificación preferible para este paciente eliminaría, o al menos disminuiría, los efectos secundarios gastrointestinales, que probablemente son causados por los altos niveles máximos de cisteamina en sangre, al tiempo que reduciría la cantidad de píldoras que, junto con otros medicamentos del paciente, representan una carga física y psicológica significativa.



La forma de dosificación seleccionada para este paciente es una combinación del compuesto 1 administrado en una dosis alta (por ejemplo, 50 a 150 mg/kg) administrada simultáneamente con una dosis baja de cistamina (por ejemplo, 10 a 40 mg/kg).

#### Ejemplo 9. Tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

Se observa que un hombre de 50 años con sobrepeso, no bebedor, con intolerancia a la glucosa, enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD) y un índice de masa corporal (IMC) de 36 tiene enzimas hepáticas elevadas en un examen de rutina; tanto la aspartato transaminasa (AST) como la alanina transaminasa (ALT) están cuatro veces por encima del límite superior del intervalo normal. El hallazgo de enzimas hepáticas significativamente elevadas sugiere daño en las células hepáticas, y condujo a un estudio diagnóstico de enfermedad hepática. Las pruebas para cáncer de hígado y hepatitis viral son negativas, y se excluyen otras posibles causas infecciosas y toxicológicas de enzimas hepáticas elevadas, lo que precipita una biopsia de hígado. La biopsia revela esteatosis, balonización de los hepatocitos, inflamación y fibrosis significativa. Estos hallazgos, en el contexto del cuadro clínico, llevaron al diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

Se le indica al paciente que cambie su dieta y comience un programa de ejercicio moderado. Seis meses de asesoramiento sobre dieta y estilo de vida no lograron producir pérdida de peso, mejoría en la tolerancia a la glucosa ni reducción en los niveles de ALT o AST, lo que llevó al inicio de la farmacoterapia. El paciente es tratado con el compuesto 2, formulado como un líquido gelificante in situ. La dosis diana es 20 mg de base libre de cisteamina por kg de peso corporal, y la dosis inicial es una cuarta parte de esa cantidad, que se aumenta gradualmente durante cuatro a seis semanas hasta la dosis diana, mientras se ajusta para cualquier efecto secundario (es decir, un aumento de dosis más lento o una dosis final más baja en caso de efectos secundarios significativos).

Los agentes reductores vitamina C y vitamina E se administran en forma de cápsulas, formuladas para una liberación retardada en el intestino delgado proximal, de dos a cuatro horas después de cada dosis del compuesto 2, según la conveniencia del paciente (por ejemplo, antes del almuerzo y antes de acostarse), para mejorar la reducción del enlace de disulfuro en el tracto gastrointestinal (y, por lo tanto, maximizar la conversión de cisteamina-N-acetilcisteína en sus dos componentes tioles) y como agentes terapéuticos complementarios. La dosis diaria de vitamina C es de 2 gramos, y la dosis diaria de vitamina E es de 800 unidades internacionales de alfa tocoferol, estereoisómero RRR, lo que equivale a 533,3 miligramos por día (1 UI de tocoferol se define como % miligramos de RRR-alfa-tocoferol). La mitad de esas cantidades se administran dos veces al día. Se ha demostrado previamente que un régimen de vitamina C y vitamina E es eficaz para reducir los índices de fibrosis hepática en pacientes con NASH (véase Harrison et al., Am J Gastroenterol. 98:2485 (2003)).

Ingerir esta importante cantidad de fármaco en forma de comprimidos o cápsulas supondría tragar más de una docena de pastillas grandes al día (sin contar otros medicamentos), lo que supone una auténtica pesadilla para el paciente. La formulación líquida, proporcionada como una bebida endulzada con excipientes que enmascaran cualquier sabor desagradable del fármaco, está diseñada para ser tragada con las comidas, lo que facilita la ingestión del medicamento y mejora así el cumplimiento. (de hecho, se pueden administrar fácilmente cantidades sustancialmente mayores de precursores de cisteamina a través de formulaciones líquidas). Un segundo beneficio de la formulación gelificante líquida es que es más liviana que el alimento, por lo que flota, en forma de gel, sobre el quimo y proporciona una capa de protección contra el reflujo del contenido ácido del estómago hacia el esófago. (Las formulaciones gelificantes líquidas, tales como Gaviscon® Algicon® y Gastron®, se desarrollaron primero para el tratamiento del reflujo gastroesofágico).

#### Ejemplo 10. Estudio farmacocinético del compuesto 2 (disulfuro de N-acetilcisteamina-(R)-panteteína)

El disulfuro de N-acetilcisteamina-(R)-panteteína (el disulfuro obtenido mediante la combinación de los tioles 6 y 2 en la Figura 17, y por lo tanto denominado compuesto 2) se sintetizó como se ilustra en la Figura 25. El compuesto 2 se administró entonces por vía oral a ratas Sprague-Dawley macho en tres niveles de dosis para evaluar sus parámetros farmacocinéticos (PK), particularmente con respecto al curso temporal de la producción de cisteamina.

Se calcularon las dosis, expresadas en miligramos de cisteamina base por kilogramo de peso corporal, y se expresan aquí de la siguiente manera: una molécula del compuesto 2, tras la reducción del enlace de disulfuro, la desacetilación de la N-acetilcisteamina (para producir cisteamina) y la escisión de la panteteína por la panteteinasa (para generar una cisteamina y un ácido pantoténico), produce dos moléculas de cisteamina. Por lo tanto, un mol del compuesto 2, que pesa 395,54 gramos, produce dos moles de cisteamina, cada uno con un peso de 77,15 gramos/mol  $\times 2 = 154,3$  gramos. Por lo tanto, en términos de masa,  $154,3/395,54 = 38,5\%$  del compuesto 2 es convertible en cisteamina después de la degradación. Por el contrario, para calcular una dosis del compuesto 2 en términos de cisteamina base, la dosis de cisteamina base se multiplica  $\times 2,5974$ . Por ejemplo, para calcular una dosis equivalente de cisteamina base de 30 mg/kg del compuesto 2, multiplique  $30 \text{ mg/kg} \times 2,5974 = 77,92 \text{ mg/kg}$ . Así, en la discusión que sigue y en las figuras adjuntas, una dosis de "30 mg/kg" del compuesto 2 significa que se administraron 77,92 mg/kg, una dosis de "60 mg/kg" del compuesto 2 significa que se administraron 155,84 mg/kg,

y una dosis de "120 mg/kg" del compuesto 2 significa que se administraron 311,68 mg/kg. El propósito de esta nomenclatura, que se utiliza ampliamente en la bibliografía sobre sales de cisteamina, es facilitar la comparación de dosis de diferentes precursores de cisteamina y sales de cisteamina.

El compuesto 2 se administró por sonda a tres grupos de ratas (3 ratas por grupo) en dosis seleccionadas para administrar aproximadamente 30 mg/kg (grupo 1), 60 mg/kg (grupo 2) y 120 mg/kg (grupo 3) de cisteamina base. Todas las dosis se disolvieron en 3 mililitros de disolución salina antes de su administración a ratas en ayunas (sin embargo, la dosis de 120 mg/kg no se disolvió completamente en disolución salina, por lo que esas ratas en realidad recibieron una dosis menor a la planificada; véase la discusión del análisis de tejidos a continuación).

Las dosis del compuesto 2 se prepararon para ratas de 250 gramos, pero las masas reales de las ratas en el momento de la administración del fármaco variaron de 267 a 300 gramos, por lo que las dosis reales, normalizadas al peso corporal, oscilaron de 26,1-27,1 mg/kg en el grupo 1, 51,7-56,2 mg/kg en el grupo 2, y 108,3-109,5 mg/kg en el grupo 3. No obstante, para mayor comodidad, dichas dosis se denominan 30, 60 y 120 mg/kg.

A un grupo de control de ratas (grupo 5) se le administró mediante sonda hidrócloruro de cisteamina en 3 mililitros de disolución salina, a una dosis seleccionada para suministrar 30 mg/kg de cisteamina base. (La masa de cisteamina HCl es 113,6 Daltons, de los cuales 77,15 Daltons, o 67,91%, son cisteamina base; por el contrario, para calcular una dosis de cisteamina HCl a partir de una dosis de cisteamina base, multiplique esta última  $\times 1,47$ . Por ejemplo, para calcular la dosis de cisteamina HCl que proporcionará 30 mg/kg de cisteamina base, multiplique  $30 \times 1,47 = 44,2$  mg/kg.) Las dosis de hidrócloruro de cisteamina se prepararon para ratas de 250 gramos, pero las masas reales de las ratas en el momento de la administración del fármaco variaron de 281-285 gramos, por lo que los niveles de dosis reales, normalizados al peso corporal, oscilaron de 26,3-26,7 mg/kg en el grupo 5.

Se obtuvieron muestras de sangre de ratas inmediatamente antes de la dosificación y 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 600 minutos después de la dosificación a través de catéteres de arteria carótida implantados quirúrgicamente antes del estudio farmacocinético. El plasma se obtuvo de la sangre mediante centrifugación, y congeló instantáneamente. Varios días después, las muestras de plasma se descongelaron en hielo, y cada muestra de plasma se dividió en alícuotas en dos tubos pareados (20  $\mu$ l por tubo), uno de los cuales se procesó para la medida de tioles (después de la reducción cuantitativa del enlace de disulfuro), mientras que el otro se procesó para el análisis de disulfuros.

Para reducir cuantitativamente los enlaces de disulfuro, el plasma del primer tubo se trató con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 5 mM, un agente reductor de enlaces de disulfuro selectivo y potente, utilizando un protocolo dado a conocer por Dohil et al. (2012). Brevemente, se añadieron 2,2  $\mu$ l de disolución madre de TCEP 50 mM recién preparada a 20  $\mu$ l de plasma, y la muestra se incubó a 37 grados C durante 45 minutos. El volumen de plasma en la muestra emparejada (no reducida) se ajustó añadiendo 2,2  $\mu$ l de agua desionizada.

Después de la etapa de reducción de TCEP, todas las muestras de plasma se desproteinizaron añadiendo 3,5 volúmenes de disolución enfriada con hielo de acetonitrilo (ACN)/1% de ácido fórmico (FA) que contenía estándares internos (se añadieron 77  $\mu$ l de disolución de ACN/1% de FA a 22,2  $\mu$ l de plasma). Los estándares internos fueron cisteamina deuterada (d4) (Toronto Research Chemicals), valina deuterada (d8) y fenilalanina deuterada (d8) (ambas obtenidas de Cambridge Isotope Laboratories; Andover, MA), cada una a una concentración final de 0,2  $\mu$ g/ml en la disolución de ACN/1% de FA.

La proteína desnaturalizada se pelletizó mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 grados C en una microcentrífuga Eppendorf. El sobrenadante (25  $\mu$ l) se retiró a un tubo nuevo, se mezcló con 75  $\mu$ l de disolución de ACN/0,1% de FA, y se inyectó directamente en una columna de cromatografía de líquidos de interacción hidrófila Atlantis (HILIC) de 150  $\times$  2 mm (Waters; Milford, MA). Los metabolitos se analizaron utilizando un Nexera X2 U-HPLC (Shimadzu) y un espectrómetro de masas de cuadrupolo híbrido Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). La columna se eluyó isocráticamente a un caudal de 360  $\mu$ l/min con 5% de fase móvil A (10 mM de formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico en agua) durante 1 minuto, seguido de un gradiente lineal hasta 40% de fase móvil B (acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico) durante 7 minutos. El voltaje de ionización por electropulverización fue 3,5 kV, y los datos se adquirieron mediante un análisis de barrido completo a lo largo de m/z 70-800 a una resolución de 70.000 y una velocidad de adquisición de datos de 3 Hz. Se descubrió que la espectrometría de masas en el modo de iones positivos produce mejores señales de los analitos de interés. El voltaje de la fuente de ionización fue -3,0 kV, y la temperatura de la fuente fue 325 °C. Los datos de MS se procesaron utilizando Tracefinder (versión 3.2, Thermo Fisher Scientific).

Se generaron curvas estándar para cisteamina, N-acetilcisteamina y panteteína (todas de Sigma-Aldrich) mediante dilución seriada en plasma (100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3, 1 y 0,5  $\mu$ M), y después se utilizaron para interpolar las concentraciones plasmáticas de esas sustancias a partir de los recuentos de iones de LC-MS.

Además de las muestras de plasma, se obtuvieron contenidos gastrointestinales (contenidos del estómago, contenidos del intestino delgado proximal, contenidos del intestino delgado distal, y contenidos del ciego/colon), hígado, riñón y bazo de las ratas al final del estudio (10,5 horas después de la dosificación), y se congelaron

rápidamente. Se midieron los niveles tisulares de cisteamina, N-acetil cisteamina y ácido pantoténico en el contenido gastrointestinal y en el tejido hepático y renal. El protocolo para el análisis de los tejidos consistió en (i) triturar fragmentos de tejido congelado sobre hielo seco para obtener trozos pequeños; (ii) pesar varios trozos de tejido congelado (~25 - 150 ug) en un tubo de microcentrifuga tarado de 1,5 ml con dos cojinetes de bolas de metal, y almacenarlos inmediatamente en hielo seco; (iii) homogeneizar criogénicamente los fragmentos de tejido utilizando un Retsch Cryomill a 250 hercios durante 5 minutos; (iv) dividir las muestras en dos tubos e incubar 20 ul de polvo de tejido homogeneizado suspendido con 2,2 ul de TCEP 50 mM (concentración final de 5 mM) durante 45 minutos a 37 grados C, o añadir 2,2 ul de agua desionizada, (v) añadir un volumen igual (p:v) de acetonitrilo:metanol (1:1) a ambas muestras (TCEP, sin TCEP), y peletizar la proteína precipitada por centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf a 4 grados C; (vi) transferir 25 ul de sobrenadante a un nuevo tubo que contiene 75 ul de ACN/0,1% de FA; (vii) inyectar muestras en el aparato de LC-MS descrito anteriormente, utilizando la misma columna y condiciones de ejecución que para las muestras de plasma.

Resultados: En las ratas a las que se dosificó el compuesto 2, se produjo y absorbió cisteamina durante un período de tiempo significativamente más largo que en las ratas a las que se dosificó cisteamina HCl. La concentración plasmática máxima de cisteamina (Cmax) en las ratas a las que se dosificó con cisteamina HCl se produjo 15 minutos después de la alimentación por sonda. Posteriormente, la concentración de cisteamina disminuyó a menos de la mitad del máximo a los 90 minutos (Figura 30A). Por el contrario, la concentración máxima de cisteamina en las ratas a las que se dosificó el compuesto 2 (120 mg/kg; grupo 3) se produjo a los 180 minutos (Figura 30B). Además, mientras que la forma de la curva de concentración plasmática-tiempo en las ratas a las que se dosificó hidrocloreto de cisteamina es un pico alto y agudo, en las ratas a las que se dosificó el compuesto 2 la curva de concentración plasmática-tiempo se aproxima más a una meseta (compare las Figuras 30A y 30B). La concentración plasmática máxima de cisteamina en ratas a las que se dosificó cisteamina HCl (más de 200 uM) es mayor que la observada en sujetos humanos, y estaría asociada con una toxicidad grave en seres humanos. Cuando se administró a ratas Sprague-Dawley en una dosis más baja (20 mg/kg de equivalente de cisteamina base), el bitartrato de cisteamina produjo una Cmax de 81,9 uM, que se produjo entre 5 - 22,5 minutos después de la administración, y los niveles de cisteamina volvieron a los valores iniciales a las 2 horas (Dohil et al. 2012).

(El análisis del contenido gastrointestinal de las ratas que recibieron 120 mg/kg reveló que una cantidad sustancial de fármaco no disuelto permaneció en los estómagos de las ratas 8 y 9 diez horas después de la dosis, lo que indica que estas ratas no recibieron la dosis completa. Por lo tanto, la curva de la Figura 30B es una subestimación de la exposición a la cisteamina que se habría logrado con una dosis completa. )

La comparación de las dosis de 30 mg/kg, 60 mg/kg y 120 mg/kg del compuesto 2 (Figura 31A) revela un aumento progresivo de la Cmax y un retraso progresivo igualmente importante del Tmax, el momento en el que se produce la Cmax: la concentración plasmática máxima en el grupo de 30 mg/kg se produjo inicialmente a los 30 minutos, y después ese nivel se alcanzó de nuevo a los 90 minutos con una caída muy pequeña entre medias. El Tmax en el grupo de 60 mg/kg se produjo a los 90 minutos, y en el grupo de 120 mg/kg a los 180 minutos. En las tres dosis parece haber un carácter bifásico en la curva de concentración de cisteamina frente al tiempo, con un aumento inicial que alcanza un máximo alrededor de los 30 minutos, seguido de un segundo pico (y en los grupos de dosis de 60 y 120 mg/kg, más alto) a las 1,5 - 3 horas.

Tras la reducción del enlace de disulfuro en el tracto gastrointestinal, el compuesto 2 produce dos resto de tiol: N-acetilcisteamina y panteteína. La cisteamina se produce posteriormente mediante dos procesos independientes: la desacetilación de la primera y la escisión de la segunda por la panteteinasa. La evolución temporal de esos dos procesos se puede controlar observando los niveles intestinales y plasmáticos de N-acetilcisteamina y ácido pantoténico, que se crea (junto con la cisteamina) cuando se escinde la panteteína. (El ácido pantoténico tiene una vida media más larga que la cisteamina en el hombre, y aparece en la rata). La Figura 31B muestra que (i) la N-acetilcisteamina se absorbe en la sangre (no conocido previamente) con una cinética sustancialmente similar a la de la cisteamina, lo que sugiere mecanismos de transporte similares. Además, para explicar los altos niveles de cisteamina, debe haber una conversión continua de N-acetilcisteamina en cisteamina tanto en el tracto gastrointestinal (en el que están presentes tanto la N-acetilcisteamina como la cisteamina) como en la sangre. El ácido pantoténico también está presente en el contenido intestinal y en el plasma. Los niveles de ácido pantoténico aumentan rápidamente en la primera hora, lo que indica la producción de cisteamina por la escisión de la panteteína por la panteteinasa, después caen ligeramente a los 90 minutos, y después reanudan un ascenso lento y muy gradual hasta los 240 minutos (Figura 31B), lo que indica contribuciones tanto tempranas como tardías de la escisión de la panteteína a los niveles plasmáticos de cisteamina.

Los niveles de cisteamina en los tejidos a las 10,5 horas fueron, sorprendentemente, superiores a 50 uM en las muestras tanto de hígado como de riñón de las tres ratas del grupo de 120 mg/kg (ratas 7, 8 y 9, que comprenden el grupo de dosificación 3; Figura 32). Los niveles plasmáticos de cisteamina en estas tres ratas a las 10 horas fueron 1,1, 0 y 1,5 uM. Los niveles mucho más elevados en los tejidos pueden reflejar (i) niveles más bajos de panteteinasa en los tejidos en comparación con la sangre (o más específicamente, niveles más bajos de panteteinasa en ciertos tipos celulares específicos, ya que la panteteinasa se expresa en algunas células renales); y/o (ii) más desacetilasa en los tejidos en comparación con el plasma, lo que da como resultado una conversión

más eficiente de N-acetilcisteamina a cisteamina en los tejidos que en la sangre. A modo de comparación, cuando se administró bitartrato de cisteamina (20 mg/kg) a ratas Sprague-Dawley, la vida media tisular de la cisteamina se estimó en 25-29 minutos, y se dedujo que más del 95% de la cisteamina se eliminaría en 150 minutos (Dohil et al. 2012). Dado que la mayoría de los efectos terapéuticos de la cisteamina ocurren en los tejidos, no en la sangre (el riñón es el primer órgano que falla en pacientes con cistinosis), la presencia de cisteamina en el riñón y el hígado diez horas después de la dosificación es altamente significativa desde el punto de vista terapéutico.

#### **Ejemplo 11. Farmacocinética de la cisteamina tras la administración de diferentes disulfuros a ratas.**

##### **Métodos**

Se analizó la farmacocinética de la cisteamina en el plasma sanguíneo después de la administración de hidrocloreuro de cisteamina (30 mg/kg), dihidrocloreuro de cistamina (30 mg/kg), pantetina (30 mg/kg) o disulfuro de pantetina-cisteamina (también conocido como TTI-0102; compuesto 1) (100 mg/kg) a ratas.

Las dosis se expresan en términos de miligramos de cisteamina base que puede aportar cada compuesto por kilogramo de peso corporal. Se calcularon de la siguiente manera: una molécula de TTI-0102, tras la reducción del enlace de disulfuro, produce una molécula de cisteamina y una molécula de panteteína. La escisión posterior de la panteteína por panteteinasa intestinal produce una cisteamina y un ácido pantoténico. Así, una molécula de TTI-0102 produce dos moléculas de cisteamina. Por lo tanto, un mol de TTI-0102 (peso fórmula: 353,52 gramos) produce dos moles de cisteamina (peso fórmula: 77,15 gramos/mol), por lo que se suministran  $77,15 \times 2 = 154,3$  gramos de cisteamina por cada 353,52 gramos de TTI-0102. Por lo tanto, en términos de masa,  $154,3/353,52 = 43,65\%$  de TTI-0102 es convertible en cisteamina después de la degradación. Por el contrario, para calcular una dosis de TTI-0102 en términos de cisteamina base, divida la masa de TTI-0102 entre la masa de cisteamina base administrada:  $353,52/154,3 = 2,291$ . Por lo tanto, para calcular una dosis equivalente de cisteamina de 30 mg/kg de TTI-0102, multiplique  $30 \text{ mg/kg} \times 2,291 = 68,73 \text{ mg/kg}$ . Así, en la discusión a continuación y en las figuras adjuntas, una dosis de "30 mg/kg" de TTI-0102 significa que se administraron 68,73 mg/kg, una dosis de "60 mg/kg" de TTI-0102 significa que se administraron 137,46 mg/kg, y una dosis de "100 mg/kg" de TTI-0602 (también conocido como compuesto 2) significa que se administraron 229,1 mg/kg. El propósito de esta nomenclatura, que es estándar en la bibliografía farmacológica de la cisteamina, es facilitar la comparación de dosis de diferentes precursores de cisteamina y sales de cisteamina. (Se realizaron cálculos similares para las otras tres moléculas. La masa de cisteamina HCl es 113,6 Daltons, de los cuales 77,15 Daltons, o 67,91%, son cisteamina base; por el contrario, para calcular una dosis de cisteamina HCl a partir de una dosis de cisteamina base, multiplique esta última  $\times 1,47$ . Por ejemplo, para calcular la dosis de cisteamina HCl que proporcionará 30 mg/kg de cisteamina base, multiplique  $30 \times 1,47 = 44,2 \text{ mg/kg}$ .)

Cada uno de los cuatro compuestos se administró por sonda a tres ratas Sprague-Dawley macho que pesaban aproximadamente 300 gramos. Todas las dosis se disolvieron en 2,5 mililitros de disolución salina.

Se obtuvieron muestras de sangre de ratas inmediatamente después de la dosificación (dentro de un minuto) y 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos después de la dosificación a través de catéteres de arteria carótida implantados quirúrgicamente antes del estudio farmacocinético. El plasma se obtuvo de la sangre por centrifugación, se congeló rápidamente, y se almacenó a  $-80$  grados centígrados. Varios días después, las muestras de plasma se descongelaron en hielo, y cada una se dividió en alícuotas en dos tubos pareados (20  $\mu$ l por tubo), uno de los cuales se procesó para la medida de tioles (después de la reducción cuantitativa del enlace de disulfuro), mientras que el otro se procesó para el análisis de disulfuros.

Para reducir cuantitativamente los enlaces de disulfuro, el plasma del primer tubo se trató con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 5 mM, un agente reductor de enlaces de disulfuro potente y selectivo, utilizando un protocolo dado a conocer por Dohil et al. (2012). Brevemente, se añadieron 2,2  $\mu$ l de disolución madre de TCEP 50 mM recién preparada a 20  $\mu$ l de plasma, y la muestra se incubó a 37 grados C durante 45 minutos. El volumen de plasma en la muestra emparejada (no reducida) se ajustó añadiendo 2,2  $\mu$ l de agua desionizada.

Después de la etapa de reducción de TCEP, todas las muestras de plasma se desproteinizaron añadiendo 3,5 volúmenes de disolución enfriada con hielo de acetonitrilo (ACN)/1% de ácido fórmico (FA) que contenía estándares internos (se añadieron 77  $\mu$ l de disolución de ACN/1% de FA a 22,2  $\mu$ l de plasma). Los estándares internos fueron cisteamina deuterada (d4) (Toronto Research Chemicals), valina deuterada (d8) y fenilalanina deuterada (d8) (ambas obtenidas de Cambridge Isotope Laboratories; Andover, MA), cada una a una concentración final de 0,2  $\mu$ g/ml en la disolución de ACN/1% de FA.

La proteína desnaturalizada se peletizó mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 grados C en una microcentrífuga. El sobrenadante (25  $\mu$ l) se retiró a un tubo nuevo, se mezcló con 75  $\mu$ l de disolución de ACN/0,1% de FA, y se inyectó directamente en una columna de cromatografía de líquidos de interacción hidrófila Atlantis (HILIC) de  $150 \times 2 \text{ mm}$  (Waters; Milford, MA). Los metabolitos se analizaron utilizando un Nexera X2 U-HPLC (Shimadzu) y un espectrómetro de masas de cuadrupolo híbrido Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). La columna se eluyó isocráticamente a un caudal de 360  $\mu$ l/min con 5% de fase móvil A (10 mM de

formiato de amonio y 0,1% de ácido fórmico en agua) durante 1 minuto, seguido de un gradiente lineal hasta 40% de fase móvil B (acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico) durante 7 minutos. El voltaje de ionización por electropulverización fue 3,5 kV, y los datos se adquirieron mediante un análisis de barrido completo a lo largo de  $m/z$  70-800 a una resolución de 70.000 y una velocidad de adquisición de datos de 3 Hz. Se descubrió que la espectrometría de masas en el modo de iones positivos produce mejores señales de los analitos de interés. El voltaje de la fuente de ionización fue -3,0 kV, y la temperatura de la fuente fue 325 °C. Los datos de MS se procesaron utilizando Tracefinder (versión 3.2, Thermo Fisher Scientific).

Se generaron curvas estándar para cisteamina y panteteína (de Sigma-Aldrich) mediante dilución seriada en plasma (100, 75, 50, 25, 15, 10, 5, 3, 1 y 0,5  $\mu$ M) o en la matriz tisular relevante. La pendiente de la línea de mejor ajuste a través de los estándares se utilizó para calcular las concentraciones plasmáticas de esas sustancias a partir de los recuentos de iones de LC-MS.

Además de las muestras de plasma, se obtuvieron contenidos gastrointestinales (contenidos del estómago, contenidos del intestino delgado proximal, contenidos del intestino delgado distal, y contenidos del ciego/colon) de las ratas al final del estudio (6 horas después de la dosificación), y se congelaron rápidamente. Los niveles tisulares de cisteamina y panteteína se midieron en los contenidos gastrointestinales. El protocolo para el análisis de los tejidos consistió en (i) triturar fragmentos de tejido congelado sobre hielo seco para obtener trozos pequeños; (ii) pesar varios trozos de tejido congelado (~25 - 150  $\mu$ g) en un tubo de microcentrífuga tarado de 1,5 ml con dos cojinetes de bolas de metal, y almacenarlos inmediatamente en hielo seco; (iii) homogeneizar criogénicamente los fragmentos de tejido utilizando un Retsch Cryomill a 250 hercios durante 5 minutos; (iv) descongelar cada muestra en hielo, añadir dos volúmenes de agua (p.v., es decir, se añadieron 2 microlitros de agua por cada miligramo de tejido homogeneizado) para obtener una dilución de aproximadamente 1:3; (v) retirar 20  $\mu$ l del polvo de tejido resuspendido a un nuevo tubo, añadir 2,2  $\mu$ l de TCEP 50 mM (concentración final de 5 mM) e incubar durante 45 minutos a 37 grados C (muestras tratadas con TCEP), o añadir 2,2  $\mu$ l de agua desionizada en lugar de TCEP (muestras sin TCEP); (vi) añadir 3,5 volúmenes de acetonitrilo: ácido fórmico al 0,1%, mezclar en vórtice durante 15 segundos, y después pelletizar la proteína precipitada por centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm en una microcentrífuga a 4 grados C; (vii) transferir 25  $\mu$ l de sobrenadante a un nuevo tubo que contiene 75  $\mu$ l de ACN/0,1% de FA; (viii) inyectar muestras en el aparato de LC-MS descrito anteriormente, utilizando la misma columna y condiciones de ejecución que para las muestras de plasma.

## Resultados y discusión:

En ratas dosificadas con hidrocloreto de cisteamina (30 mg/kg), hay un aumento rápido en los niveles plasmáticos de cisteamina; los parámetros farmacocinéticos indican que la mitad de la dosis se absorbe en un minuto, y la concentración máxima observada (~50  $\mu$ M) ocurre en el primer punto de tiempo medido, 10 minutos después de la alimentación por sonda. Los niveles de cisteamina disminuyen a niveles micromolares bajos a las 4 horas (Figura 1). Los niveles altos de cisteamina se asocian con halitosis, olor corporal, náuseas, vómitos, anorexia y dolor de estómago.

En ratas dosificadas con cistamina HCl (30 mg/kg), el pico plasmático de cisteamina ocurre más tarde (entre 30 y 60 minutos) y es más amplio (mayor AUC que el de cisteamina HCl). Los niveles de cisteamina descienden entonces hasta valores basales alrededor de 4 horas después (Figura 1). Por lo tanto, sorprendentemente, la cistamina administrada al estómago en disolución salina (es decir, una forma de dosificación de liberación instantánea) proporciona una exposición superior a la cisteamina en comparación con la propia cisteamina; sin embargo, los altos niveles máximos y la rápida eliminación son similares a los de las ratas dosificadas con hidrocloreto de cisteamina.

Inesperadamente, en ratas dosificadas con pantetina (30 mg/kg), los niveles plasmáticos de cisteamina nunca superaron 2,5 micromolar. Por lo tanto, la pantetina, en ausencia de agentes que mejoren la reducción del enlace de disulfuro y/o la expresión de panteteinasa, es un mal agente de administración de cisteamina en ratas. (La fisiología gastrointestinal humana difiere de la fisiología de la rata en varios aspectos potencialmente significativos, incluidos el pH y el volumen y la concentración de glutatona).

En ratas dosificadas con TTI-0102 (100 mg/kg), los niveles plasmáticos de cisteamina no alcanzan su punto máximo hasta los 90 minutos, entonces permanecen elevados por encima de 10  $\mu$ M hasta después de 4 horas, y por encima de 5  $\mu$ M durante todo el período de seis horas evaluado. Además, el AUC (499 minuto $\cdot$  $\mu$ g/l) es mayor que el AUC de cisteamina HCl (365), mientras que la  $C_{max}$  es menor (34,4  $\mu$ M frente a ~55,3  $\mu$ M, respectivamente) (Figura 2). Por lo tanto, TTI-0102 (100 mg/kg) proporciona una mayor exposición a la cisteamina que el hidrocloreto de cisteamina, el dihidrocloreto de cistamina o la pantetina, proporciona niveles plasmáticos superiores a 5 y 10 micromolar durante un tiempo más prolongado, y tiene una  $C_{max}$  más baja que los dos anteriores, todas las cuales son propiedades farmacológicas deseables.

En general, el metabolismo de la cisteamina en roedores es más rápido (por ejemplo, la vida media es más corta) que en seres humanos, por lo que los parámetros farmacocinéticos de las ratas no deben interpretarse como directamente traducibles al entorno humano. Sin embargo, la dosis

**Ejemplo 12. Farmacocinética de la cisteamina en el plasma de ratas después de la administración de disulfuro de panteteína-cisteamina mixto (TTI-0102) a 30, 60 o 100 mg/kg.**

Cuando se administra a ratas dosis de TTI-0102 de 30 mg/kg, 60 mg/kg o 100 mg/kg (Figura 2), el AUC aumenta progresivamente con la dosis (175, 252, 499 minuto\*ug/l, respectivamente), como se esperaba. Sin embargo, inesperadamente, (i) la Cmax permanece casi constante (29,4, 34,4, 34,4 uM, en las tres dosis) y (ii) la duración de la exposición a la cisteamina plasmática aumenta progresivamente con la dosis. En particular, son notables las diferencias en el AUC, la vida media de absorción y el tiempo medio de residencia (MRT) entre las dosis de 60 y 100 mg/kg de TTI-0102. Por lo tanto, niveles elevados del compuesto 1 (por ejemplo, 50 - 150 mg/kg) proporcionan un patrón farmacocinético casi ideal, manteniendo la cisteamina plasmática por debajo de los niveles que causan efectos secundarios, pero por encima de los niveles requeridos para la eficacia, en particular cuando se mantienen durante períodos prolongados.

**Ejemplo 13. Metabolismo gastrointestinal de la cisteamina y del disulfuro de panteteína-cisteamina mixto (TTI-0102) en ratas**

El análisis del contenido gastrointestinal de las ratas a las que se les administró hidrocloreto de cisteína (30 mg/kg) y de las ratas a las que se les administraron 30, 60 y 100 mg/kg reveló varias diferencias inesperadas entre los tres niveles de dosis del compuesto 1 (Figura 3). En ratas a las que se les administró una dosis de 100 mg/kg del compuesto 1, se observaron niveles elevados de panteteína en todos los niveles del tracto gastrointestinal (estómago, intestino delgado proximal y distal, colon) seis horas después de la dosis. En el intestino delgado (SI) proximal y distal se procesaron muestras con y sin el agente reductor de enlaces de disulfuro TCEP. La comparación de las muestras "sin TCEP" con las muestras con TCEP revela que alrededor de la mitad de la panteteína está en forma de tiol, mientras que la otra mitad (aproximadamente) aparentemente está unida por disulfuro a otro tiol. El hecho de que existan altas concentraciones de panteteína libre en el intestino delgado (613 uM en el SI proximal, 219 uM en el SI distal) indica que la escisión por panteteinasa fue un factor limitante en la conversión de panteteína en cisteamina (y ácido pantoténico). Por lo tanto, se esperaba que la coadministración de un agente inductor de panteteinasa con el compuesto 1, o en algún intervalo (por ejemplo, 2-4 horas) después de la administración del compuesto 1 (100 mg/kg), mejore la conversión de panteteína en cisteamina y aumente los niveles plasmáticos de cisteamina comenzando varias horas después de la administración de la dosis, cuando comienzan a disminuir. Los productos naturales que regulan la expresión de los genes de la panteteinasa (VNN1 y VNN2) son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, sulforafano, S-alil cisteína, trisulfuro de dialilo, grasa oxidada, ácidos grasos omega-3 y oleiletanolamida. Los fármacos que inducen la expresión de la panteteinasa incluyen agonistas de PPAR alfa y agonistas de PPAR gamma. En general, son útiles los fármacos o productos naturales que inducen la expresión de Nrf2. (Nrf2 es un factor de transcripción que activa la expresión de la panteteinasa).

El análisis de los niveles de cisteamina en la SI proximal y distal de ratas tratadas con el compuesto 1 (100 mg/kg) revela concentraciones moderadas de cisteamina libre de 129 y 34 uM, respectivamente (muestras sin TCEP). Después de la reducción de TCEP, esos niveles aumentan a 430 y 899 uM, respectivamente. Un patrón similar se observa con la panteteína. Por lo tanto, una fracción sustancial de la cisteamina en el intestino delgado está unida por disulfuro (ya sea en forma de compuesto 1 no reducido o disulfuro enlazado a otro tiol a través del intercambio tiol-disulfuro), y la fracción aumenta significativamente desde el SI proximal al SI distal. Esto puede explicarse por la presencia de mayores concentraciones de glutatona derivada de la bilis en el SI proximal. (La bilis es la principal fuente de glutatona en el tracto gastrointestinal, aunque los enterocitos también segregan glutatona y cisteína). Por lo tanto, no hay suficiente poder reductor en el tracto gastrointestinal para reducir (o mantener reducido) todo el compuesto 1. Esto limita la conversión del compuesto 1 a cisteamina (ya sea mediante reducción del enlace de disulfuro o reducción seguida de escisión por panteteinasa). La administración de un agente reductor fisiológico con o después del compuesto 1 (100 mg/kg) puede aumentar la eficiencia de conversión del compuesto 1 en cisteamina. Se pueden utilizar diversos tioles fisiológicos, incluyendo, por ejemplo, glutatona, éster dietílico de glutatona, gamma glutamylcisteína, ácido dihidrolipoico, N-acetylcisteína, homocisteína, panteteína, 4-fosfopanteteína, desfosfo-coenzima A, coenzima A, vitamina E o ácido ascórbico. Cualquiera de estos agentes puede administrarse con o después del compuesto 1, o coformularse con el compuesto 1. Las formulaciones útiles pueden incluir formulaciones de liberación retardada o de liberación sostenida que proporcionan el agente reductor en el momento (por ejemplo, 2 horas después de que comienza la liberación del compuesto 1) y lugar (por ejemplo, intestino delgado distal) en el que más se necesita poder reductor adicional del enlace de disulfuro.

El análisis del contenido del colon (TCEP reducido) revela altas concentraciones tanto de cisteamina como de panteteína, lo que confirma una conversión incompleta del precursor del compuesto 1 a cisteamina, y por lo tanto hay margen para mejorar aún más la forma de la curva de concentración del fármaco frente al tiempo aumentando la producción y la absorción de cisteamina durante un intervalo de 4 - 12 horas después de la dosificación. Por ejemplo, la administración de dosis altas del compuesto 1 (por ejemplo, 100 mg/kg o más) con una comida rica en calorías prolongará la liberación del compuesto 1 del estómago y extenderá el período durante el cual se reduce, la panteteína se escinde y se absorbe como cisteamina. Una formulación gastrorretentiva del compuesto 1 es otra forma de lograr el propósito de la liberación prolongada desde el estómago.

**Ejemplo 14. Síntesis de disulfuros mixtos - acilación de cistamina**

Se ha descrito una amplia variedad de métodos para sintetizar disulfuros mixtos (véanse las revisiones de Witt et al. Langmuir 23:2318 (2007); Musiejuk et al. Org. Prep. and Proc. 47,2:95 (2015)). Sin embargo, a pesar de la extensa investigación sobre la química de la formación de enlaces de disulfuro (por ejemplo, Singh et al. Sulfur-Containing Functional Groups (1993)), los métodos eficientes para unir un par específico de tioles deben determinarse empíricamente. Además, al desarrollar métodos sintéticos para sustancias farmacológicas, se deben tener en cuenta consideraciones tales como el perfil de impurezas (tanto la identidad como la cantidad de impurezas), la escalabilidad (utilizando procedimientos y equipos económicos), el estado sólido (por ejemplo, amorfo o cristalino, que puede tener diferentes características de solubilidad o estabilidad) y la forma de sal (que también puede afectar la disolución, la estabilidad y la palatabilidad).

El siguiente ejemplo describe una síntesis de TTI-0102 y sus sales. Este método puede adaptarse a la síntesis de otros disulfuros asimétricos.

**Reactivos y métodos.**

A continuación se enumeran los siete reactivos para la hemiacilación de cistamina por pantotenato:

Reactivo	Chemical Abstracts Service (CAS) #	Equivalentes
1. dihidrocloruro de cistamina	56-17-7	2-4
2. pantotenato hemicálcico	137-08-6	1
3. N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC)	538-75-0	3-5
4. Hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt·H <sub>2</sub> O)	123333-53-9	1-3
5. Disolventes: metanol, dimetilformamida, agua.		

El esquema de reacción se ilustra en la Figura 36, panel A. Los reactivos 1, 2 y 3 se disolvieron en una mezcla de DMF (80 ml) y H<sub>2</sub>O (160 ml). Posteriormente, la mezcla se enfrió hasta 0 °C, y se añadió gota a gota el reactivo 4 disuelto en 80 ml de DMF. La reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C, y después se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El material de reacción bruto se cargó entonces en una columna de gel de sílice, y TTI-0102 se separó de la cistamina no acilada, de la cistamina doblemente acilada (pantetina) y de otros subproductos no deseados (véanse detalles en el Ejemplo 5). TTI-0102 eluye antes que la cistamina, que es el principal contaminante.

Alternativamente, se pueden cristalizar selectivamente TTI-0102 o sustancias contaminantes, y los cristales se pueden separar de las sustancias disueltas. Véase el ejemplo 17 para una discusión de las formas de sal y la precipitación de TTI-0102.

**Resultados.**

El rendimiento de TTI-0102 de la reacción de acilación es 95% a 97%. Después de la purificación cromatográfica, el espectro de RMN de protones está libre de picos contaminantes detectables (Figura 37).

**Observaciones.**

La reacción de acilación tiene las siguientes ventajas: (i) pequeño número de etapas, (ii) materias primas fácilmente obtenibles, (iii) alto rendimiento (97%), y (iv) escalable. En la síntesis a gran escala, la purificación cromatográfica puede omitirse o utilizarse como una etapa de "pulido", mediante la cristalización selectiva de TTI-0102 (véase el ejemplo 17).

**Ejemplo 15. Síntesis de disulfuros mixtos - intercambio de tio-disulfuro de cisteamina y pantetina**

El siguiente ejemplo describe una síntesis de TTI-0102 y sus sales. Este método puede adaptarse a la síntesis de otros disulfuros asimétricos.

**Reactivos y métodos.**

Los reactivos para el intercambio de disulfuro de cisteamina-pantetina se enumeran a continuación:

Reactivo	CAS No.	Cantidad	Equivalentes	Concentración
1. (D)-Pantetina	16816-67-4	1 g	1	1,8 mM
2. cisteamina (base libre)	60-23-1	0,42 g	3	5,4 mM
3. Disolventes: ácido acético (AcOH), metanol (MeOH), y agua.				

El esquema de reacción se ilustra en la Figura 36, panel B. Primero, los reactivos 1 y 2 se disolvieron en 20 ml de MeOH, y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Se podrán utilizar tiempos de reacción tan cortos como una hora.

#### Purificación por cromatografía.

La mezcla de reacción se dividió en porciones de 2 gramos (según el 50% esperado del producto), se evaporó a vacío, y se resuspendió en 10 ml de DCM : MeOH : AcOH (relación 10 : 3: 0,1) (por ejemplo, 10 ml por cada 2 gramos de producto esperado). Se preparó una columna de gel de sílice (Sigma Aldrich Silica Gel n.º de cat. 60737, CAS No. 112926-00-8) utilizando 30 cm cúbicos (15 g de gel seco) por 1 gramo del producto esperado. Después de cargar el material de reacción resuspendido, la columna se lavó con 300 ml de una mezcla de disolventes de DCM : MeOH : AcOH (relación 10 : 3: 0,1), posteriormente se lavó con mezcla de disolventes de DCM : MeOH : AcOH (10 : 4 : 0,1) (300 ml), y se lavó nuevamente con mezcla de disolventes de DCM : MeOH : AcOH (10 : 5 : 0,1). Las fracciones de la columna se recogieron y se analizaron para determinar el contenido de producto mediante cromatografía de capa fina (TLC) en gel de sílice utilizando placas de TLC-PET (artículo Merck n.º 99577) resueltas en una mezcla de disolventes DCM : MeOH (3 : 1). El producto se detectó mediante TLC a un R<sub>f</sub> de %. Las fracciones que contenían el producto puro se recogieron, se concentraron, y se secaron a vacío. Se realizó la RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) en una muestra representativa.

#### Resultados.

El rendimiento de TTI-0102 de la reacción cisteamina-pantetina es 50% a 55%. Después de la purificación cromatográfica, el espectro de RMN de protones está libre de picos contaminantes detectables.

#### Observaciones.

La reacción de intercambio de tiol-disulfuro tiene las siguientes ventajas: (i) pocas etapas y condiciones suaves (reacción "en un solo recipiente"), (ii) materias primas económicas y de fácil obtención, (iii) rendimiento moderado, y (iv) escalable. La reacción de intercambio de tiol-disulfuro puede ser compatible con un procedimiento continuo.

#### Ejemplo 16. Síntesis de disulfuros mixtos - intercambio de disulfuro de tiol de panteteína y cistamina

El siguiente ejemplo describe una síntesis de TTI-0102 y sus sales. Este método puede adaptarse a la síntesis de otros disulfuros asimétricos.

#### Reactivos y métodos.

Los reactivos para la hemiacilación de cistamina por pantotenato se enumeran a continuación:

Reactivo	Equivalentes	cantidad
1. (D)-Panteteína	3 eq	2,6 g, 9,3 mmol
2. hidrocloreto de cisteamina	1 eq	700 mg, 3,1 mmol
3. MeONa	1,3 eq	preparado añadiendo 162 mg de NaH al 60% a 5 ml de MeOH

#### Métodos.

Al igual que en la versión de cisteamina-pantetina de esta reacción (Ejemplo 15), el disolvente es metanol. La panteteína se puede comprar, o producir a partir de pantetina mediante reducción de enlaces de disulfuro. El reactivo 1 se disolvió en 10 ml de MeOH. Posteriormente, se añadió la disolución del reactivo 2, y se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El reactivo 3 se disolvió por separado en 10 ml de MeOH, y se añadió a la mezcla de reacción. Toda la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 17. Formas salinas de TTI-0102 - Características físicas y precipitación.



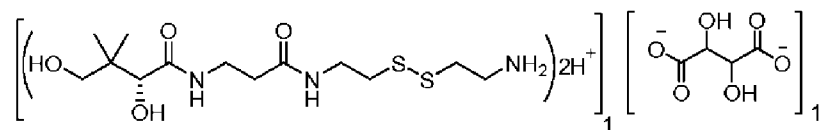
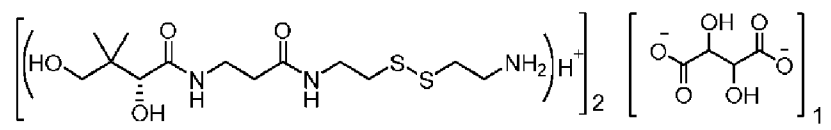
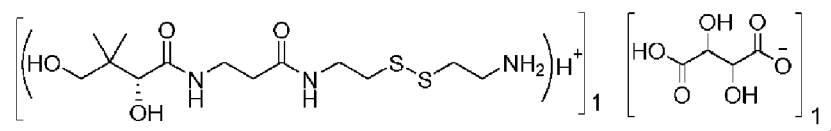
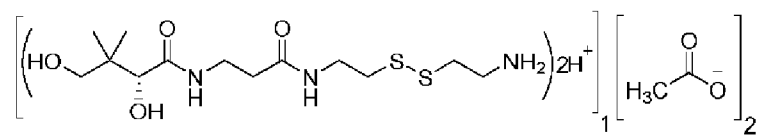
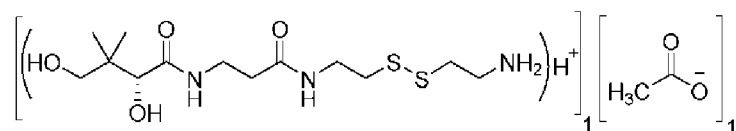
TTI-0102 se preparó como en el Ejemplo 14. El producto bruto se obtuvo por evaporación de agua y DMF. El residuo se suspendió en acetato de etilo/agua; la diciclohexilurea (DCU) precipitada se separó por filtración. La disolución se evaporó y se suspendió en metanol. El precipitado (ácido pantoténico sin reaccionar) se separó por filtración. El filtrado se concentró, y entonces se disolvió en un pequeño volumen de metanol. Después de añadir diclorometano, el hidrocloreto de cistamina precipitó y se separó por filtración. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se cristalizó en metanol:acetona (1:10) para proporcionar hidrocloreto de TTI-1.

La sal de tartrato se formó y cristalizó a partir de una mezcla de MeOH : DCM. La forma sólida se separó por filtración (precipitado), y el filtrado se evaporó.

#### Observaciones.

La base libre de TTI-0102, cuando se seca, es un sólido vítreo transparente a ligeramente amarillo. Esta observación condujo a la investigación de las formas salinas de TTI-0102. La sal de acetato de TTI-0102 es más estable que la base libre, y se puede liofilizar a una forma sólida (un sólido blanco lleno de burbujas) que se puede triturar para producir un polvo. La sal de tartrato de TTI-0102 también se puede liofilizar a una forma sólida, y tiene la ventaja adicional de ser más propensa a la precipitación que la sal de acetato, como se describió anteriormente.

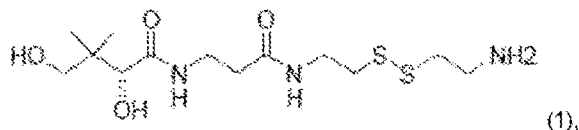
La sal de adición de ácido del compuesto 1 puede tener cualquiera de las siguientes fórmulas:



La forma de la sal de adición de ácido del compuesto 1 se puede controlar cambiando la relación molar del ácido (por ejemplo, ácido carboxílico tal como ácido acético o ácido tartárico) al compuesto 1 en la disolución en la que se forma la sal de adición de ácido, y/o ajustando el pH de la disolución de la que se aísla la sal. Las sales de adición de ácido del compuesto 1 pueden presentar propiedades ventajosas, tal como la estabilidad con respecto a la degradación del disulfuro.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, que comprende el compuesto 1:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de un trastorno sensible a la cisteamina en un sujeto, en el que una dosis de 50 a 150 miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra por vía oral al sujeto una o más veces al día, y en el que el trastorno sensible a la cisteamina se selecciona de cistinosis; enfermedad neurodegenerativa; enfermedad del neurodesarrollo; enfermedad neuropsiquiátrica; enfermedad mitocondrial; enfermedades fibróticas del riñón, del hígado o del pulmón; infección parasitaria; anemia de células falciformes; cáncer; enfermedad isquémica, incluyendo cardiopatía isquémica o accidente cerebrovascular; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); fibrosis quística (FQ); infección bacteriana; infección viral; esteatohepatitis no alcohólica (NASH); esteatohepatitis alcohólica; y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD).

2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que la dosis no se administra dentro de las 2 horas siguientes a la administración de un agente reductor al sujeto.

3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la dosis se administra al sujeto una, dos o tres veces al día.

4. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la dosis es de 2.000 a 6.000 mg.

5. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se formula para liberación inmediata.

6. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, (i) se formula como un polvo, y la forma de dosificación es una bolsita, o (ii) se formula como un comprimido o cápsula, o (iii) se formula como una disolución o suspensión líquida.

7. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho trastorno sensible a la cisteamina es una enfermedad neurodegenerativa seleccionada del grupo que comprende la enfermedad de Huntington, trastornos neurodegenerativos con acumulación de hierro en el cerebro, enfermedad de Parkinson, y enfermedad de Alzheimer.

8. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho trastorno sensible a la cisteamina es una enfermedad del neurodesarrollo seleccionada de síndrome de Rett y otros trastornos asociados con la mutación MECP2.

9. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho trastorno sensible a la cisteamina es una enfermedad mitocondrial seleccionada de síndrome de Leigh, MELAS, MERFF, y ataxia de Friedreich.

10. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho trastorno sensible a la cisteamina es una enfermedad fibrótica seleccionada de enfermedad de Alport, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), esteatohepatitis alcohólica (EHA), y fibrosis pulmonar.

11. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho trastorno sensible a la cisteamina es una infección bacteriana o una infección viral.

12. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-11, en la que la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto 1 es una sal de adición de ácido del compuesto 1, y en la que la sal de adición de ácido es acetato.

13. Una sal de adición de ácido del compuesto 1 como se define en la reivindicación 1, en la que la sal de adición de ácido es un acetato.

DIBUJOS

FIG. 1

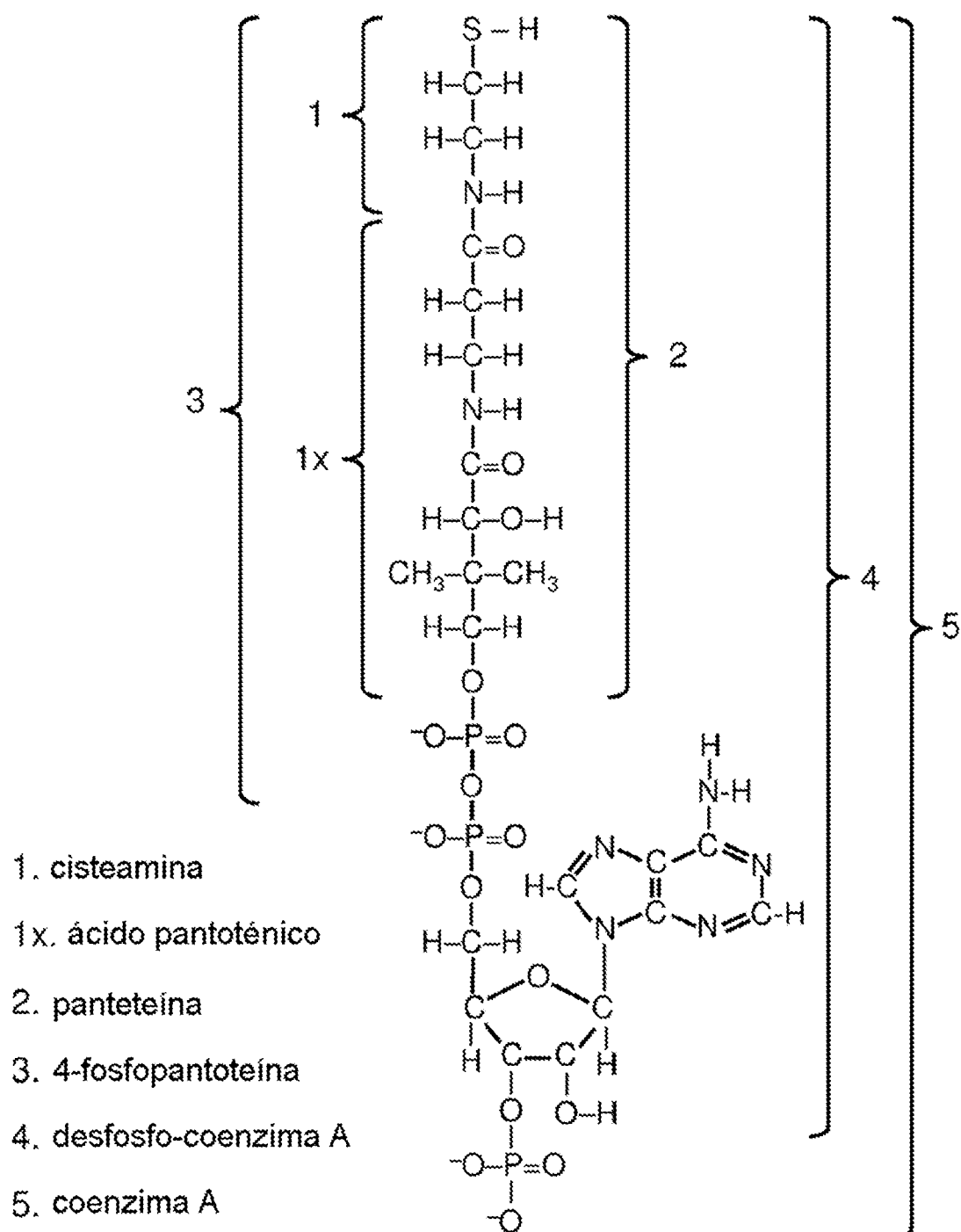


FIG. 2

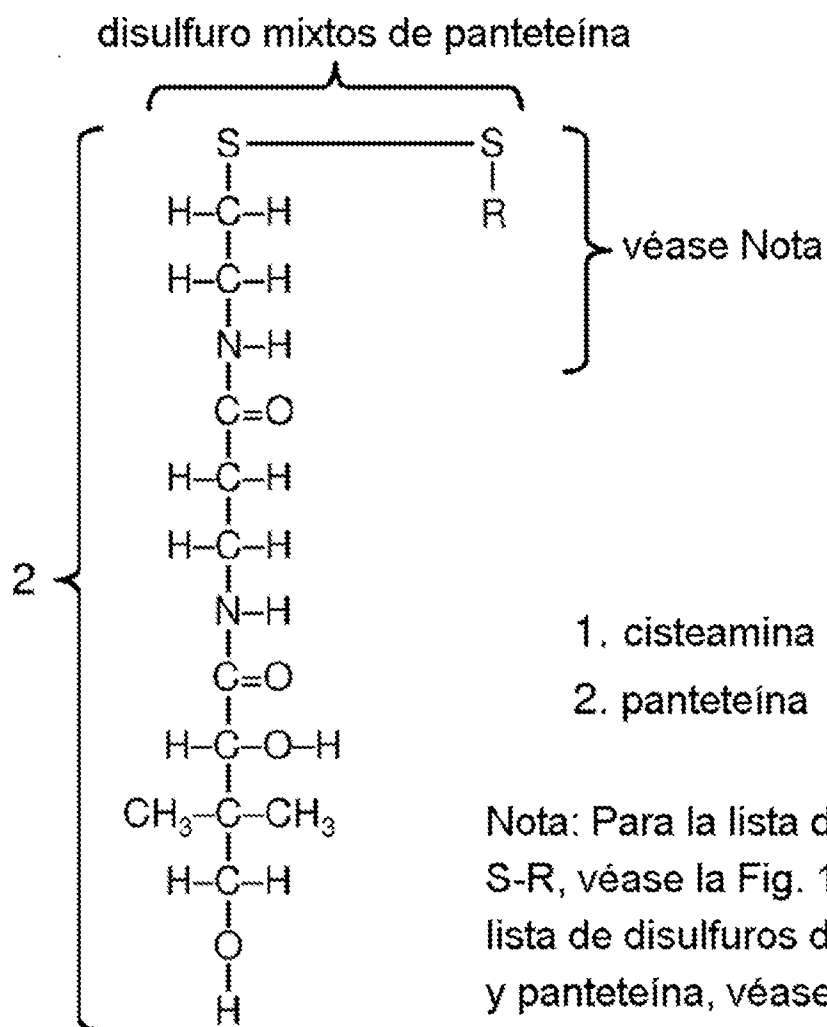
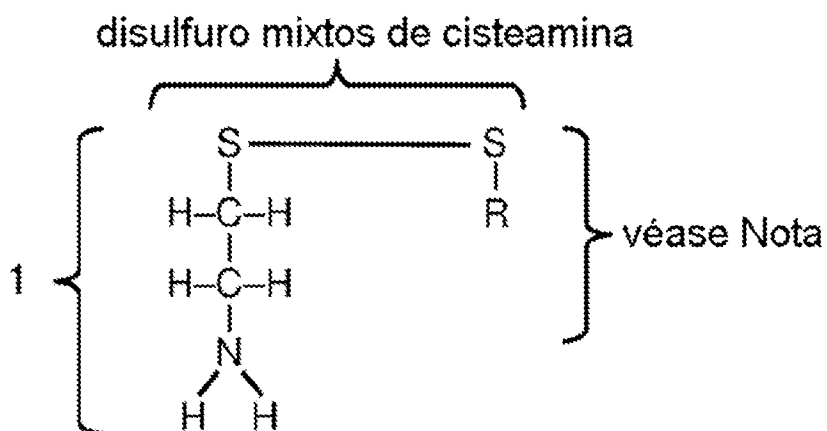


FIG. 3

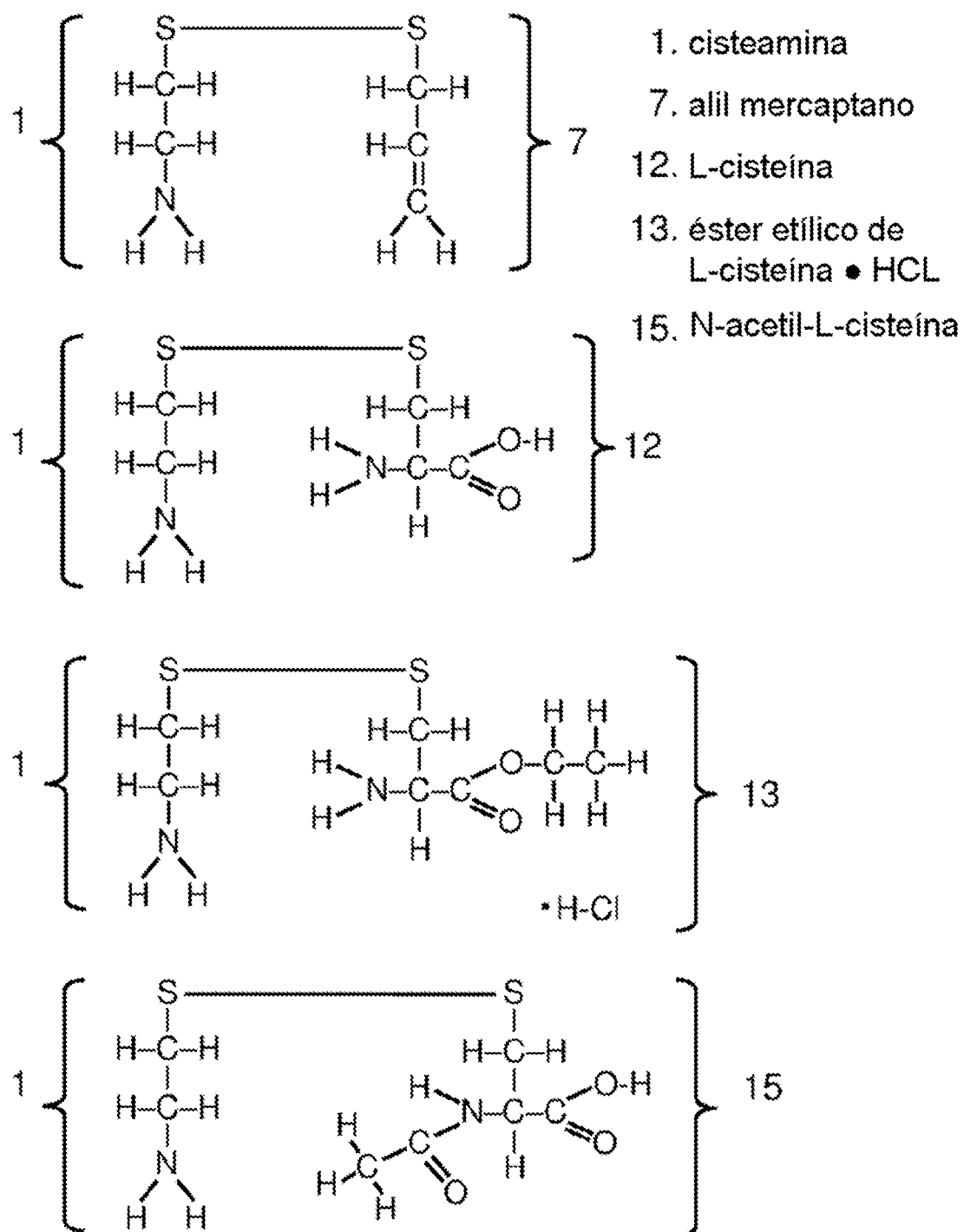


FIG. 4

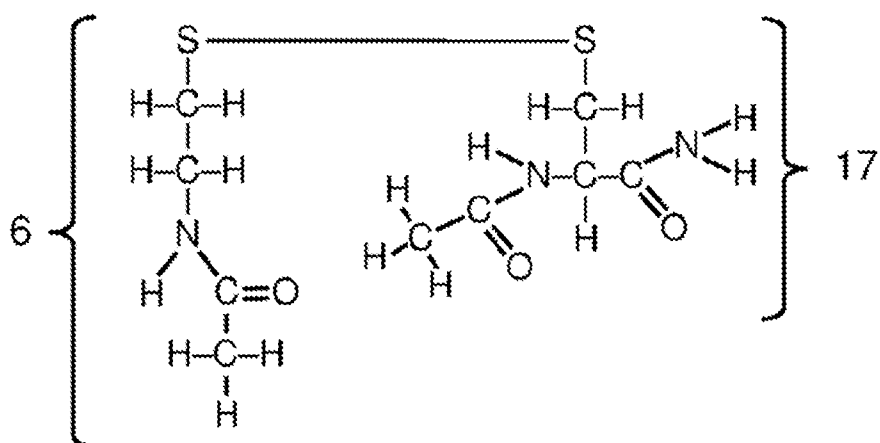
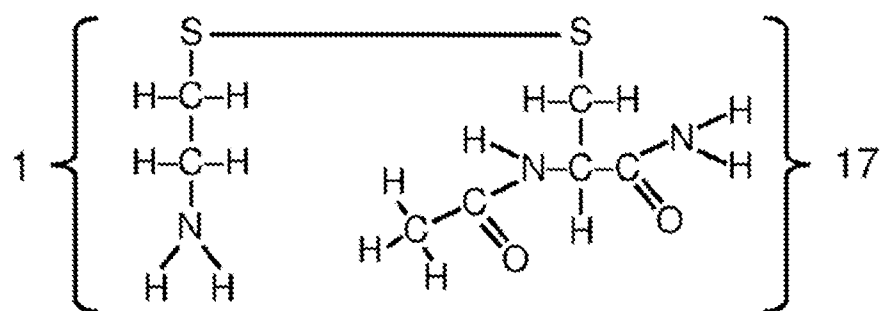
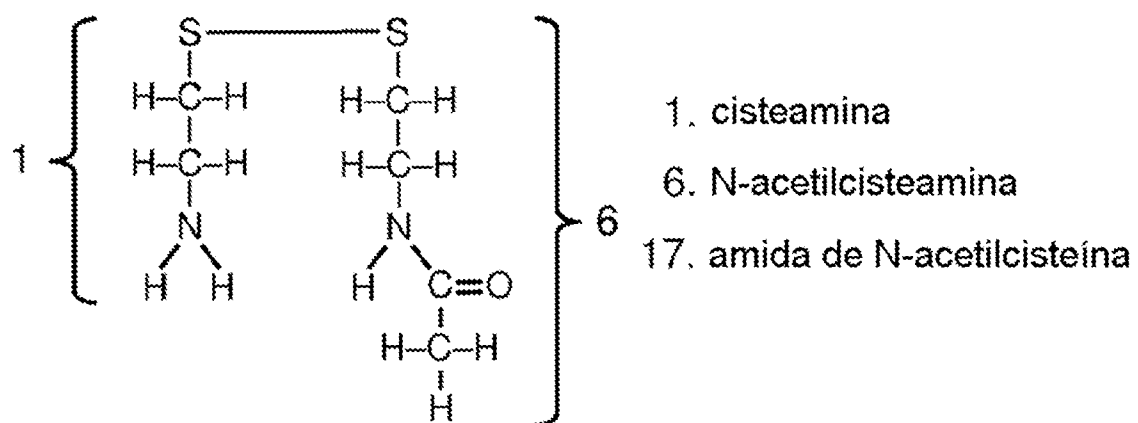


FIG. 5

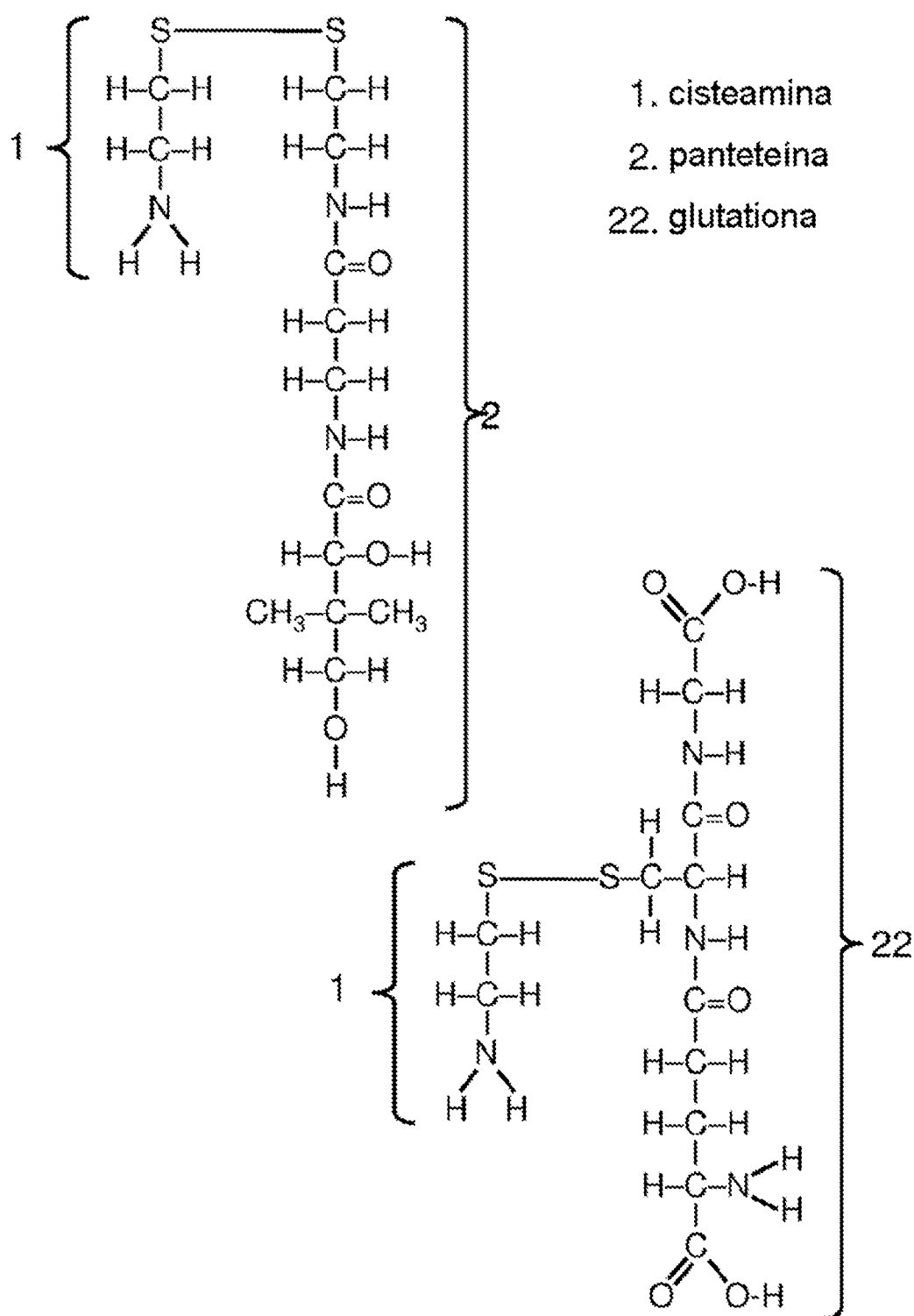


FIG. 6

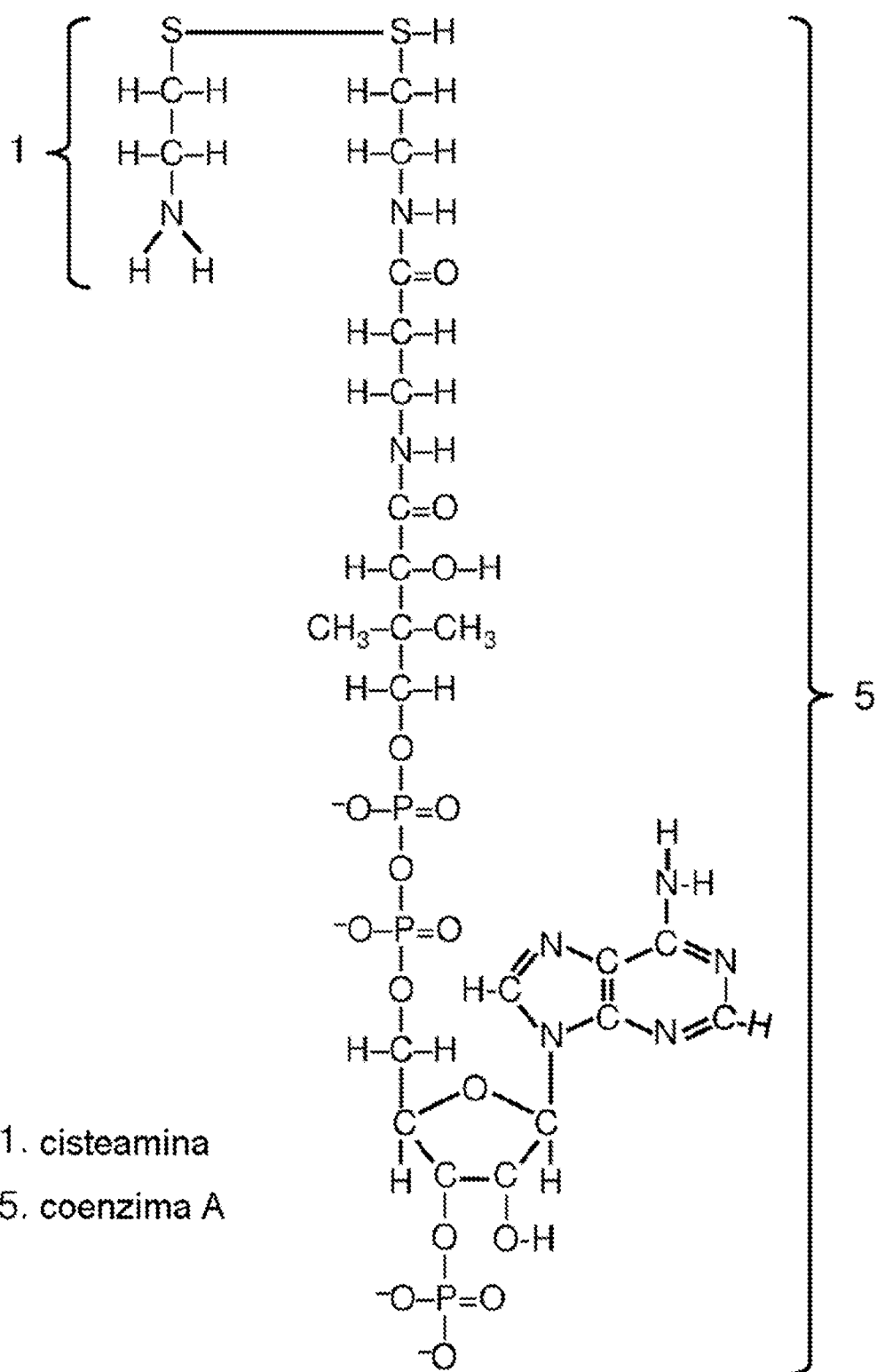




FIG. 7

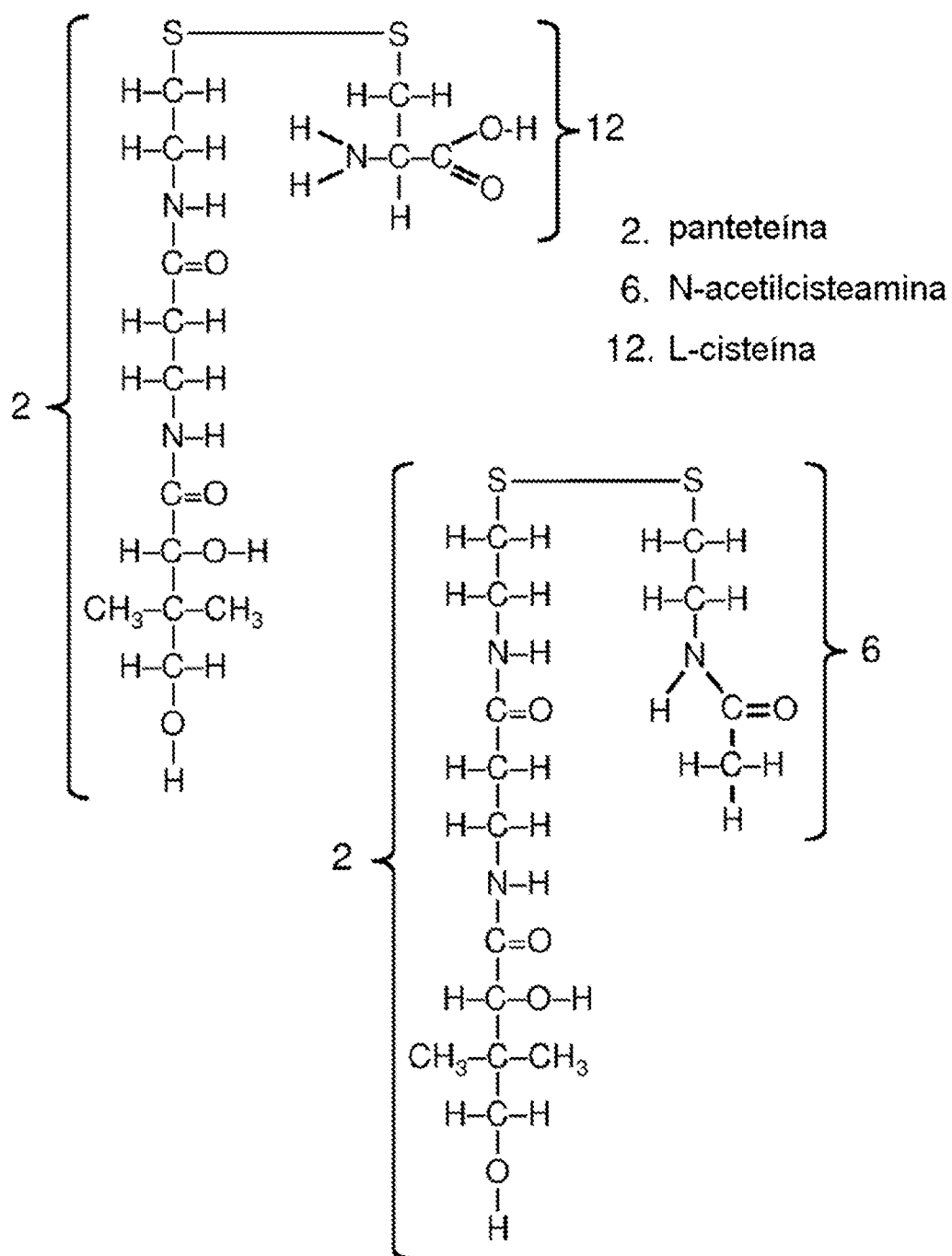


FIG. 8

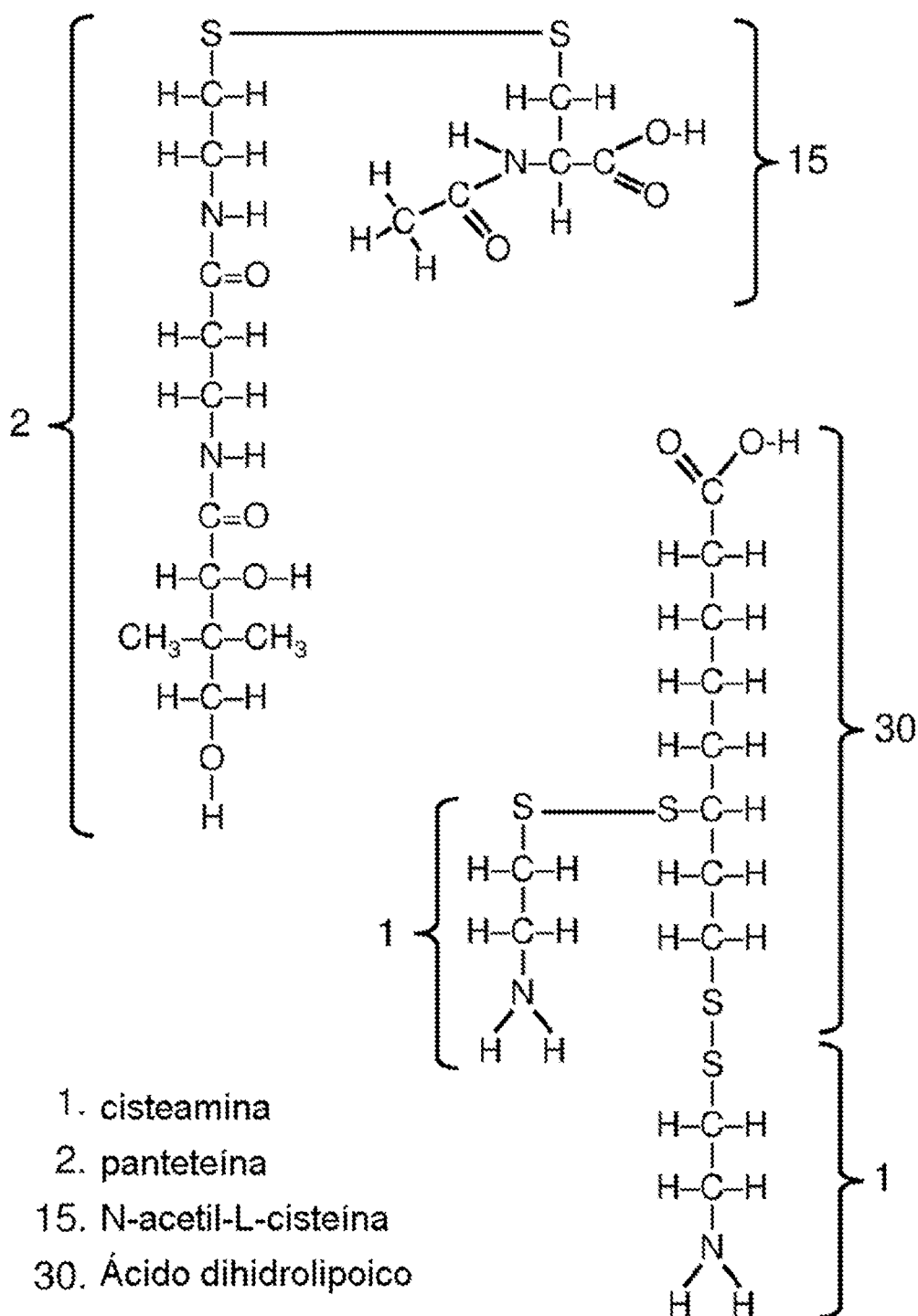


FIG. 9

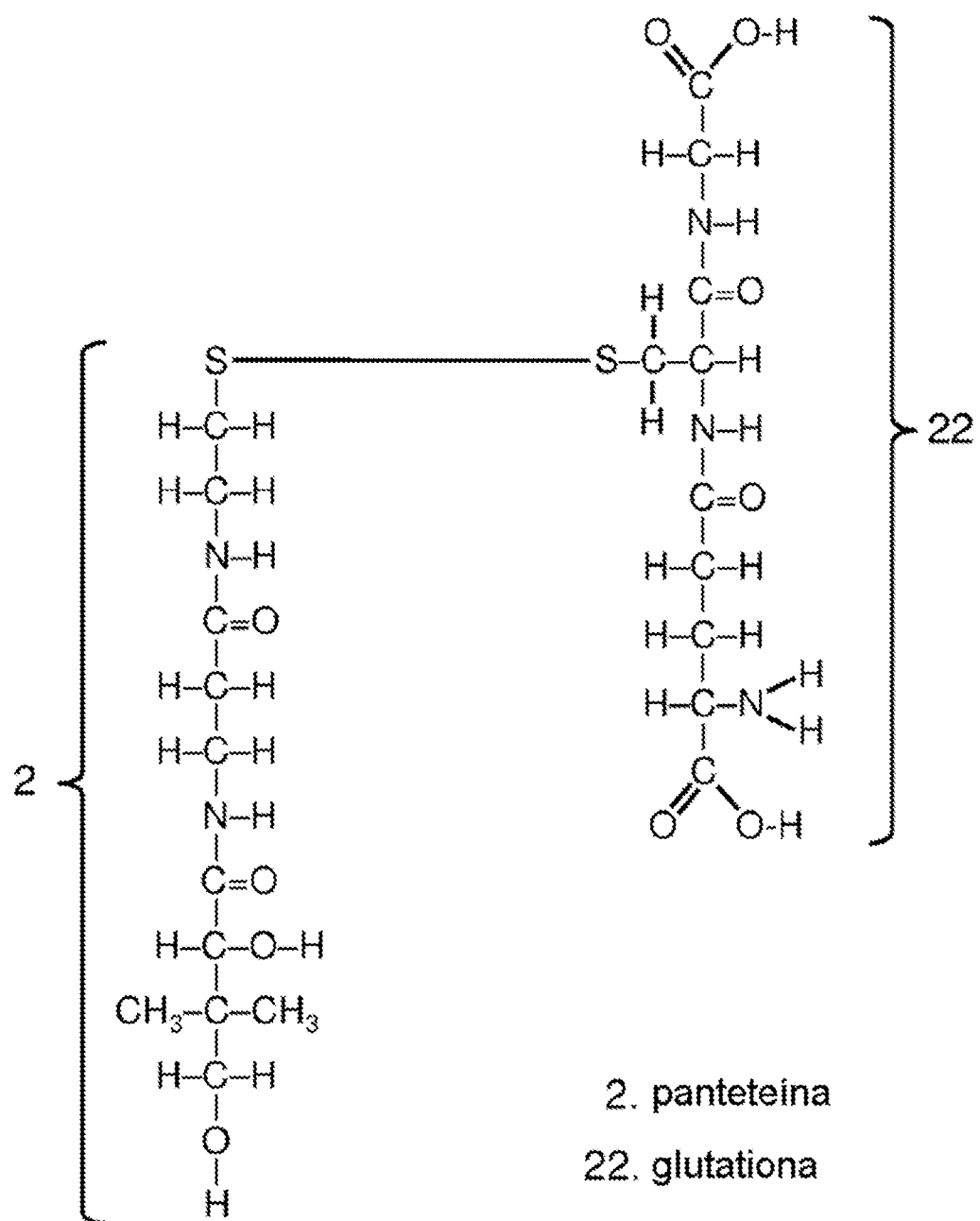


FIG. 10

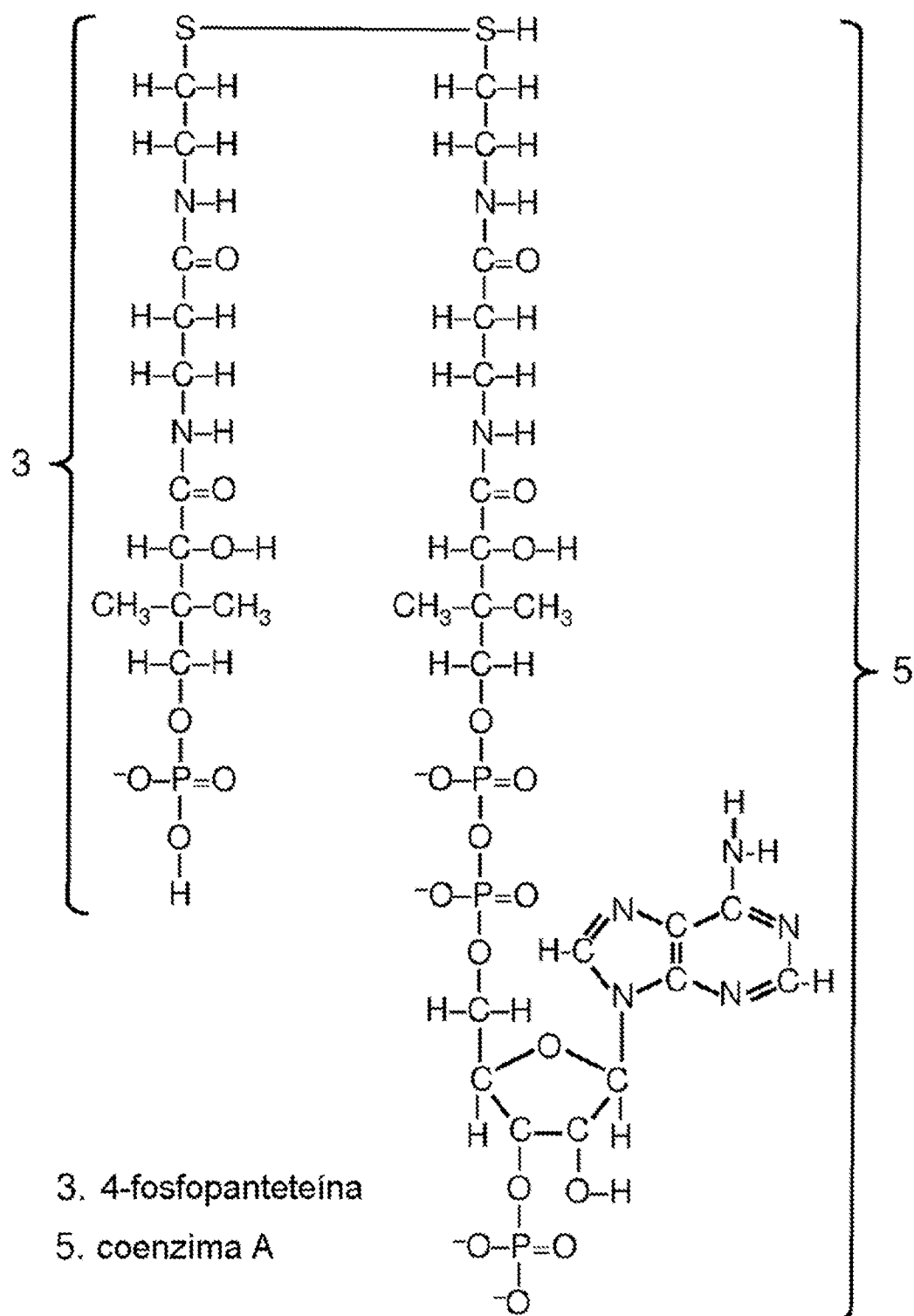


FIG. 11

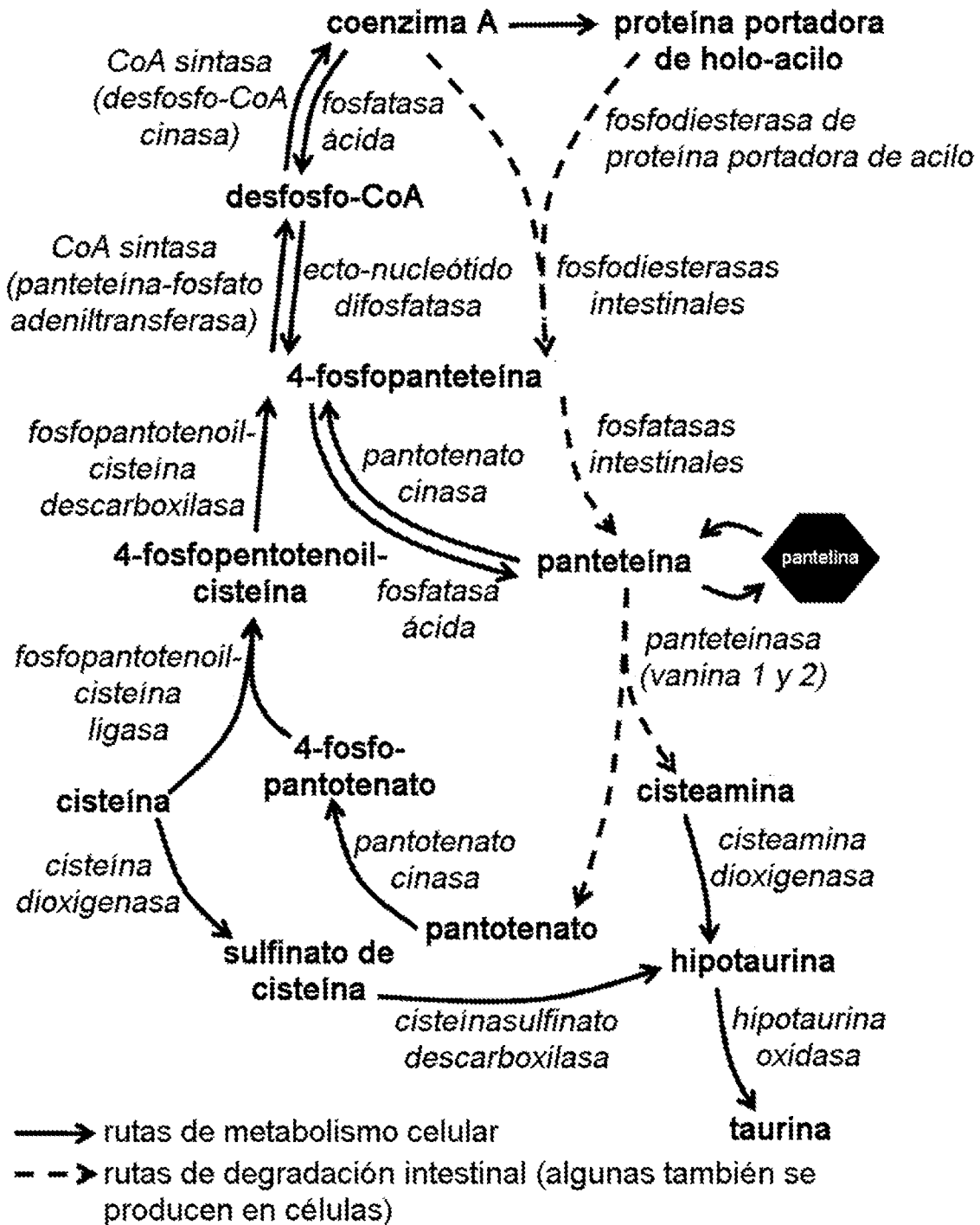
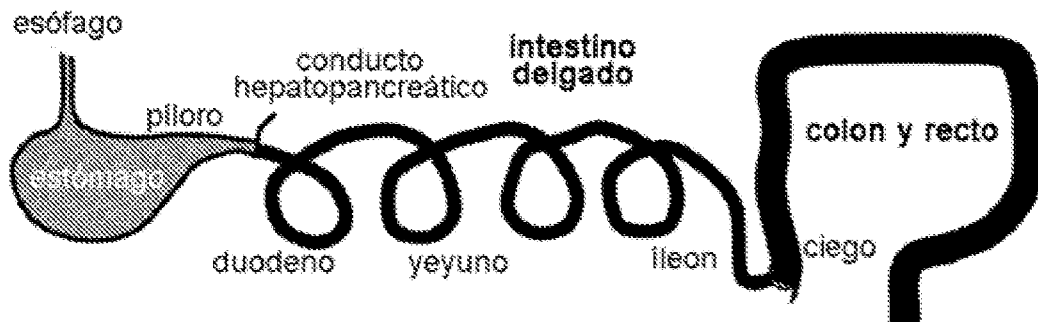


FIG. 12









anatomía	estómago		intestino delgado		colon y recto		
	longitud:	0.25 – 0.3 metros	3.5 – 8.8 m		1.5 m		
	diámetro:	1 - 1.3 cm (píloro)	2 - 3 cm		8 cm		
	área superficial:	<1 metros cuad.	30 m. cuad.		2 m. cuad.		
fisiología	drenaje venoso:	hígado (circulación portal)	hígado (circulación portal)		hígado, excepto 2/3 recto que drena al corazón		
	pH:	1 – 2 (4-5 después de la comida)	5.5 - 6.5 (duodeno) 6.5 - 7.4 (yeyuno, íleon)		5.7 – 7.2		
	niveles de GSH:	muy bajo	alto (3-4 mM en bilis)		intermedio		
	tiempo de tránsito del alimento:	1-40 minutos en ayunas 3-5 h después de la comida	3 – 4 horas		15 – 40 horas		
formación y captación de anticuerpos	bacteria entérica:	escasas (100-10,000 por ml)		escasas (100-10,000 por ml) hasta el íleon		densas (~ 100 mil millones por ml)	
	transportadores: partículas	ARN    proteína		ARN    proteína		ARN    proteína	
		VNN1:	2            baja	91-153    0 - media	13            0 - baja		
		VNN2:	10            baja	3            media	3 - 29    0 – baja		
		VNN3:	1            alta	0            alta	0 - 5       media-alta		
		OCT1:	0            media	0            media	0 – 1       media		
		OCT2:	0            0	0            0	0            0		
		OCT3:	4            media	2 – 3       media	2 – 4       media-alta		

Abreviaciones: 4PP = 4-fosfopanteteína; dp-CoA = desfosfo-CoA;  
CoA = coenzima A; RA = agente reductor; PI = inductor de panteteinasa

FIG. 13

Clasificación de precursores de cisteamina		Etapas para generar cisteamina			poten cia farmacológicas	
categoría componentes		#	reducción de disulfuro	catabolismo hasta panteteína	escisión por panteteinasa	propiedades farmacológicas
disulfuros mixtos de cisteamina	cisteamina + panteteína	2	requerida	no requerido	requerido para ½ de tioles reducidos	RA PI
	cisteamina + 4PP, dp-coA o coA	2	requerida	requerido para ½ de tioles reducidos	requerido para ½ de tioles reducidos	RA PI
	cisteamina + otro tiol o ditiol	1 2	requerida	no requerido	no requerido	RA
disulfuros de panteteína	panteteína + panteteína	2	requerida	no requerido	requerida para todos los tioles reducidos	RA PI
	panteteína + 4PP, dp-coA o coA	2	requerida	requerido para ½ de tioles reducidos	requerida para todos los tioles reducidos	RA PI
	panteteína + otro tiol o ditiol	1 2	requerida	no requerido	requerido para ½ de tioles reducidos	RA PI
otros disulfuros	4PP, dp-coA o coA + 4PP, dp-coA o coA	2	requerida	requerida para todos los tioles reducidos	requerida para todos los tioles reducidos	RA PI
	4PP, dp-coA o coA + otro tiol o ditiol	1 2	requerida	requerido para ½ de tioles reducidos	requerido para ½ de tioles reducidos	RA PI



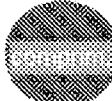


FIG. 14

propiedades de formulación			ingredientes farmacéuticos activos				C obtenida en...	CP liberado en...	dosis con...
forma de dosificación	liberación de fármaco		precursores de cisteamina		potenciadores				
	sitio	tiempo	tipo	dosis (mg)	tipo	dosis (mg)			
A  líquido		IR	disulfuro(s) de panteteína	100 - 5000			(alim. OK)	estó.	estó. SI
B  gránulo	GR	SR	disulfuro(s) de panteteína	100 - 800			comida	estó.	estó. SI LI
C  polvo	EC	SR	disulfuro(s) de panteteína	100 - 5000			alim.	SI	SI LI
D  gránulo	EC	SR	disulfuro mixto de cisteamina	100 - 600	RA	200 - 700		SI	SI
E  gránulo	EC	SR	disulfuro mixto de 4PP, de-coA, coA	100 - 800	PI	0.1 - 1	(alim. OK)	SI	SI LI
F  gránulo	CT	SR	disulfuro mixto de cisteamina	100 - 800				LI	LI

GR: gastrorretentiva, IR: liberación inmediata, SR: liberación sostenida, EC: recubierta entérica, CT: dirigida al colon, 4PP: 4-fosfopanteteína, de-coA: desfosfo-coenzima A; RA: agente reductor, PI: inductor de panteteinasa, estó.: estómago, SI: intestino delgado, LI, intestino grueso, CP: precursor de cisteamina, C: cisteamina.





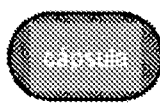
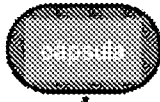



FIG. 15

propiedades de formulación				ingredientes farmacéuticos activos				C obtenida en...	CP liberado en...	dosis con...
forma de dosificación	liberación de fármaco		precusores de cisteamina		potenciadores					
	sitio	tiempo	tipo	dosis	tipo	dosis				
G		IR	disulfuro(s) de cisteamina	100 - 2000			comida	estó.	estó.	SI LI
		SR	disulfuro(s) de panteteína	200 - 4000						
H		SR	disulfuro(s) de cisteamina	100 - 400			comida	estó.	estó.	SI LI
			disulfuro(s) de panteteína	100 - 600						
I		IR	disulfuro(s) de cisteamina	100 - 400	RA	50 - 400	(alim. OK)	SI	SI LI	
		SR	panteteína	100 - 600	AE	0.1 - 10				
J		SR	disulfuro(s) de cisteamina	100 - 400	RA	50 - 400	(alim. OK)	SI	SI LI	
			disulfuro(s) de panteteína	100 - 600	PI	0.1 - 10				
K		SR	disulfuro(s) de cisteamina	100 - 400	RA	50 - 400	(alim. OK)	LI	LI	
			disulfuro(s) de panteteína	100 - 600	PI	0.1 - 1				

Véase la Fig. 13 para abreviaturas, AR: potenciador de la absorción.  
Las dosis están en miligramos

FIG. 16

propiedades de formulación				ingredientes farmacéuticos activos				C obtenida en...	CP liberado en...	dosis con...
forma de dosificación	liberación de fármaco		precursores de cisteamina		potenciadores					
	sitio	tiempo	tipo	dosis	tipo	dosis				
L										
	+									
										
M										
	+									
										
	+									
										
N										
	+									
										

Véanse las Figs. 13 y 14 para abreviaturas. Las dosis están en miligramos.

FIG. 17

#	Tioles (nombre común)	CAS#	fórmula	MW
1	cisteamina	60-23-1	C2 H7 N S	77.15
2	panteteína	495-65-1	C11 H22 N2 O4 S	278.37
3	4-fosfopanteteína	2226-71-3	C11 H23 N2 O7 P S	358.35
4	desfosfo-coenzima A	3633-59-8	C21 H35 N7 O13 P2 S	687.55
5	coenzima A	85-61-0	C21 H36 N7 O16 P3 S	1075.99
6	N-acetilcisteamina	1190-73-4	C4 H9 N O S	119.185
7	mercaptano de alilo	870-23-5	C3 H6 S	74.145
8	mercaptano de furfurilo	98-02-2	C5 H6 O S	114.165
9	mercaptano de bencilo	100-53-8	C7 H8 S	124.203
10	tioterpineol	71159-90-5	C10 H18 S	170.31
11	3-mercaptopiruvato	2464-23-5	C3 H4 O3 S	119.12
12	L-cisteína	52-90-4	C3 H7 N O2 S	121.15
13	éster etílico de L-cisteína HCl	868-59-7	C5 H11 N O2 S * HCl	185.672
14	éster metílico de L-cisteína HCl	18598-63-5	C4 H9 N O2 S * HCl	171.646
15	N-acetil-L-cisteína	7218-04-4	C5 H9 N O3 S	163.195
16	éster etílico de N-acetilcisteína	59587-09-6	C7 H13 N O3 S	191.25
17	amida de N-acetilcisteína	38520-57-9	C5 H10 N O2 S	162.21
18	L-homocisteína	6027-13-0	C4 H9 N O2 S	135.185
19	cisteinglicina	19246-18-5	C5 H10 N2 O3 S	178.21
20	Y-glutamylcisteína	686-58-8	C8 H14 N2 O5 S	250.272
21	éster etílico de Y-glutamylcisteína	114627-30-4	C10 H18 N2 O5 S	278.325
22	glutathiona	70-17-8	C10 H17 N3 O6 S	307.32
23	éster monoetilico de glutathiona	118421-50-4	C12 H21 N3 O6 S	335.377
24	éster dietílico de glutathiona	97451-40-6	C14 H25 N3 O6 S	363.43
25	mercaptoethylgluconamida	3786-84-3	C8 H17 N O6 S	255.289
26	ácido tiosalicílico	147-93-3	C7 H6 O2 S	154.186
27	tiocisteína	5652-32-4	C3 H7 N O2 S2	153.223
28	tiopronina	1953-02-2	C5 H9 N O3 S	163.195
29	ácido dietilditiocarbámico	147-84-2	C5 H11 N S2	149.277
Ditioles (nombre común)		CAS#	fórmula	MW
30	ácido dihidrolipoico	462-20-4	C8 H16 O2 S2	208.341
31	ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico	304-55-2	C4 H6 O4 S2	182.218
32	ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico	74-61-3	C3 H8 O3 S3	188.289
33	2,3-dimercapto-1-propanol	59-52-9	C3 H8 S2 O	124.225
34	bucilamina	65002-17-7 R	C17 H13 N O3 S2	223.313

FIG. 18

Tabla 1A de disulfuros  
Disulfuros de cisteamina

tioles	MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina		
		#	porcentaje	etapas
1 + 2	353.52	2	43.8%	1/2
1 + 3	433.50	2	35.6%	1/3
1 + 4	762.70	2	20.2%	1/4
1 + 5	1151.14	2	13.4%	1/4+
1 + 6	194.34	2	79.4%	1/2
1 + 7	149.30	1	51.7%	1
1 + 8	189.32	1	40.8%	1
1 + 11	194.27	1	39.7%	1
1 + 12	199.60	1	39.3%	1
1 + 9	199.35	1	38.7%	1
1 + 33	199.38	1	38.7%	1
1 + 18	210.34	1	36.7%	1
1 + 29	224.43	1	34.4%	1
1 + 27	228.37	1	33.8%	1
1 + 26	229.34	1	32.5%	1
1 + 17	237.36	1	32.4%	1
1 + 28	253.35	1	32.4%	1
1 + 15	238.35	1	31.4%	1
1 + 10	245.46	1	31.3%	1
1 + 14	246.80	1	30.5%	1
1 + 19	253.36	1	30.0%	1
1 + 31	257.37	1	30.0%	1
1 + 13	260.82	1	29.6%	1
1 + 32	263.44	1	29.3%	1
1 + 16	266.40	1	29.0%	1
1 + 30	283.49	1	27.2%	1
1 + 34	298.46	1	25.5%	1
1 + 20	325.42	1	23.7%	1
1 + 25	330.44	1	23.3%	1
1 + 21	352.48	1	21.8%	1
1 + 35	359.54	1	21.5%	1
1 + 22	382.47	1	20.2%	1
1 + 23	410.53	1	18.8%	1
1 + 24	438.58	1	17.6%	1

Tabla 1B de disulfuros  
Disulfuros de panteteína

tioles	MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina		
		#	porcentaje	etapas
2 + 2	554.74	2	27.8%	2/2
2 + 3	634.72	2	24.3%	2/3
2 + 4	693.92	2	16.0%	2/4
2 + 5	1352.36	2	11.4%	2/4+
2 + 6	385.56	2	39.0%	2/2
2 + 7	350.52	1	22.0%	2
2 + 8	390.54	1	19.3%	2
2 + 11	395.49	1	19.5%	2
2 + 12	397.52	1	19.4%	2
2 + 9	400.57	1	19.3%	2
2 + 33	400.60	1	19.3%	2
2 + 18	411.56	1	18.7%	2
2 + 29	425.65	1	18.1%	2
2 + 27	429.59	1	18.0%	2
2 + 26	430.56	1	17.9%	2
2 + 17	438.58	1	17.6%	2
2 + 28	439.57	1	17.5%	2
2 + 15	439.57	1	17.5%	2
2 + 10	446.63	1	17.3%	2
2 + 14	448.02	1	17.2%	2
2 + 19	454.58	1	17.0%	2
2 + 31	458.59	1	16.8%	2
2 + 13	462.04	1	16.7%	2
2 + 32	464.66	1	16.6%	2
2 + 16	467.62	1	16.5%	2
2 + 30	484.71	1	15.9%	2
2 + 34	499.68	1	15.4%	2
2 + 20	526.64	1	14.6%	2
2 + 25	531.66	1	14.5%	2
2 + 21	554.70	1	13.9%	2
2 + 35	560.76	1	13.8%	2
2 + 22	583.69	1	13.2%	2
2 + 23	611.75	1	12.6%	2
2 + 24	639.80	1	12.1%	2

FIG. 19

Tabla 1C de disulfuros  
Disulfuros de 4-fosfopanteteina

tioles	MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina		
		#	porcentaje	etapas
3 + 3	714.70	2	21.6%	3/3
3 + 4	1043.90	2	14.8%	3/4
3 + 5	1432.34	2	10.8%	3/4+
3 + 6	475.54	2	32.4%	3/2
3 + 7	430.50	1	17.9%	3
3 + 8	470.52	1	16.4%	3
3 + 11	475.47	1	16.2%	3
3 + 12	477.50	1	16.2%	3
3 + 9	480.55	1	16.1%	3
3 + 33	480.58	1	16.1%	3
3 + 18	491.54	1	15.7%	3
3 + 29	505.63	1	15.3%	3
3 + 27	509.57	1	15.1%	3
3 + 26	510.54	1	15.1%	3
3 + 17	518.56	1	14.9%	3
3 + 28	519.55	1	14.8%	3
3 + 15	519.55	1	14.8%	3
3 + 10	526.66	1	14.6%	3
3 + 14	528.00	1	14.6%	3
3 + 19	524.56	1	14.4%	3
3 + 31	538.57	1	14.3%	3
3 + 13	542.02	1	14.2%	3
3 + 32	544.64	1	14.2%	3
3 + 16	547.60	1	14.1%	3
3 + 30	564.69	1	13.7%	3
3 + 34	579.66	1	13.3%	3
3 + 20	606.62	1	12.7%	3
3 + 25	611.64	1	12.6%	3
3 + 21	634.68	1	12.2%	3
3 + 35	640.74	1	12.0%	3
3 + 22	663.67	1	11.6%	3
3 + 23	691.73	1	11.2%	3
3 + 24	719.78	1	10.7%	3

Tabla 1D de disulfuros  
Disulfuros de desfosfo-coenzima A

tioles	MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina		
		#	porcentaje	etapas
4 + 4	1373.10	2	11.2%	4/4
4 + 5	1761.54	2	8.8%	4/4+
4 + 6	804.74	2	19.2%	4/2
4 + 7	759.70	1	10.2%	4
4 + 8	799.72	1	9.6%	4
4 + 11	804.67	1	9.6%	4
4 + 12	806.70	1	9.6%	4
4 + 9	809.75	1	9.5%	4
4 + 33	809.78	1	9.5%	4
4 + 18	820.74	1	9.4%	4
4 + 29	834.83	1	9.2%	4
4 + 27	838.77	1	9.2%	4
4 + 26	839.74	1	9.2%	4
4 + 17	847.75	1	9.1%	4
4 + 28	848.75	1	9.1%	4
4 + 15	848.75	1	9.1%	4
4 + 10	855.86	1	9.0%	4
4 + 14	867.20	1	9.0%	4
4 + 19	863.76	1	8.9%	4
4 + 31	867.77	1	8.9%	4
4 + 13	871.22	1	8.9%	4
4 + 32	873.84	1	8.8%	4
4 + 16	876.80	1	8.8%	4
4 + 30	893.89	1	8.6%	4
4 + 34	908.86	1	8.5%	4
4 + 20	935.82	1	8.2%	4
4 + 25	940.84	1	8.2%	4
4 + 21	963.68	1	8.0%	4
4 + 35	969.94	1	8.0%	4
4 + 22	992.67	1	7.8%	4
4 + 23	1020.93	1	7.6%	4
4 + 24	1048.98	1	7.4%	4

FIG. 20

Tabla 1E de disulfuros  
Disulfuros de coenzima A

Iloles	MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina		
		#	porcentaje	etapas
5 + 5	2149.98	2	7.2%	4+/4+
5 + 6	1193.18	2	12.9%	4+/2
5 + 7	1148.14	1	6.7%	4+
5 + 8	1188.16	1	6.5%	4+
5 + 11	1193.11	1	6.5%	4+
5 + 12	1195.14	1	6.5%	4+
5 + 9	1198.19	1	6.4%	4+
5 + 33	1198.22	1	6.4%	4+
5 + 18	1209.18	1	6.4%	4+
5 + 29	1223.27	1	6.3%	4+
5 + 27	1227.21	1	6.3%	4+
5 + 26	1228.18	1	6.3%	4+
5 + 17	1236.20	1	6.2%	4+
5 + 28	1237.19	1	6.2%	4+
5 + 15	1237.19	1	6.2%	4+
5 + 10	1244.30	1	6.2%	4+
5 + 14	1245.54	1	6.2%	4+
5 + 19	1252.20	1	6.2%	4+
5 + 31	1256.21	1	6.1%	4+
5 + 13	1259.66	1	6.1%	4+
5 + 32	1262.28	1	6.1%	4+
5 + 16	1265.24	1	6.1%	4+
5 + 30	1282.33	1	6.0%	4+
5 + 34	1297.30	1	5.9%	4+
5 + 20	1324.25	1	5.8%	4+
5 + 25	1329.28	1	5.8%	4+
5 + 21	1352.32	1	5.7%	4+
5 + 35	1358.38	1	5.7%	4+
5 + 22	1381.31	1	5.6%	4+
5 + 23	1409.37	1	5.5%	4+
5 + 24	1437.42	1	5.4%	4+

Tabla 1F de disulfuros  
Disulfuros de N-acetilcisteamina

Iloles	MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina		
		#	porcentaje	etapas
6 + 6	236.37	2	65.3%	2/2
6 + 7	191.33	1	40.3%	2
6 + 8	231.35	1	33.3%	2
6 + 11	236.31	1	32.6%	2
6 + 12	238.34	1	32.4%	2
6 + 9	241.39	1	32.0%	2
6 + 23	241.41	1	32.0%	2
6 + 18	252.37	1	30.6%	2
6 + 29	268.46	1	29.0%	2
6 + 27	270.41	1	28.5%	2
6 + 26	271.37	1	28.4%	2
6 + 17	279.40	1	27.6%	2
6 + 28	280.38	1	27.5%	2
6 + 15	280.38	1	27.5%	2
6 + 10	287.50	1	26.8%	2
6 + 14	288.63	1	26.7%	2
6 + 19	295.38	1	26.1%	2
6 + 31	299.40	1	25.8%	2
6 + 13	302.86	1	25.5%	2
6 + 32	305.47	1	25.3%	2
6 + 16	308.44	1	25.0%	2
6 + 30	325.53	1	23.7%	2
6 + 34	340.50	1	22.7%	2
6 + 20	357.46	1	21.0%	2
6 + 25	372.47	1	20.7%	2
6 + 21	395.51	1	19.5%	2
6 + 35	401.58	1	19.2%	2
6 + 22	424.51	1	18.2%	2
6 + 23	452.56	1	17.0%	2
6 + 24	480.61	1	16.1%	2

FIG. 21

Tabla 2A. Disulfuros que contienen ditiol que producen 2 cisteaminas

ditiol + tiol + tiol	Intervalo de MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina (intervalo)
30 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 1-6)	358.64 - 2.356.32	6.5% - 43%
31 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 1-6)	392.52 - 2.330.20	6.6% - 46.4%
32 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 1-6)	338.59 - 2.336.27	6.6% - 45.6%
33 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 1-6)	274.53 - 2.272.21	6.8% - 56.2%
34 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 1-6)	373.61 - 2.371.30	6.5% - 41.3%
ejemplo: 30 + 1 + 1		
ejemplo: 30 + 1 + 2		
ejemplo: 30 + 2 + 2		

Tabla 2B. Disulfuros que contienen ditiol que producen 1 cisteamina

ditiol + tiol + tiol	Intervalo de MW (Daltons)	Rendimiento de cisteamina (intervalo)
30 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 7-36)	355.64 - 1.643.76	0.047 - 0.217
31 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 7-36)	329.51 - 1.617.64	0.048 - 0.234
32 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 7-36)	335.58 - 1.623.71	0.048 - 0.230
33 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 7-36)	271.52 - 1.559.65	0.049 - 0.284
34 + (cualquiera de los tioles 1-6) + (cualquiera de los tioles 7-36)	370.61 - 1.658.73	0.047 - 0.208
ejemplo: 30 + 1 + 16		
ejemplo: 30 + 2 + 16		
ejemplo: 30 + 1 + 16		

FIG. 22

Etapa 1: activar tioles

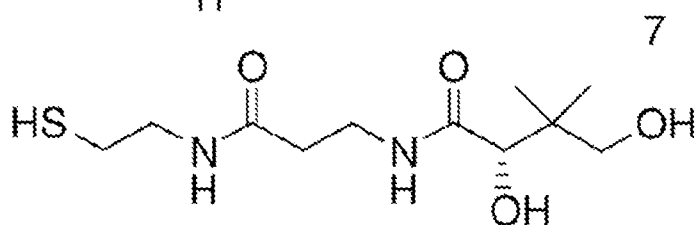
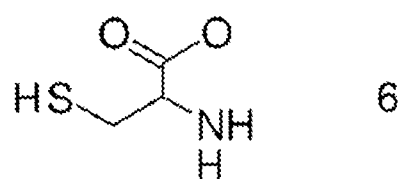
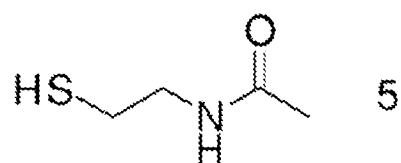
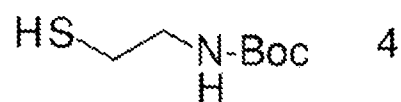
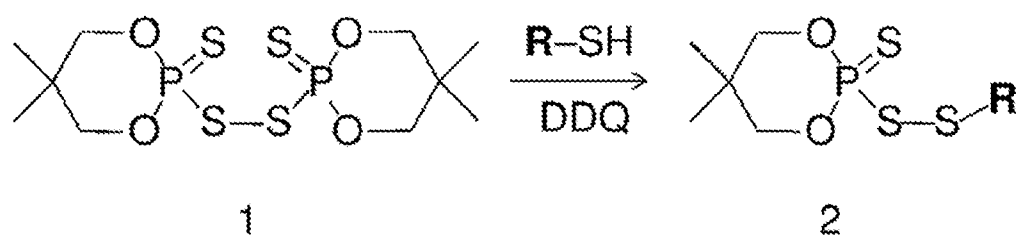
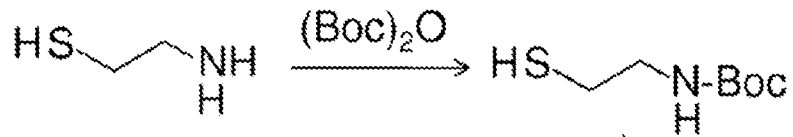


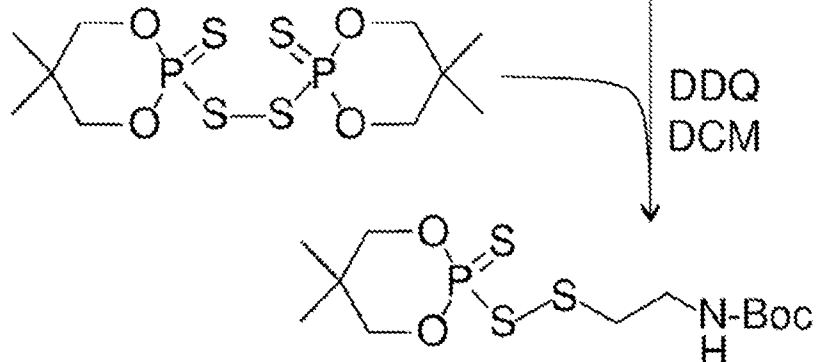


FIG. 23

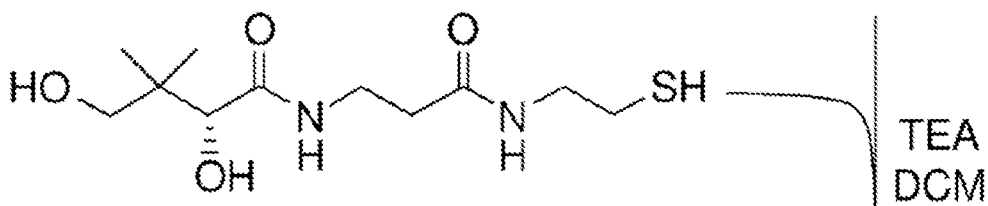
Etapa 1: proteger  
grupo amina  
de cisteamina  
con Boc



Etapa 2: añadir  
PDPA a  
cisteamina-Boc



Etapa 3: eliminar grupo Boc con ácido



Etapa 4: hacer reaccionar  
PDPA-cisteamina con (R)-panteteína

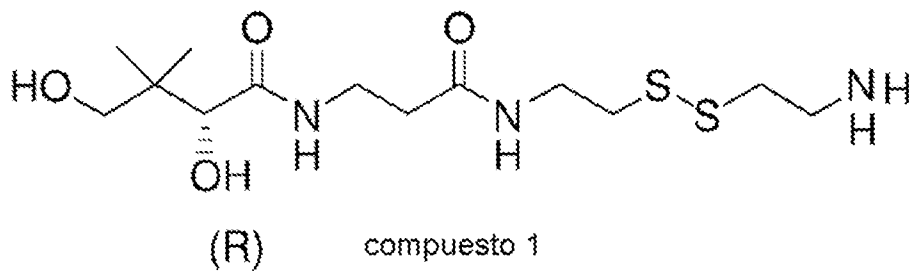
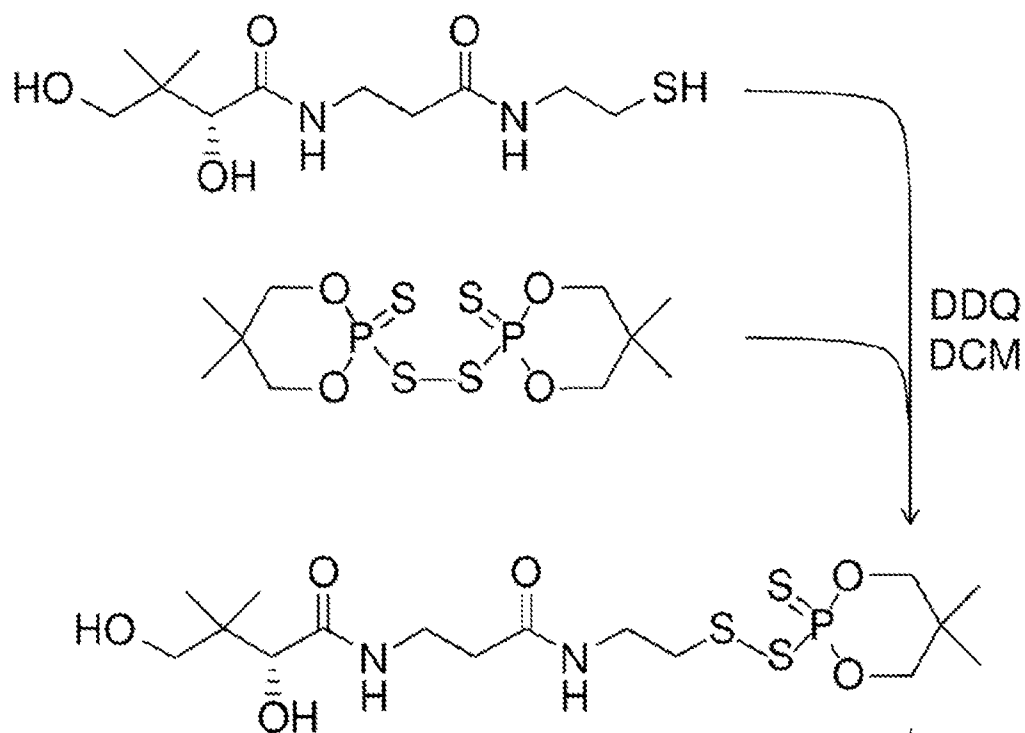


FIG. 24

Etapa 1: añadir PDTA a (R)-panteteína



Etapa 2: hacer reaccionar  
cisteamina con PDTA - (R)-panteteína

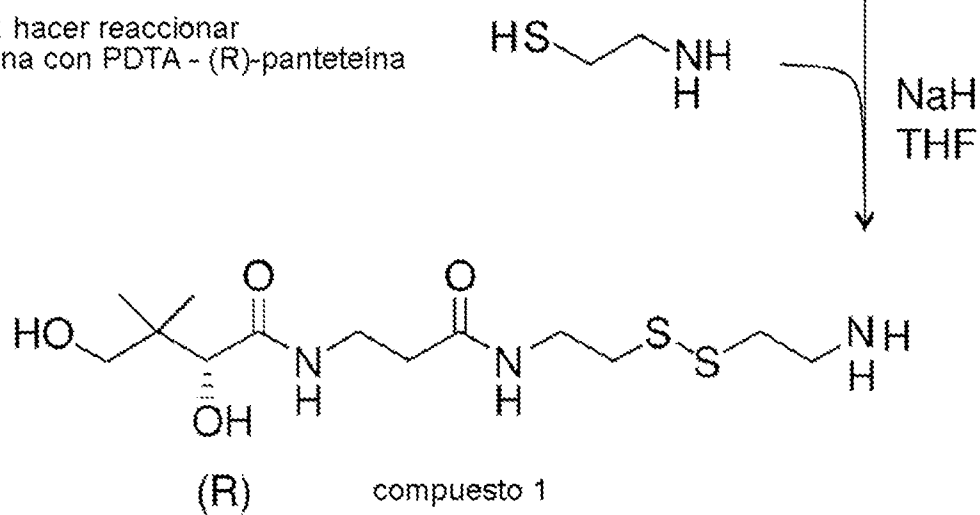
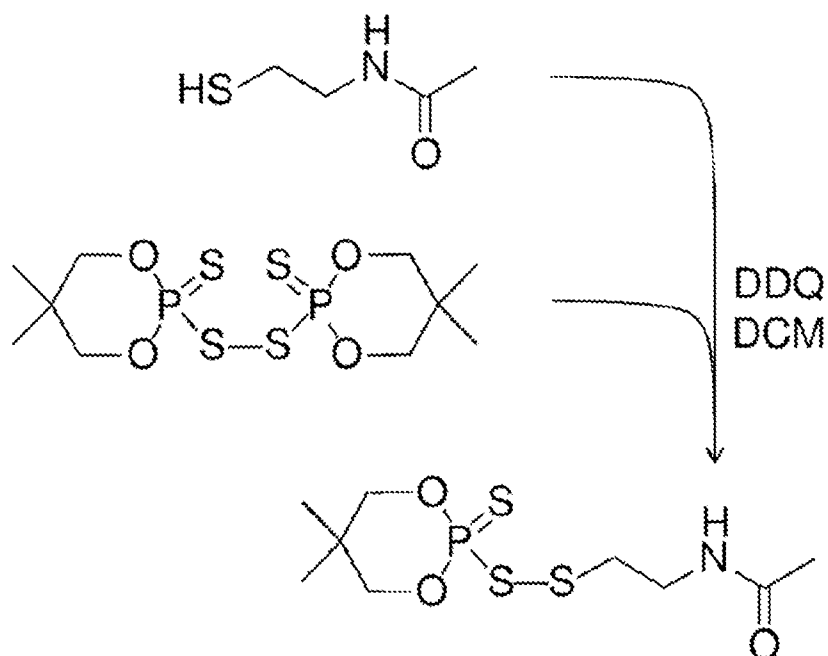


FIG. 25

Etapa 1: añadir PDTA a N-acetilcisteamina



Etapa 2: hacer reacción (R)-panteteína con N-acetilcisteamina-PDTA

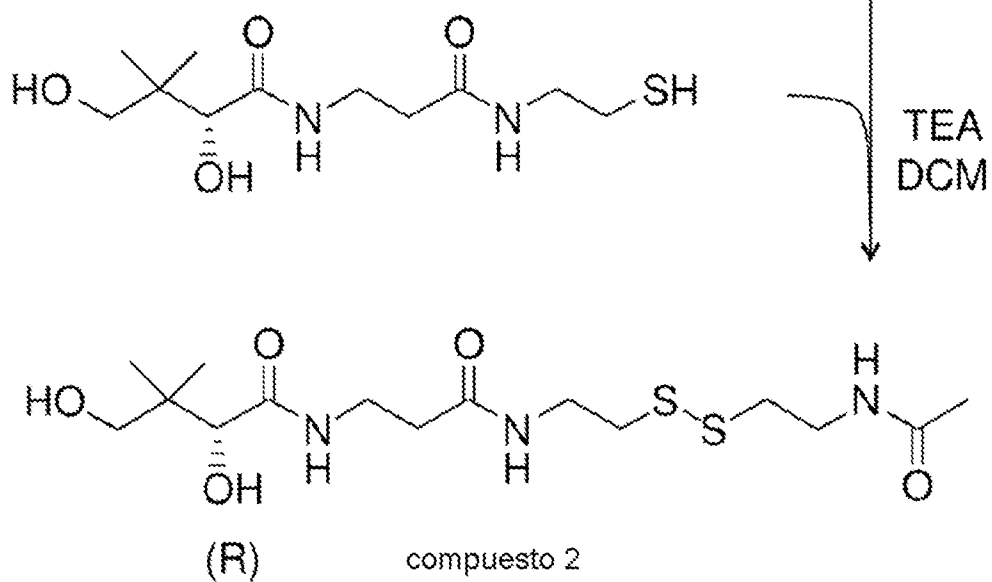
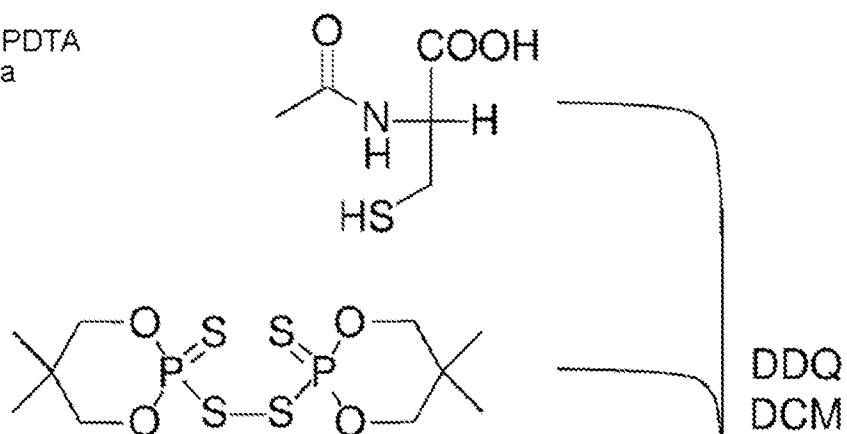


FIG. 26

Etapa 1: añadir PDTA  
a N-acetilcisteína



Etapa 2: hacer reaccionar  
(R)-panteteína con N-acetilcisteína-PDTA

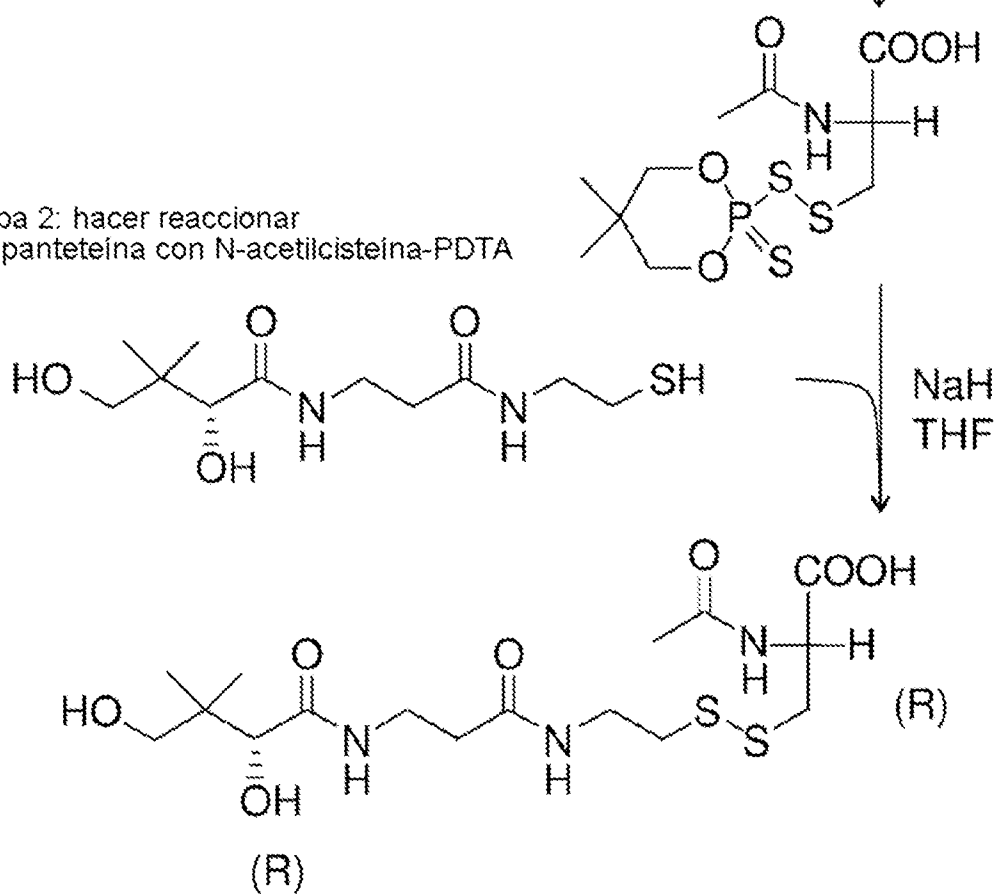


FIG. 27

disulfuro de cisteamina - (R)-panteteína  
(compuesto 1)

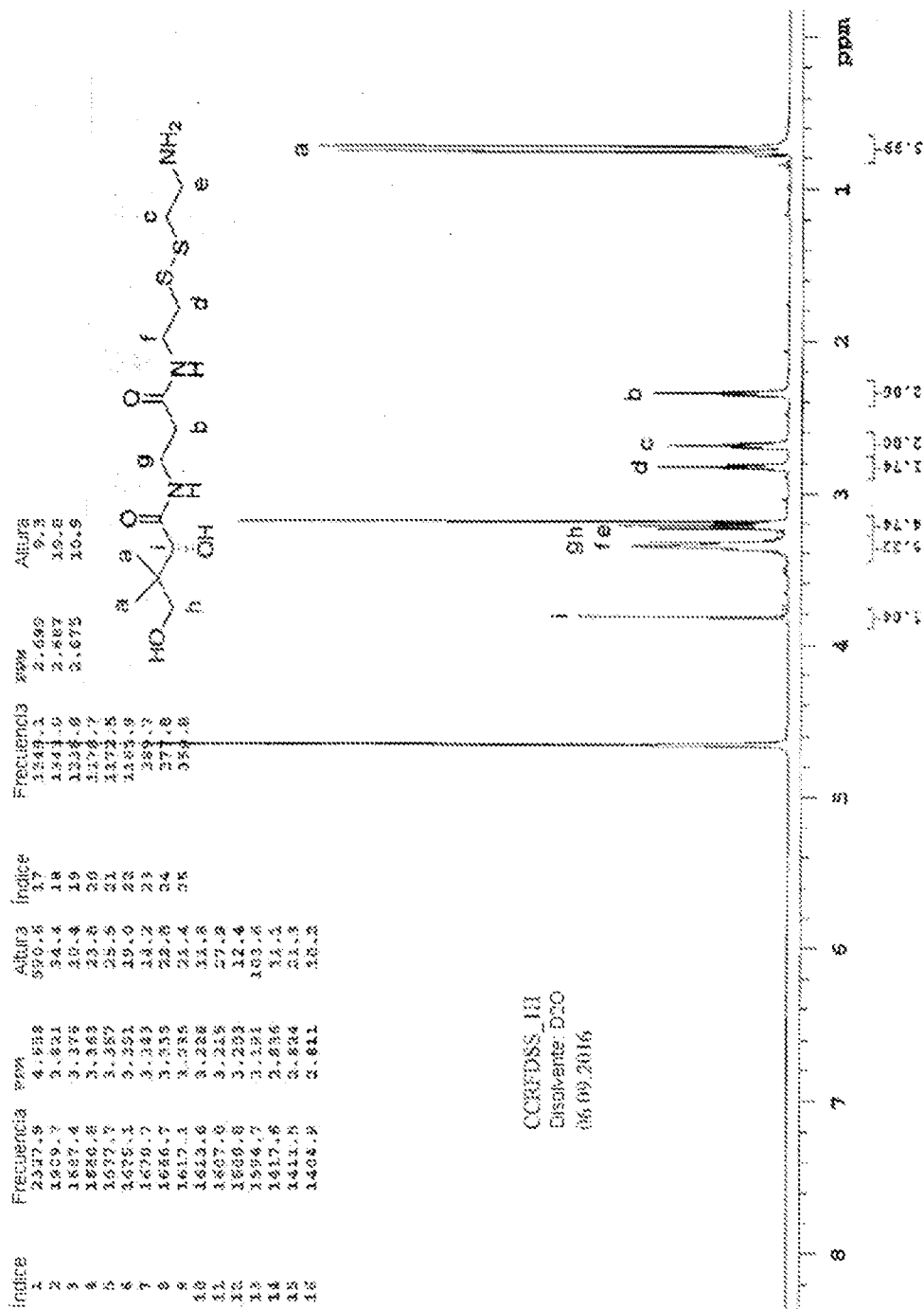


FIG. 28

Disulfuro de N-acetilcisteamina - (R)-panteteína  
(compuesto 2)

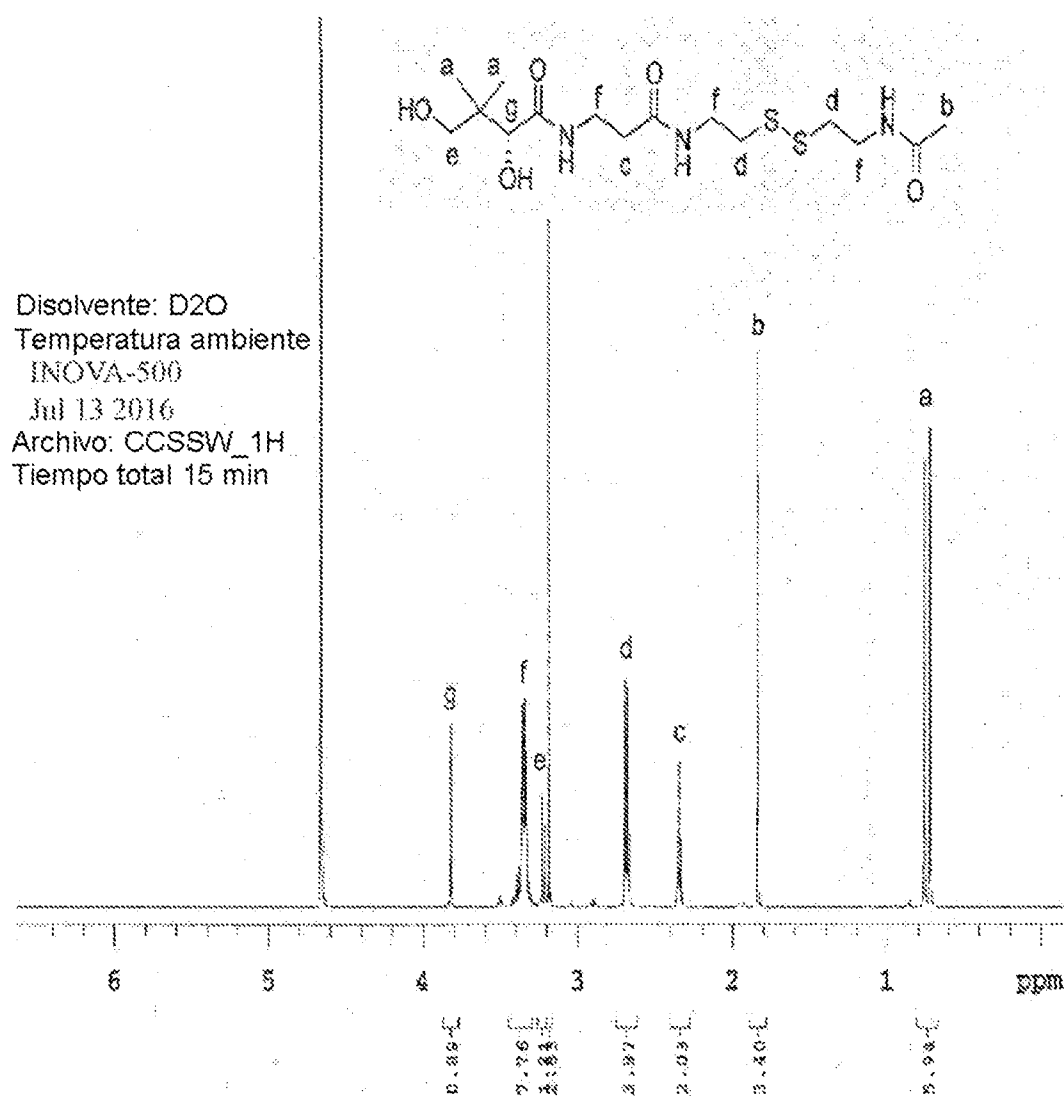


FIG. 29

Disulfuro de N-acetil-L-cisteína - (R)-panteteína

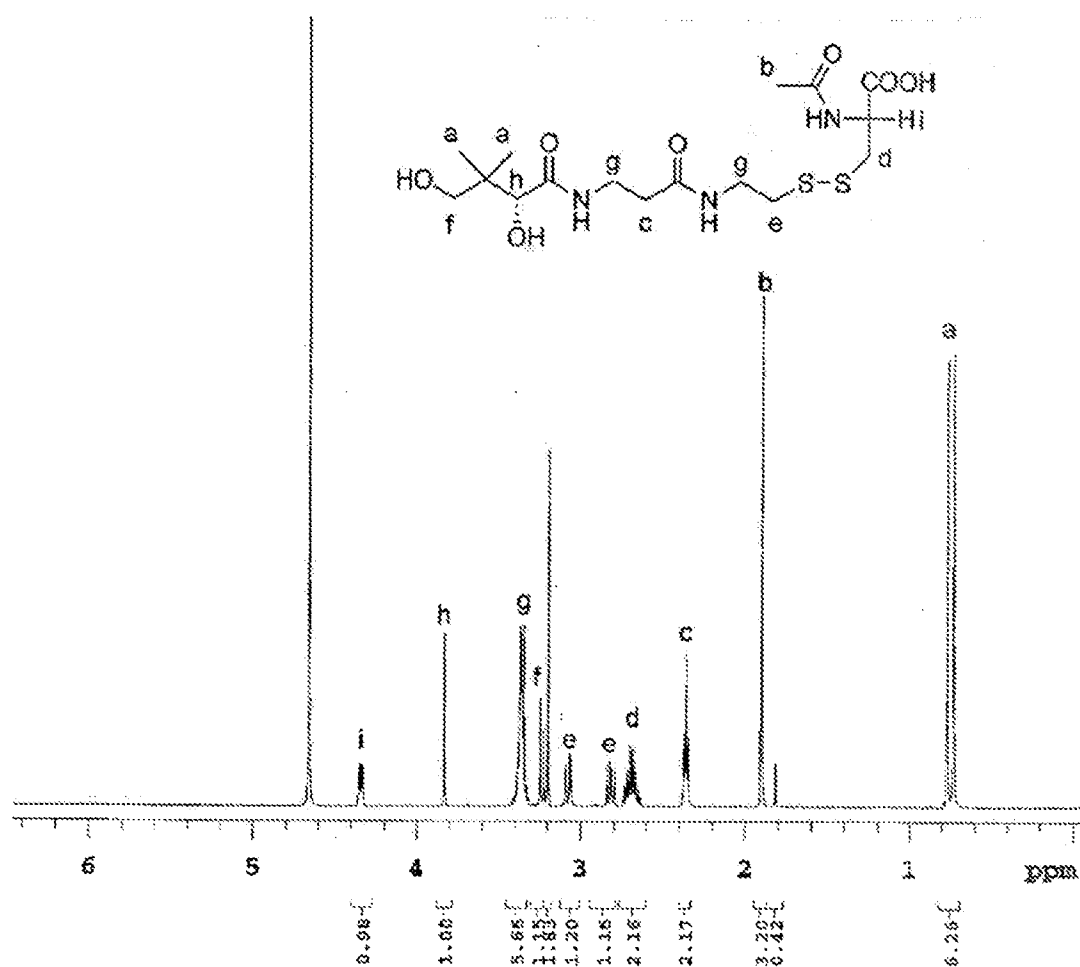


FIG. 30A

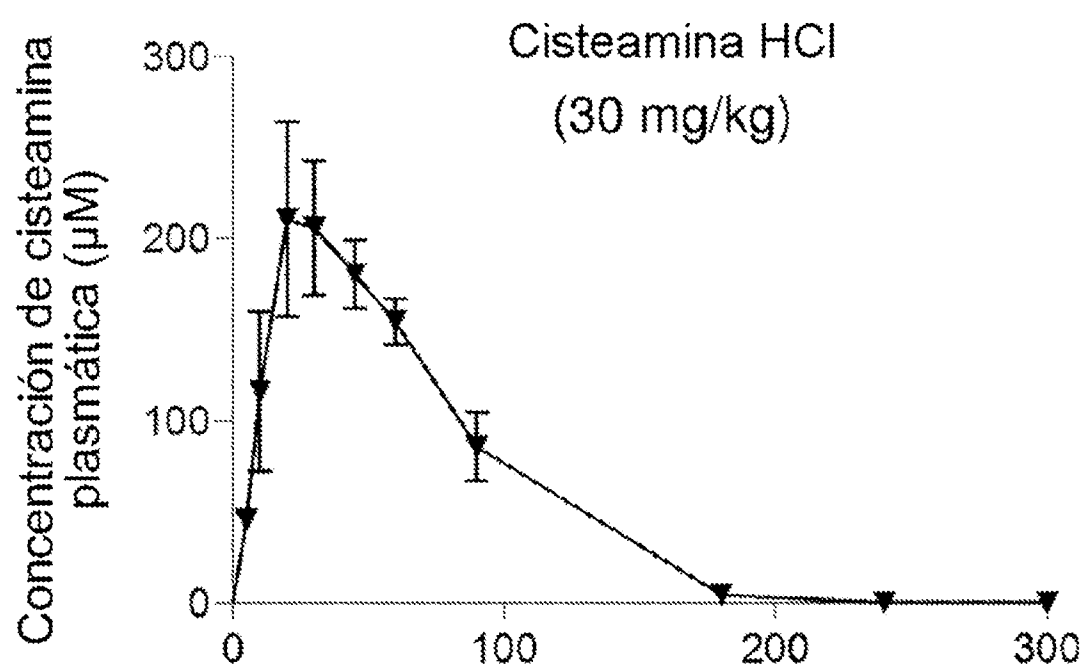




FIG. 30B

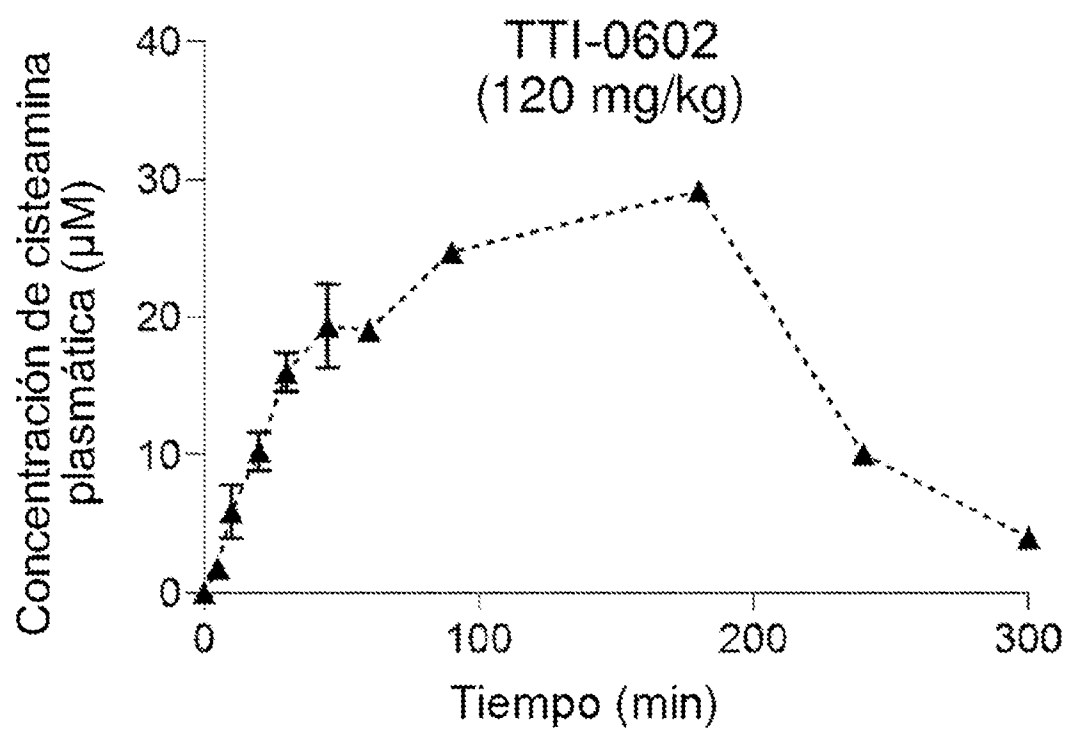


FIG. 31A

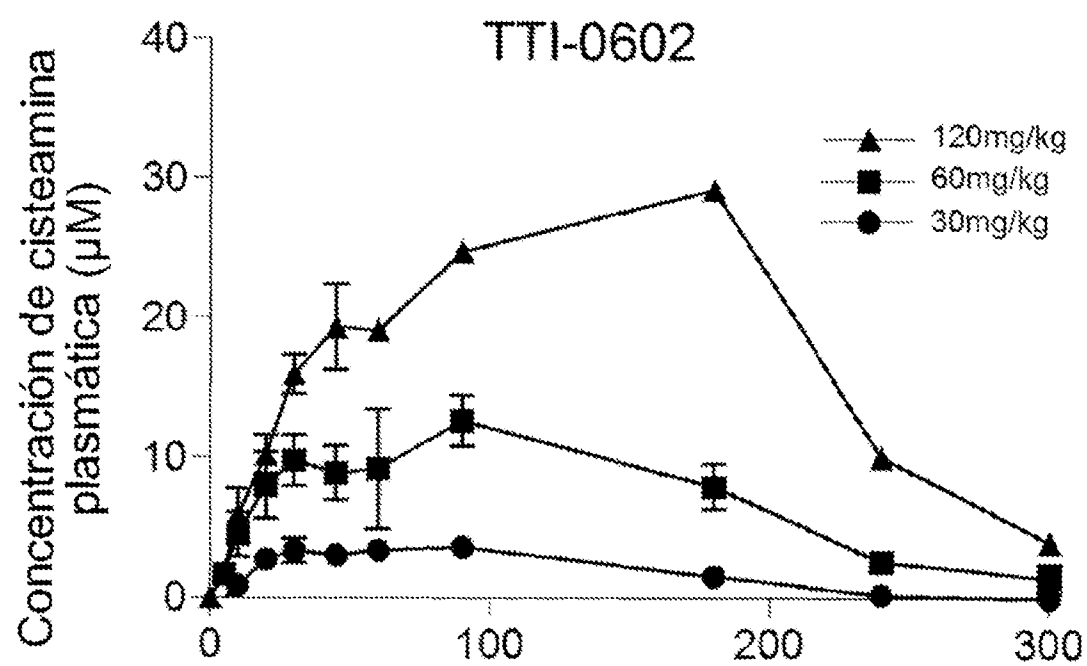


FIG. 31B

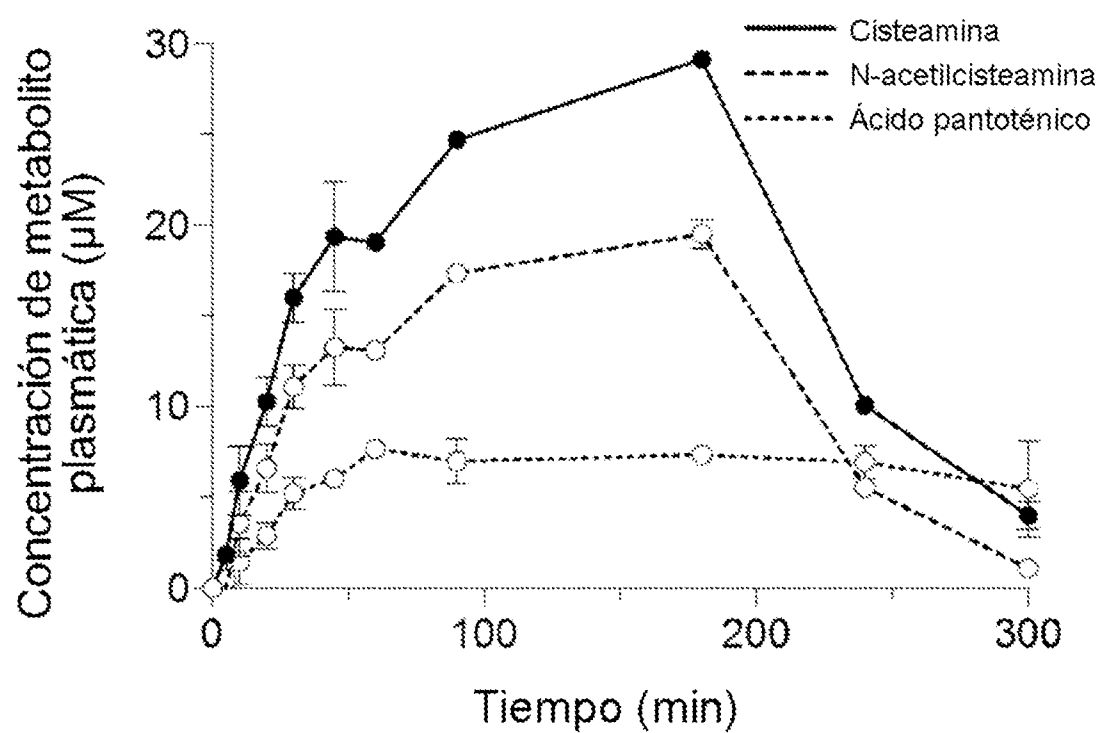


FIG. 32

Niveles de cisteamina en tejido 10 horas después  
de compuesto 2 (120 mg/kg) oral

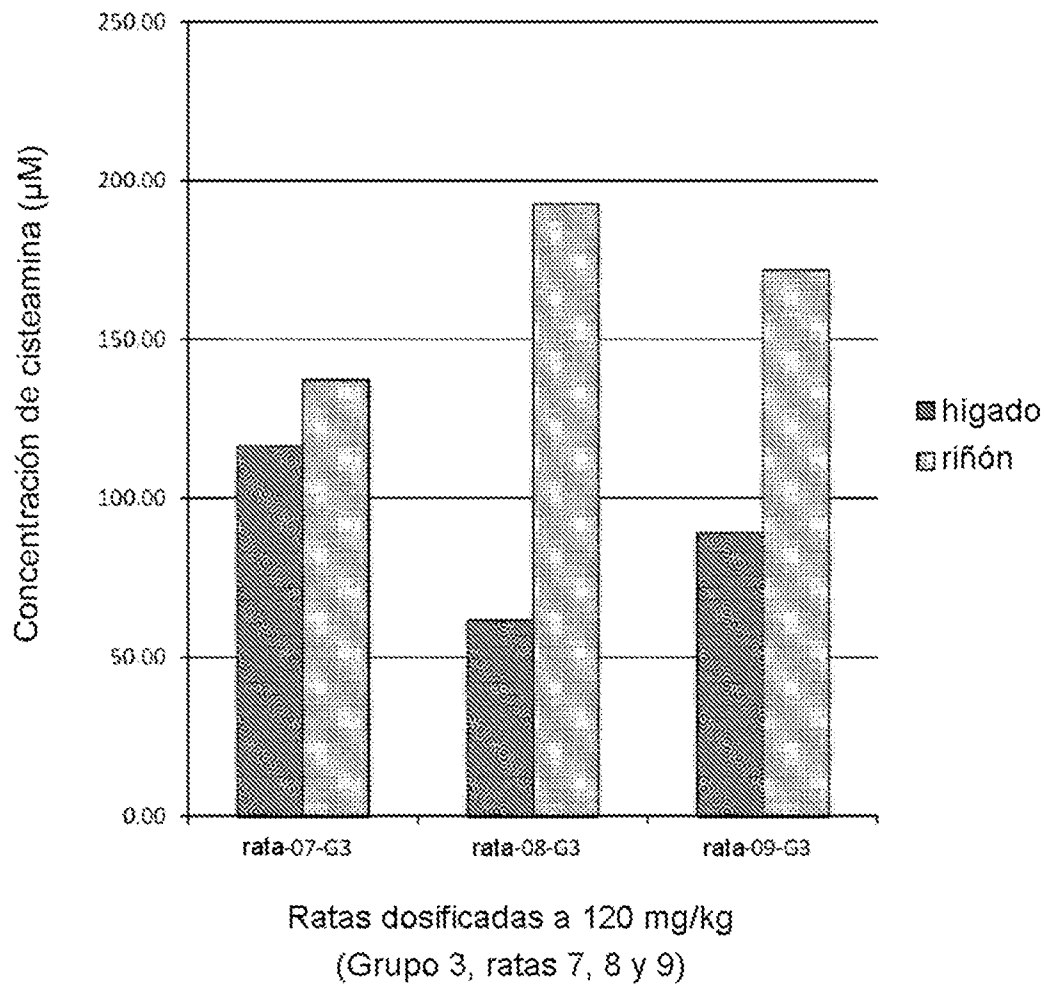


FIG. 33

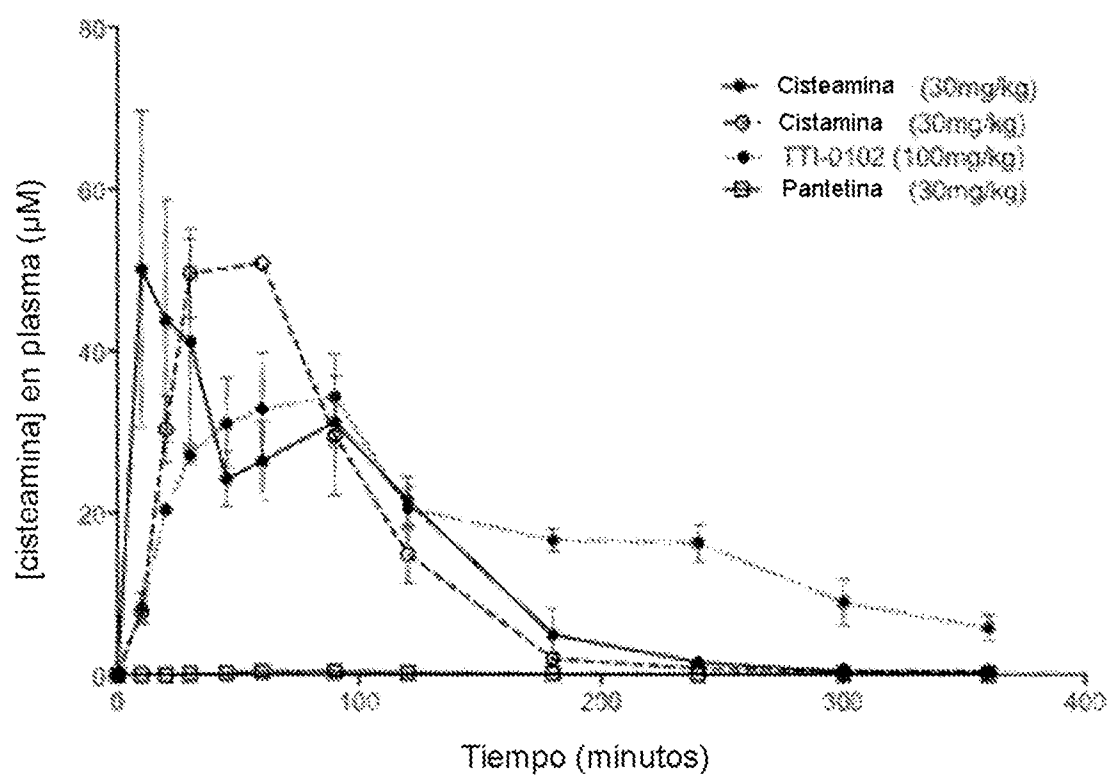


FIG. 34A

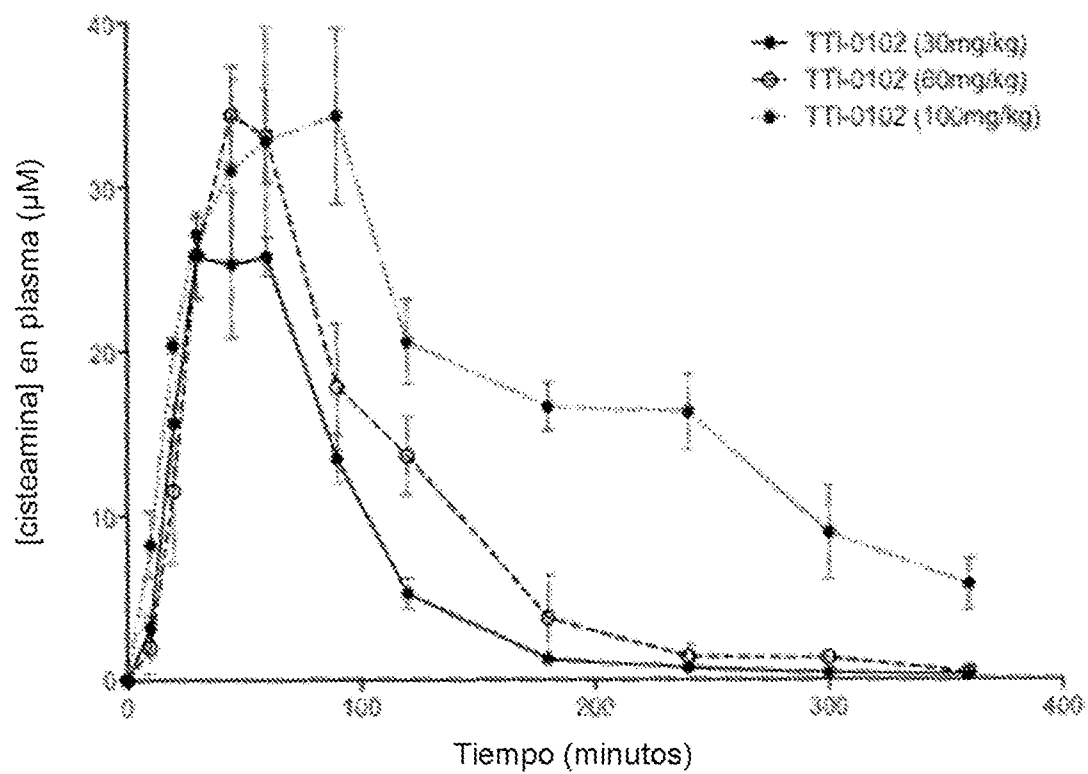


FIG. 34B

	Cisteamina HCl	TTI-01 30 mg/kg	TTI-01 60 mg/kg	TTI-01 100 mg/kg
$C_{p,av}$ ( $\mu$ M)	55.3 $\pm$ 29.8	29.4 $\pm$ 4.3	34.4 $\pm$ 5.1	34.4 $\pm$ 7.6
$C_{max}$ ( $\mu$ g/l)	4.3 $\pm$ 2.3	2.3 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.6
$T_{max}$ (min)	17 $\pm$ 11	45 $\pm$ 15	45	75 $\pm$ 21
AUC <sub>0-24</sub> (min* $\mu$ g/l)	365 $\pm$ 57	175 $\pm$ 3	252 $\pm$ 51	499 $\pm$ 15
Absorción $t_{1/2}$ (min)	1	26	48	86
MRT <sub>0-24</sub> (min)	78 $\pm$ 20	73 $\pm$ 4	88 $\pm$ 11	142 $\pm$ 15

FIG. 35A

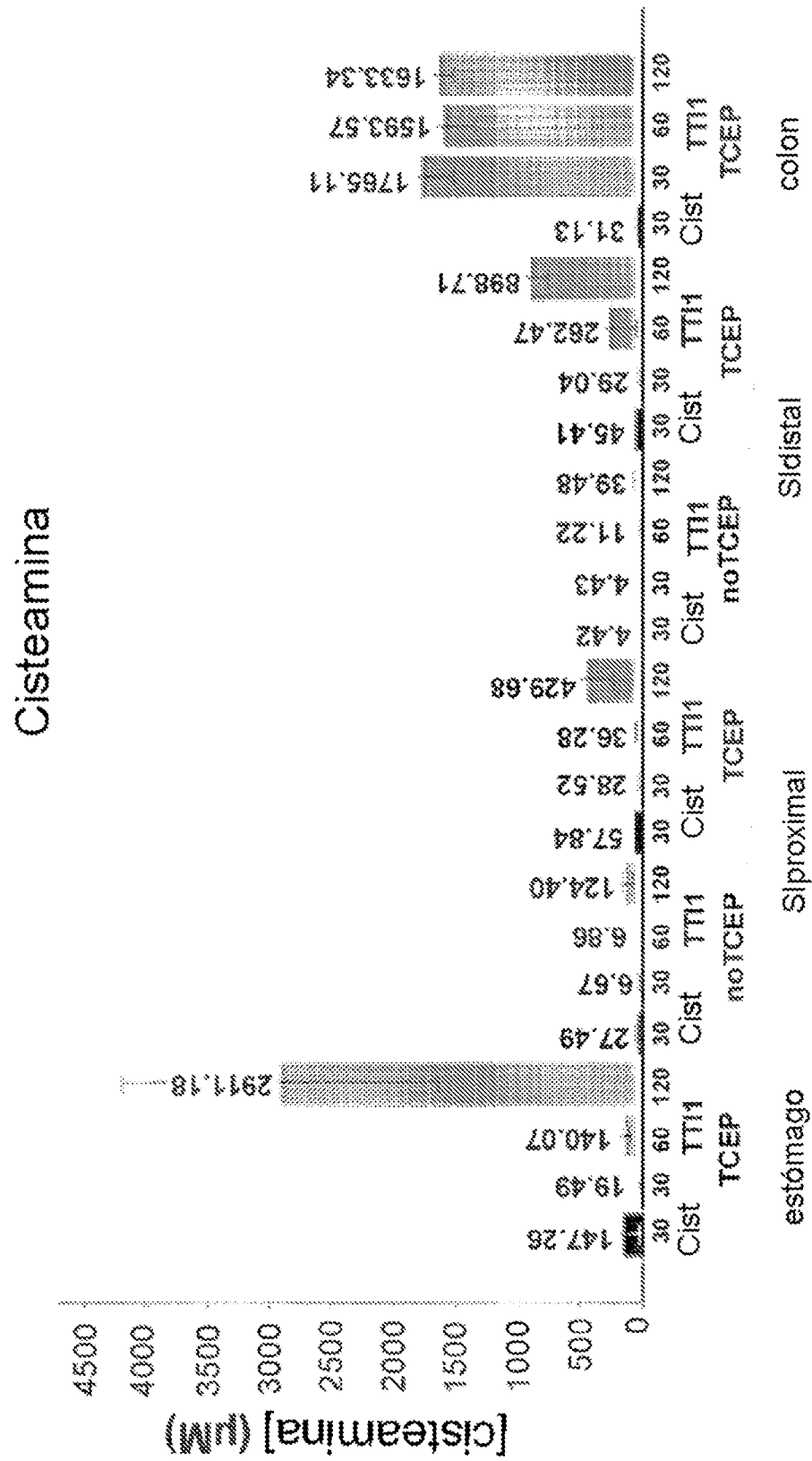




FIG. 35B

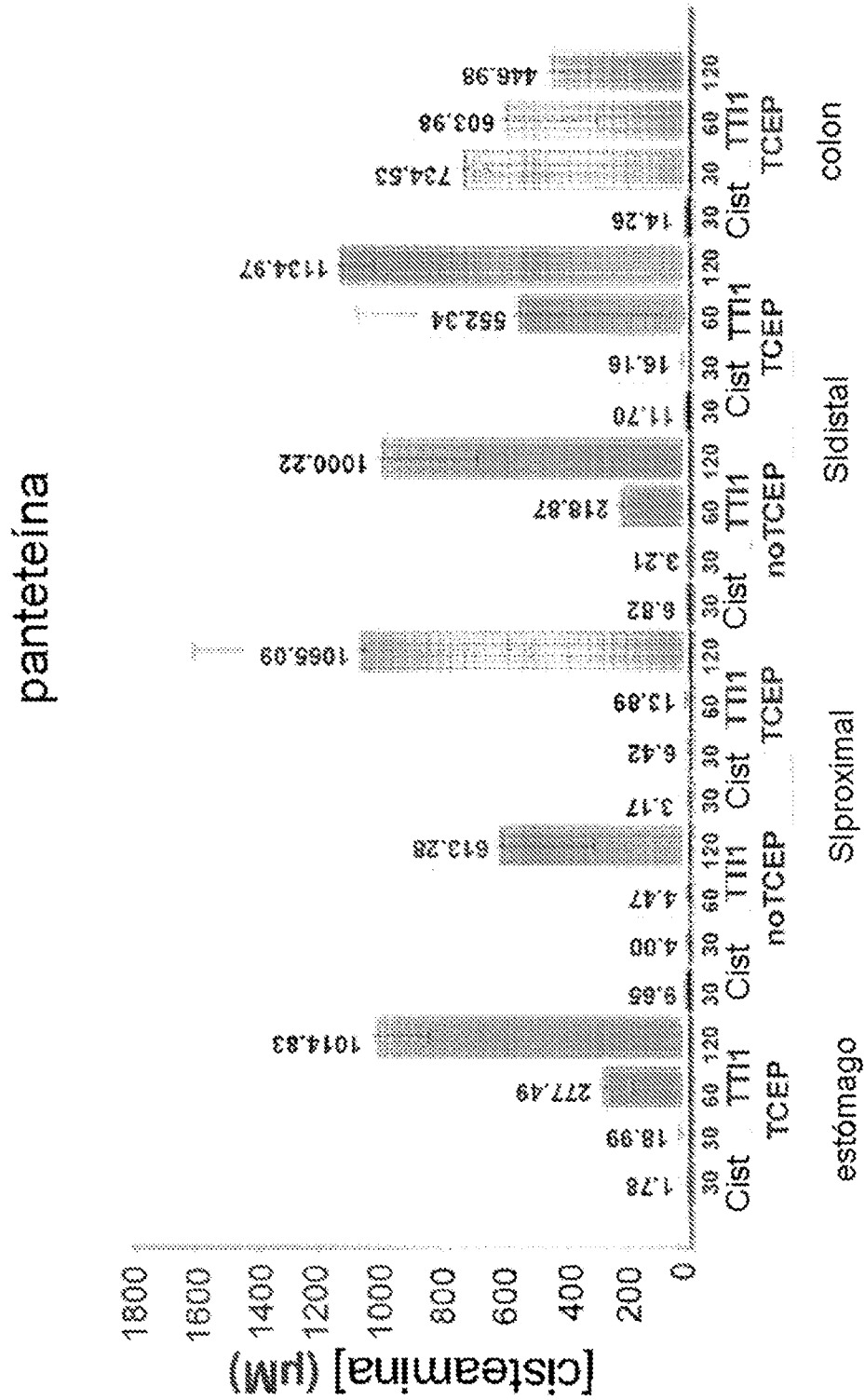


FIG. 36A

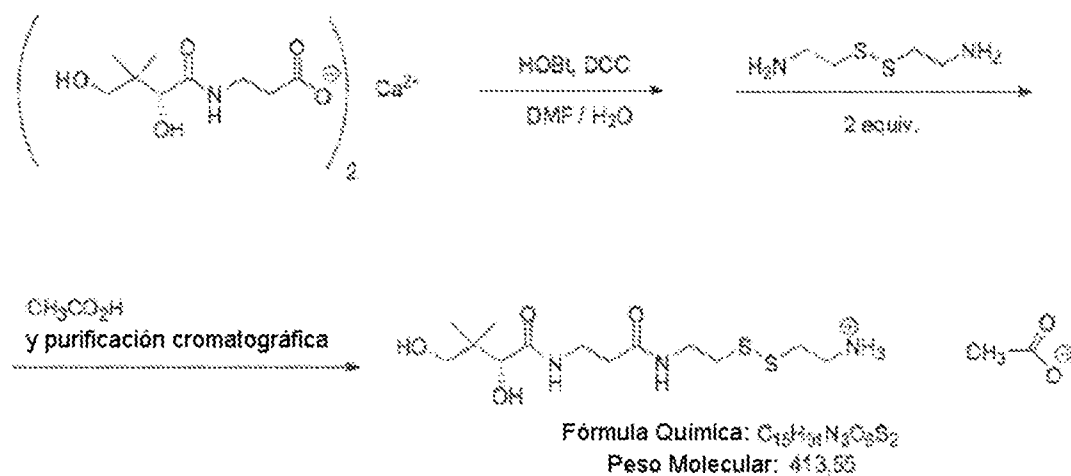


FIG. 36B

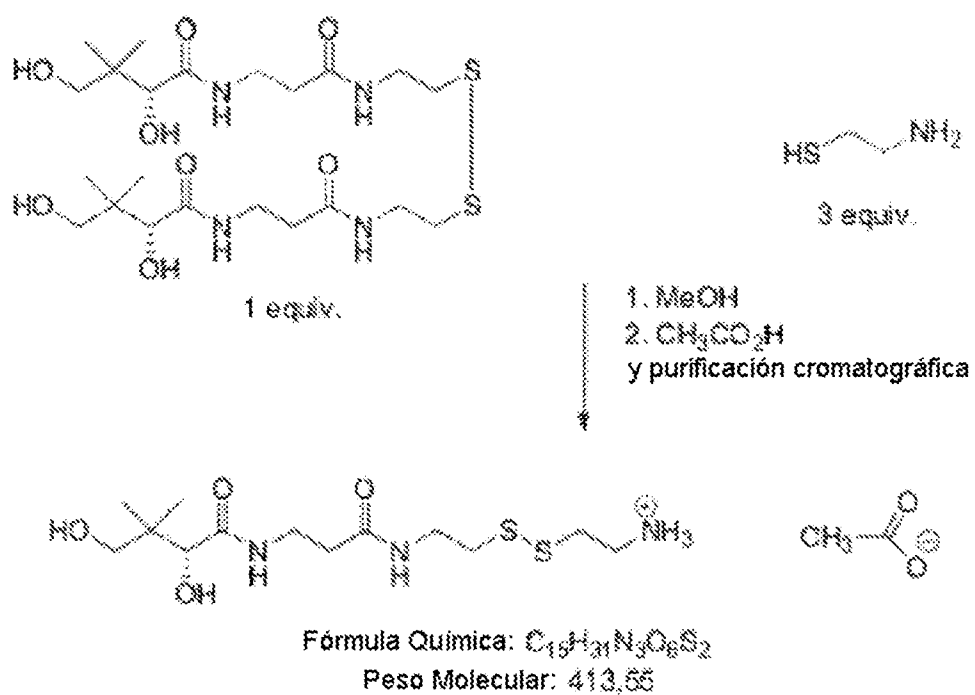


FIG. 37

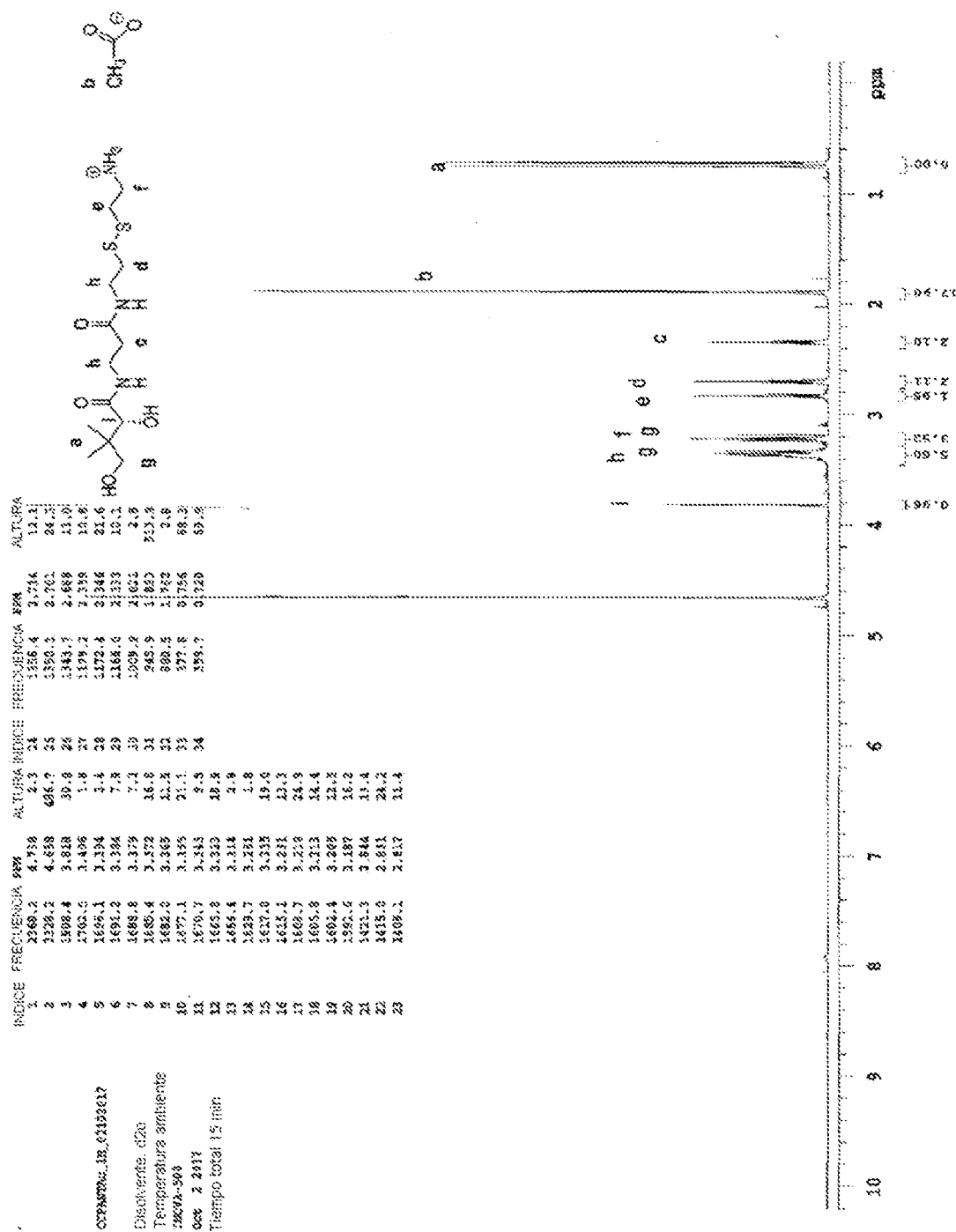
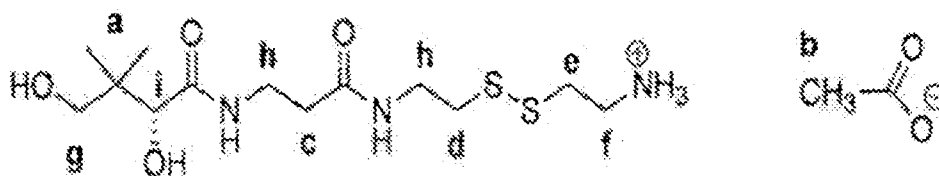


FIG. 38



Acetato de disulfuro de panteteína-cistamina

pico	predicho	observado
a	6	6.00
b	3	12.90
c	2	2.10
d	2	2.11
e	2	1.95
f + ½g	3	3.52
½g + h	5	5.60
l	1	0.96