

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 678**

51 Int. Cl.:

C07D 405/04 (2006.01)
C07D 411/04 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/7042 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016** **PCT/US2016/019852**
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16138425**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016** **E 16756477 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021** **EP 3261644**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento de la degradación retiniana**

30 Prioridad:

26.02.2015 US 201562121379 P
26.10.2015 US 201562246455 P
27.10.2015 US 201562247099 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
201 Gillis Building
Lexington, Kentucky 40506-0033, US**

72 Inventor/es:

**AMBATI, JAYAKRISHNA;
FOWLER, BENJAMIN y
AMBATI, KAMESHWARI**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 879 678 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

Composiciones y procedimientos para el tratamiento de la degradación retiniana

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad a las solicitudes de patente provisionales estadounidenses No. 62/247,099, presentada el 27 de octubre de 2015; No. 62/246,455, presentada el 26 de octubre de 2015; y No. 62/121,379, presentada el 26 de febrero de 2015, y el beneficio de las mismas.

10 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a compuestos, a composiciones y a procedimientos útiles para tratar el daño retiniano y/o la degradación retiniana / degeneración retiniana, para inhibir la activación del inflammasoma mediante ARN Alu asociado con una célula, para reducir la permeabilidad inducida por ATP de una célula, para reducir una cantidad de especies reactivas del oxígeno mitocondriales en una célula. La presente invención se refiere a compuestos y a composiciones que comprenden un nucleósido y/o un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa (INTI).

20 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La atrofia geográfica, una forma avanzada de degeneración macular asociada con la edad que causa ceguera en millones de personas en todo el mundo y para la que no existe un tratamiento aprobado, es el resultado de la muerte de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Por ejemplo, la expresión de DICER, una enzima implicada en la biogénesis del microARN (miARN), está reducida en el EPR de los ojos humanos con atrofia geográfica, y la ablación condicional de *Dicer1* induce la degeneración del EPR en ratones. Sorprendentemente, la ablación de otras siete enzimas responsables de la biogénesis o función del miARN no inducen esta patología. En cambio, la atenuación génica de *DICER1* conduce a la acumulación de ARN de repeticiones de *Alu* en células del EPR humanas y de ARN de repeticiones de B1 y B2 (elementos de tipo *Alu*) en el EPR de ratones. El ARN *Alu* aumenta drásticamente en el EPR de los ojos humanos con atrofia geográfica, y la introducción de este ARN patológico induce la muerte de las células del EPR humanas y la degeneración del EPR en ratones.

La degeneración macular asociada con la edad (DMAE), que es tan frecuente como el cáncer en los países industrializados, es una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. A diferencia de la forma neovascular de la DMAE, para la que existen muchos tratamientos aprobados, la forma atrófica de la DMAE, mucho más común, sigue siendo poco conocida y sin una intervención clínica eficaz. La atrofia extensa del epitelio pigmentario de la retina conduce a una pérdida de visión grave y se denomina atrofia geográfica.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones y procedimientos para tratar la degradación retiniana / degeneración retiniana y, en particular, la degradación del EPR.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las características novedosas de la presente invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención con referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la presente invención, y a los dibujos adjuntos. Las realizaciones que se extienden más allá del alcance de las reivindicaciones se deben entender únicamente como realizaciones ilustrativas y no forman parte de la presente invención.

La **figura 1** muestra una fila superior de fotografías del fondo ocular de ratones que reciben tratamiento con PBS de control o ARN Alu, con o sin cantidades crecientes de d4T (de izquierda a derecha); y preparaciones planas de EPR, teñidas de rojo para las uniones intercelulares (ZO-1) que se rompen con la administración de ARN Alu, pero que se restauran a la morfología/uniones intercelulares del EPR sanas con la dosis más elevada de d4T.

La **figura 2** proporciona un gráfico de barras que muestra que las células humanas (HeLa) tratadas con un plásmido de expresión forzada para ARN Alu (pAluA) durante períodos de tiempo indicados exhibieron una viabilidad profundamente reducida en comparación con un plásmido nulo (pUC19), según se controla mediante el ensayo de proliferación MTS, y que la coadministración de d4T previno la muerte celular inducida por la sobreexpresión de Alu.

La **figura 3** muestra los resultados de la transferencia Northern utilizando una sonda específica de Alu. Tal como se presenta en la figura 3, las células primarias del EPR humanas tratadas con oligonucleótidos antisentido dirigidos a DICER1 (Dcr as) (carril 3 (tercer carril desde la izquierda)) muestran niveles aumentados de ARN Alu en el compartimento nuclear, en comparación con los oligonucleótidos antisentido de control (Cu as) (carril 1 (más a la izquierda)), y la coadministración de d4T (carriles 2 y 4) no reduce los niveles de ARN Alu. Se muestra u6 (fila inferior) como un control de carga para la fracción nuclear.

La **figura 4** proporciona otro ejemplo de los resultados de la transferencia Northern utilizando una sonda específica de Alu. Tal como se presenta en la figura 4, la coadministración de d4T no cambia los niveles de ARN Alu 1, 4 o

24 horas después de la transfección en la fracción nuclear de las células del EPR humanas transfectadas con ARN Alu, con o sin d4T, según se detecta mediante transferencia Northern utilizando una sonda específica de Alu. Se muestra u6 (fila inferior) como control de carga para la fracción nuclear en la figura 4.

La **figura 5** proporciona los resultados de una transferencia Western que muestra que el ARN Alu provoca la maduración de caspasa-1 en células primarias del EPR humanas 24 horas después de la administración de Alu (carril central superior, banda inferior), que se bloquea mediante el tratamiento conjunto con d4T (100 μ M; carril más a la derecha). La fila inferior es un control de carga de vinculina.

La **figura 6** es una transferencia Western que muestra que el ARN Alu provoca la maduración de caspasa-1 en células primarias del EPR humanas 24 horas después de la administración de Alu (carril central superior, banda inferior), que se bloquea con el tratamiento conjunto con 3TC (20-100 μ M; carril más a la derecha), en la que la banda más baja es el control de carga, vinculina.

La **figura 7** es una transferencia Western que muestra que el ARN Alu provoca la maduración de caspasa-1 en células primarias del EPR humanas 24 horas después de la administración de Alu (carril central superior, banda inferior), que se bloquea con el tratamiento conjunto con azidotimidina (AZT), cordicepina y abacavir (ABC) (50-100 μ M; carriles 3-8 desde la izquierda). La vinculina como control de carga se muestra en la parte inferior.

La **figura 8** proporciona un gel que muestra que las células primarias del EPR humanas tratadas con LPS/ATP, un activador del inflammasoma clásico, muestran una mayor activación de Casp-1 y fosforilación de IRAK4, que también es un marcador de la señalización del inflammasoma a través de la proteína adaptadora del receptor de superficie celular MyD88. Además, tal como se muestra en la figura 8, d4T (25/100 μ M) bloquea la activación de Casp-1 y la fosforilación de IRAK4 inducidas por LPS/ATP. Se utilizó vinculina como control de carga en el gel de la figura 8. Además, tal como se muestra, LPS y ATP activan el inflammasoma NLRP3 solo en combinación.

La **figura 9** proporciona los resultados de la transferencia Western, en la que se muestra que d4T, 3TC y cordicepina (a 100 μ M), todos inhibidores di-desoxinucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhiben la activación de caspasa-1 (banda p20 activa, parte superior) y la maduración de IL-18 (parte inferior) inducidas por LPS/ATP. Para producir la figura 9, los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron después de (i) ningún tratamiento, (ii) tratamiento con LPS o (iii) tratamiento con LPS/ATP de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón y se realizaron ensayos de transferencia Western con anticuerpos para caspasa-1 e IL-18.

La **figura 10** proporciona el resultado de una transferencia Western que muestra que d4T (100, 250 μ M) inhibe la maduración de IL-1 beta (parte superior, formas de 18 y 22 kDa) y la activación de caspasa-1 (banda p20 activa, parte inferior) inducidas por nigericina. Para producir la figura 10, los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron después de (i) ningún tratamiento, (ii) tratamiento con LPS o (iii) tratamiento con LPS/nigericina de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón y se realizaron ensayos de transferencia Western con anticuerpos para IL-1 beta y caspasa-1.

La **figura 11** muestra un gráfico de barras que ilustra que d4T no inhibe la secreción de IL-1 beta a partir de monocitos THP-1 diferenciados con PMA inducida por urato monosódico (MSU). La figura 11 se creó después de que los monocitos THP-1 humanos se diferenciaron en macrófagos con PMA y, tal como se muestra en la figura 11, el tratamiento con MSU, un conocido activador del inflammasoma, aumentó la secreción de IL-1 beta en comparación con las células no tratadas, mientras que la coadministración de d4T en un intervalo de dosis (25-1000 μ M) no afectó significativamente a la secreción de IL-1beta.

La **figura 12** es un gráfico de barras que muestra que d4T y otros inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa no inhiben la secreción de IL-1 beta a partir de monocitos THP-1 diferenciados con PMA inducida por MSU. Los monocitos THP-1 humanos se diferenciaron en macrófagos con PMA. Su tratamiento con MSU aumentó la secreción de IL-1 beta en comparación con las células no tratadas, tal como se muestra en la figura 12, mientras que la coadministración de d4T, 3TC o cordicepina (todos son análogos di-desoxinucleotídicos) en un intervalo de dosis (25-1000 μ M) no afectó significativamente a la secreción de IL-1beta.

La **figura 13** es un gráfico que indica que d4T reduce la sensibilización de NLRP3 inducida por ARN Alu. De hecho, tal como se muestra en la figura 13, la transfección de ARN Alu aumenta los niveles de ARNm de NLRP3 en células primarias del EPR humanas a las 16 horas, un evento denominado "sensibilización" (eje Y) en comparación con el control (solo reactivo de transfección). Este efecto se atenúa por la coadministración de d4T (100 μ M) y se normaliza al control de ARN 18S.

La **figura 14** ilustra, en formato gráfico, que la transfección de ARN Alu aumenta los niveles de ARNm de IL-1 beta en células primarias del EPR humanas a las 24 horas, un evento denominado "sensibilización" (eje Y) en comparación con el control (solo reactivo de transfección). Este efecto se atenúa por la coadministración de d4T (100 μ M) y se normaliza al control de ARN 18S.

La **figura 15** muestra que d4T reduce las ROS mitocondriales provocadas por la expresión de Alu. De hecho, la figura 15 demuestra que la expresión forzada de Alu (pAluA) provoca un aumento de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales (ROSmt), según se detecta mediante el ensayo MitoSox. Para producir la figura 15, se incubaron células primarias del EPR humanas con plásmido de expresión de Alu o plásmido de control (pUC19) con o sin d4T. Después de 15 horas, las células se tiñeron conjuntamente para ROSmt (rojo) y para el recuento celular y nuclear (azul; tinción de ADN de Hoechst). Las células del grupo pAluA exhibieron una mayor tinción de ROSmt (rojo) en comparación con el control pUC19, un efecto que se reduce en las células tratadas con pAluA+d4T.

La **figura 16** proporciona un gráfico que muestra que d4T no inhibe la liberación de ATP inducida por ARN Alu. Además, las células primarias del EPR humanas tratadas con ARN Alu, para los tiempos indicados en la figura 16, liberan ATP. El sobrenadante del cultivo celular se recogió a partir de células tratadas con ARN de control o Alu, con o sin d4T, y se detectó ATP utilizando un ensayo de luciferasa dependiente de ATP. En particular, d4T no afectó a la

liberación de ATP.

La **figura 17** muestra que d4T reduce la permeabilidad celular inducida por ATP a Yo-Pro1 (ensayo del receptor P2X7). De hecho, d4T redujo de forma dependiente de la dosis la entrada de Yo-Pro inducida por ATP, determinada por una medición fluorescente de barrido de área en un lector de microplacas de 96 pocillos. La figura 17 proporciona los resultados de la medición de fluorescencia en unidades de fluorescencia relativa (UFR, eje y).

La **figura 18** ilustra, en formato gráfico, que d4T reduce los niveles extracelulares de potasio, que aumentan después de la transfección de ARN Alu. De hecho, los niveles de potasio del cultivo celular aumentan en las células primarias del EPR humanas tratadas con ARN Alu durante 6 horas, un efecto que se reduce con la coadministración de d4T. Los niveles de potasio se determinaron espectrofotométricamente en los sobrenadantes del cultivo celular utilizando un ensayo de piruvato cinasa dependiente de potasio.

La **figura 19** muestra que d4T bloquea la permeabilidad celular inducida por bzATP a Yo-Pro1 (ensayo del receptor P2X7). Para preparar la figura 19, d4T bloqueó la entrada de yoduro de YO-PRO-1 en células HEK293 que expresan de manera estable el receptor P2X7 humano estimuladas con el agonista bzATP selectivo de P2X7. Las células se preincubaron con d4T durante 30 minutos antes de la adición de bzATP/YO-PRO, y se midió la fluorescencia (en unidades de fluorescencia relativa) a 485/515 nm a $t = 30$ minutos.

La **figura 20** proporciona una estructura química de metoxi-d4T (me-d4T; nombre IUPAC: 1-[(2R, 5S)-5-(metoximetil)-2,5-dihidrofuran-2-il]-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona, también denominado en la presente memoria descriptiva "kamuvudina 1"). Más específicamente, tal como se muestra en la figura 20, se ha diseñado una única sustitución del grupo hidroxilo en 5' de la ribosa de d4T por un grupo metoxilo (encerrado en un círculo) para prevenir la fosforilación de d4T.

La **figura 21** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN Alu $\pm$ me-d4T.

La **figura 22** muestra células, en las que d4T sin modificar, pero no me-d4T, bloquea la replicación de un lentivirus que expresa GFP en células HeLa.

La **figura 23** proporciona un gráfico que ilustra que d4T sin modificar, pero no me-d4T, reduce los niveles de ADNmt (normalizados a la secuencia de unión exón-intrón del ADN cromosómico) en células primarias del EPR de ratón, según se determina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. $n = 4$, * $p < 0,05$ mediante la prueba de la t de Student.

La **figura 24** proporciona preparaciones planas teñidas para la zona de oclusión-1 (ZO-1; rojo), fila inferior. Degeneración destacada por puntas de flecha azules. Se muestran imágenes representativas de $n = 4$ (B, C, E). Barras de escala, (C): 200 μ m; (E): 20 μ m.

La **figura 25** proporciona una descripción esquemática de la síntesis de me-d4T.

La **figura 26** es un cromatograma de HPLC del producto final me-d4T (pico nº 6), > 97 % de pureza.

La **figura 27** es una espectroscopía de ^1H -RMN del producto final me-d4T, en la que los desplazamientos químicos son coherentes con la estructura de me-d4T.

La **figura 28** proporciona los resultados de la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas del producto final me-d4T, relación m/z consistente con la estructura de me-d4T.

La **figura 29** proporciona la variante metoxi de un análogo nucleosídico. Se muestra la estructura química de 3TC (2',3'-didesoxicitidina), en la que la variación metoxi (grupo O-metilo) del análogo nucleosídico está encerrada en un círculo.

La **figura 30** proporciona la variante metoxi de un análogo nucleosídico. Se muestra la estructura química de AZT (3'-azido-2',3'-didesoxitimidina), en la que la variación metoxi (grupo O-metilo) del análogo nucleosídico está encerrada en un círculo.

La **figura 31** proporciona la variante metoxi de un análogo nucleosídico. Se muestra la estructura química de ABC (ciclopropilaminopurinilciclopenteno), en la que la variación metoxi (grupo O-metilo) del análogo nucleosídico está encerrada en un círculo.

La **figura 32** muestra una variante de permeabilidad celular de d4T (IC-d4T), en la que el grupo "n" es igual a 11. Los derivados incluyen variantes de permeabilidad celular de 3TC, AZT, ABC, en los que el grupo de base nitrogenada (encerrado en un círculo) se puede sustituir, en varias realizaciones, por 3TC, AZT, ABC o variantes metoxi de d4T, 3TC, AZT, ABC (figuras 29-31), o derivados de los mismos.

La **figura 33** proporciona la estructura de un INTI de ejemplo, según la presente invención.

La **figura 34** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) y la fosforilación de IRAK4 en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN Alu $\pm$ d4T.

La **figura 35** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 en células del EPR humanas transfectadas con ARN Alu $\pm$ INTI (3TC, AZT, ABC).

La **figura 36** incluye fotografías del fondo ocular: fila superior; preparaciones planas teñidas para la zona de oclusión-1 (ZO-1; rojo), fila inferior. Barras de escala, 50 μ m.

La **figura 37** proporciona fotografías del fondo ocular: fila superior; preparaciones planas teñidas para la zona de oclusión-1 (ZO-1; rojo), fila inferior. Barras de escala, 50 μ m.

La **figura 38** ilustra que los INTI bloquean la activación del inflammasoma inducida por LPS/ATP. Específicamente, la figura 38 muestra un gel que indica que d4T bloqueó la caspasa-1.

La **figura 39** ilustra también que los INTI bloquean la activación del inflammasoma inducida por LPS/ATP, mostrando específicamente un gel que indica que d4T bloqueó la IL-1 beta.

La **figura 40** presenta cromatogramas que muestran que las células Raji TK⁺, pero no las células Raji TK⁻, fosforilan AZT a AZT-trifosfato (AZT-TP), según se determina mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS).

La **figura 41** muestra que AZT bloquea la activación de IL-1 beta por LPS/ATP en células Raji TK⁻ y TK⁺ según se determina mediante transferencia Western de lisados celulares.

La **figura 42** es un gráfico de barras que ilustra que d4T no bloquea la liberación de ATP inducida por *Alu* a partir de células primarias del EPR humanas (n = 4).

La **figura 43** proporciona un gráfico de la absorción de colorante YO-PRO-1 mediada por P2X7 (fluorescencia) inducida por bzATP (100 μM) en células HEK293 que expresan de manera estable el receptor P2X7 humano, que se inhibió por d4T y A438079 (64 μM para ambos fármacos). Los valores de fluorescencia se restan del valor inicial de las células sin tratamiento con bzATP. * bzATP frente a d4T; # bzATP frente a A438079, p <0,05 según la prueba post-hoc de Student-Newman Keuls (n = 12).

La **figura 44** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) y la fosforilación de IRAK4 en células primarias del EPR de ratón transfectadas con ARN *Alu* ± d4T.

La **figura 45** es una transferencia Northern de células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu* marcadas con biotina-UTP.

La **figura 46** proporciona espectros de LC-MS/MS de AZT-trifosfato (AZT-TP).

La **figura 47** proporciona espectros de LC-MS/MS de AZU-trifosfato (AZU-TP).

La **figura 48** muestra la separación cromatográfica de células Raji TK⁻ con adiciones conocidas de AZT-TP con espectros de MS (recuadro) para confirmar la identidad de los picos designados.

La **figura 49** muestra la separación cromatográfica de células Raji TK⁻ con adiciones conocidas de AZU-TP con espectros de MS (recuadro) para confirmar la identidad de los picos designados.

La **figura 50** es una curva de calibración de los patrones de AZT-TP (círculo negro). Tal como se muestra, las muestras de Raji TK⁺ tratadas con AZT produjeron AZT-TP (triángulos blancos), mientras que AZT-TP no fue detectable en las células Raji TK⁻ tratadas con AZT.

La **figura 51** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*, con péptido corto (Panx1¹⁰), que bloquea la función de poro de P2X7, pero no el flujo de cationes (frente al péptido desordenado: Scr Panx1¹⁰).

La **figura 52** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*, con calmidazolol (la figura 32 proporciona la estructura química de los 1C-d4T y EC-d4T utilizados), que bloquea el flujo de cationes de P2X7, pero no la función de poro.

La **figura 53** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*, con d4T permeable a las células (1C), impermeable a las células (EC) o sin modificar (sin etiqueta).

La **figura 54** muestra que d4T previene la generación de ROS mitocondriales inducida por pAlu en células primarias del EPR humanas. En la figura 54, las especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales se visualizaron con MitoSox (rojo) y los núcleos celulares con Hoechst (azul).

La **figura 55** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas en presencia de citrato de amonio y hierro (III). La adición de TM-3TC (estructura 8) (25 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por hierro. Parte inferior: tubulina como control de carga.

La **figura 56** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p10) en células primarias del EPR humanas en presencia de citrato de amonio y hierro (III). La adición de d4T-eno (estructura 3) (25 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por hierro. Parte inferior: tubulina como control de carga.

La **figura 57** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas en presencia de citrato de amonio y hierro (III). La adición de 2me-d4T (estructura 4) (25 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por hierro. Parte inferior: tubulina como control de carga.

La **figura 58** es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*. La adición de d4T-eno (estructura 3) y TM-3TC (estructura 8) (25 y 100 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por *Alu*. Parte inferior: tubulina como control de carga.

La **figura 59** es un gráfico de la cantidad relativa de ADNmt en células primarias del EPR humanas tratadas con INTI o derivados (en relación con el tratamiento con vehículo (DMSO), "No Tx") a una concentración de 50 μM para todos los fármacos. El ADN se recogió después de cuatro días en cultivo celular con exposición al fármaco. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para el ADNmt y se normalizó a la secuencia del ADN genómico. Las versiones modificadas de d4T que no están fosforiladas (por ejemplo, me-d4T (figura 20), 2 me-d4T (estructura 4)) no muestran un agotamiento del ADNmt en comparación con los INTI originales (d4T). TM-3TC es la estructura 8. N = 3-4/grupo, las barras de error son el E.E.M.

La **figura 60** es un gráfico de la cantidad relativa de ADNmt en células primarias del EPR humanas tratadas con INTI o derivados (en relación con el tratamiento con vehículo (DMSO), "No Tx") a una concentración de 50 μM para todos los fármacos. El ADN se recogió después de cuatro días en cultivo celular con exposición al fármaco. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para el ADNmt y se normalizó a la secuencia del ADN genómico. Las versiones modificadas de AZT que no están fosforiladas (me-AZT (estructura 1), N-Me-Me-AZT (estructura 10)) no presentan agotamiento del ADNmt en comparación con el compuesto original (AZT). N = 3-4/grupo, las barras de error son el E.E.M.

La **figura 61** muestra una fila superior de fotografías del fondo ocular de ratones que recibieron el plásmido de vector vacío de control subretiniano (pNull) o el plásmido que expresa ARN *Alu* (pAlu), tratados por vía intraperitoneal con INTI modificados dos veces al día (me-AZT (estructura 1), N-me-me-AZT (estructura 10) o 2 me-d4T (estructura 4); 25 mg/kg/administración) o vehículo de control, y preparaciones planas de EPR en la fila inferior, teñidas de rojo para las uniones intercelulares (ZO-1) que se rompen con la expresión de ARN *Alu*, pero que

se restauran a la morfología/uniones intercelulares de EPR sanas con el tratamiento con INTI modificado. Barras de escala 20 μm .

La **figura 62** proporciona una descripción esquemática de la síntesis de la fórmula I (estructura C en el esquema 1), fórmula IV (estructura B), fórmula VIII (estructura E), fórmula X (estructura D) y metoxi-d4T (estructura A; también la figura 20).

La **figura 63** es un gráfico de un ensayo de transducción de lentivirus que muestra que los INTI modificados no bloquean la replicación del lentivirus (a diferencia de los INTI, que bloquean la expresión de GFP del lentivirus). Se añadió un lentivirus que expresaba GFP a $2,5 \times 10^5$ células HeLa con una multiplicidad de infección de 20, en presencia de INTI (AZT, 3TC, d4T), INTI modificados (me-AZT, estructura 1; 2me-AZT, estructura 10; TM-3TC, estructura 8; me-d4T, figura 20; 2me-d4T, estructura 4) o control (vehículo). Todos los fármacos se añadieron a una concentración de 10 μM . Se obtuvieron imágenes de las células para determinar la expresión de GFP 72 horas después de la adición del lentivirus. Se registraron las células positivas para GFP por campo de visión. $n = 4-11$, las barras de error son el E.E.M. La transcripción inversa del lentivirus es esencial para la expresión de GFP; los INTI modificados no deberían bloquear la transcriptasa inversa, mientras que se sabe que los INTI bloquean la transcriptasa inversa.

La **figura 64** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a 3TC.

La **figura 65** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a 3Me-3TC.

La **figura 66** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a 3Et-3TC.

La **figura 67** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a AZT.

La **figura 68** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a 2Me-AZT.

La **figura 69** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a 2Et-AZT.

La **figura 70** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a d4T.

La **figura 71** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a O-Me N-Et d4T.

La **figura 72** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 en respuesta a Me-d4T.

La **figura 73** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo de luminiscencia de células iGluC, que muestra la inhibición de la activación de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis en respuesta a 2Et-d4T.

La **figura 74** incluye una serie de transferencias Western que muestran que la activación de caspasa-1 inducida por ARN-Alu se reduce mediante 2Et-d4T (25 μM), 2Me-AZT (25 μM), O-Me N-Et d4T (25 μM), d4T-eno (25-100 μM) y TM-3TC (25-100 μM).

La **figura 75** incluye una serie de transferencias Western que muestran que la activación de caspasa-1 inducida por hierro se reduce mediante TM-3TC (25 μM), d4T-eno (25 μM), 2Me-d4T (25 μM), Me-AZT (25-100 μM) y 2Me-AZT (25 μM). $N = 3-4$.

La **figura 76** incluye una transferencia Western que muestra que la activación de caspasa-1 inducida por el complemento se reduce mediante 3TC (25 μM).

La **figura 77** incluye una transferencia Western que muestra que la activación de caspasa-1 inducida por Paraquat se reduce mediante 3TC (25 μM).

La **figura 78** incluye una transferencia Western que muestra que la activación de caspasa-1 inducida por beta amiloide se reduce mediante 3TC (10-25 μM).

La **figura 79** incluye datos que muestran que la neovascularización coroidea en un modelo de "DMAE húmeda" se reduce mediante 3TC (0,55 nmol), ABC (0,64 nmol) o AZT (0,55 nmol).

La **figura 80** incluye datos que muestran que la neovascularización coroidea (NVC) en un modelo de "DMAE húmeda" se reduce mediante Me-d4T, O-Me-N-Et-d4T, 2Et-AZT o 3Et-3TC (0,14 nmol).

La **figura 81** incluye fotografías del fondo ocular del ojo izquierdo (dos filas superiores) y del ojo derecho (dos filas inferiores) de un primer ratón que tiene lesiones de NVC preexistentes, mostrando las filas primera y tercera la fuga de colorante dependiente del tiempo de las lesiones de NVC, la segunda fila muestra una fuga de colorante dependiente del tiempo después de una única administración intravítrea de 125 ng de 3TC y la cuarta fila muestra una fuga de colorante dependiente del tiempo después de una única administración intravítrea de 62,5 ng de 3-Me-3TC.

La **figura 82** incluye fotografías del fondo ocular del ojo izquierdo (dos filas superiores) y del ojo derecho (dos filas inferiores) de un segundo ratón que tiene lesiones de NVC preexistentes, mostrando las filas primera y tercera la fuga de colorante dependiente del tiempo de las lesiones de NVC, la segunda fila muestra una fuga de colorante dependiente del tiempo después de una única administración intravítrea de 125 ng de 3TC y la cuarta fila muestra una fuga de colorante dependiente del tiempo después de una única administración intravítrea de 62,5 ng de

3-Me-3TC.

La **figura 83** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por ARN Alu en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por 3Me-3TC y O-Me N-Et d4T.

La **figura 84** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por pAlu en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por 3Me-3TC.

La **figura 85** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por pAlu en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por 3Et-3TC.

La **figura 86** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por pAlu en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por 2Et-d4T o 2Et-AZT.

La **figura 87** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por poli IC en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por Me-d4T o 2-Me-d4T.

La **figura 88** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por beta amiloide en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por 3TC o K-2 (2Me-d4T).

La **figura 89** incluye datos que muestran que la degeneración del EPR inducida por hierro en un modelo de "DMAE seca" se bloquea por d4T, K-1 (Me-d4T) o K-2 (2Me-d4T).

La **figura 90** incluye datos que muestran que d4T, AZT o 3TC pueden provocar degeneración de la retina.

La **figura 91** incluye datos que muestran que las kamuvudinas no son tóxicas para la retina.

La **figura 92** incluye datos adicionales que muestran que las kamuvudinas no son tóxicas para la retina.

La **figura 93** incluye datos que muestran que los INTI (d4T, 3TC o AZT) reducen el ADN mitocondrial (ADNmt) mientras que los INTI modificados (Me-d4T, 2Me-d4T, TM-3TC, Me-AZT o 2Me-AZT) no reducen el ADNmt.

La **figura 94** incluye datos que muestran que los INTI (d4T, AZT o 3TC) inhiben la retrotransposición de L1, pero los INTI modificados (Me-d4T, 2Me-d4T, Me-AZT, 2Me-AZT, 3Me-3TC, 2Et-d4T, 2Et-AZT o 3Et-3TC) no inhiben la retrotransposición de L1.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES DE EJEMPLO

El objeto dado a conocer en la presente invención se ilustra mediante ejemplos específicos, pero que no constituyen limitación, a lo largo de la presente descripción. Los ejemplos pueden incluir compilaciones de datos que son representativos de los datos recopilados en diversos momentos durante el transcurso del desarrollo y la experimentación relacionados con la presente invención o las presentes invenciones. Cada ejemplo se proporciona a modo de explicación de la presente invención y no constituye una limitación de la misma. De hecho, será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones a las enseñanzas de la presente invención sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización se pueden utilizar con otra realización para producir una realización adicional.

Todas las referencias a características o limitaciones singulares de la presente invención incluirán las características o limitaciones plurales correspondientes y viceversa, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto en el que se hace la referencia implique claramente lo contrario.

Todas las combinaciones de etapas de procedimientos o proceso, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, se pueden realizar en cualquier orden, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto en el que se realiza la combinación de referencia implique claramente lo contrario.

Si bien se cree que los expertos en la materia entienden bien los términos utilizados en la presente memoria descriptiva, se establecen ciertas definiciones para facilitar la explicación del objeto dado a conocer en la presente invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece(n) la presente invención o las presentes invenciones.

Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y que la información particular en Internet puede aparecer y desaparecer, pero se puede encontrar información equivalente buscando en Internet. La referencia a los mismos evidencia la disponibilidad y difusión pública de dicha información.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, las abreviaturas para cualquier grupo protector y compuesto están, a menos que se indique lo contrario, de acuerdo con su utilización habitual, son abreviaturas reconocidas o son las de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (véase, Biochem. (1972) 11(9):1726-1732).

Siguiendo una convención del derecho de patentes consolidada, cuando se utilizan en la presente solicitud los términos "un", "una" y "el/la" se refieren a "uno o varios", incluidas las reivindicaciones. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de estas células, y así sucesivamente.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades

tales como las condiciones de reacción, etc., utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se deben entender como modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretendan obtener mediante el objeto dado a conocer en la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término “aproximadamente”, cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje, pretende abarcar variaciones de, en algunas realizaciones, $\pm 20\%$, en algunas realizaciones, $\pm 10\%$, en algunas realizaciones, $\pm 5\%$, en algunas realizaciones, $\pm 1\%$, en algunas realizaciones, $\pm 0,5\%$ y, en algunas realizaciones, $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que estas variaciones son apropiadas para realizar el procedimiento dado a conocer.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, los intervalos se pueden expresar desde “aproximadamente” un valor particular y/o hasta “aproximadamente” otro valor particular. También se entiende que hay una serie de valores dados a conocer en este intervalo, y que cada valor también se da a conocer en este intervalo como “aproximadamente” ese valor particular además del valor en sí. Por ejemplo, si se da a conocer el valor “10”, entonces también se da a conocer “aproximadamente, 10”. También se entiende que también se da a conocer cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se dan a conocer 10 y 15, también se dan a conocer 11, 12, 13 y 14.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, “opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente tiene lugar o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho evento o circunstancia tiene lugar y casos en los que no. Por ejemplo, una porción opcionalmente variante significa que la porción es variante o no variante.

El término “derivado fisiológicamente funcional” significa cualquier derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, una amida o un éster de un compuesto de fórmula (I) o de un compuesto de fórmula (II) que, tras la administración a un individuo, en particular a un mamífero, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, un compuesto de la presente invención a partir de un metabolito activo del mismo.

Los términos “tratamiento” o “tratar” se refieren a la gestión médica de un individuo con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una afección o un trastorno (por ejemplo, degradación retiniana). Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una afección, y también incluye el tratamiento etiológico, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la afección asociada. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, un tratamiento diseñado para aliviar los síntomas en lugar de curar la afección; el tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de síntomas o trastornos de la afección asociada; y el tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento utilizado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, la afección patológica o el trastorno asociados.

Con respecto a la administración del compuesto, el término “administrar” se refiere a cualquier procedimiento para proporcionar una composición y/o composición farmacéutica de la misma a un individuo. Dichos procedimientos son bien conocidos por los expertos en la materia y entre los que se incluyen, pero sin constituir limitación, administración oral, administración transdérmica, administración por inhalación, administración nasal, administración tópica, administración intravaginal, administración oftálmica, administración intraóptica, administración intracerebral, administración rectal y administración parenteral, que incluyen inyectables, tales como la administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intravítrea, incluyendo mediante un dispositivo de administración intravítrea sostenida de fármacos, administración intracameral (en la cámara anterior), inyección supracoroidea, administración subretiniana, inyección subconjuntival, administración sub-Tenon, administración peribulbar, administración transcleral de fármacos, administración mediante colirio tópico y similares. La administración puede ser continua o intermitente. En diversos aspectos, una preparación se puede administrar terapéuticamente; es decir, administrarse para tratar una enfermedad o afección existente (por ejemplo, exposición a compuestos OP (organofosforados). En diversos aspectos adicionales, una preparación se puede administrar profilácticamente, es decir, administrarse para la prevención de una enfermedad o afección.

El término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad que es suficiente para conseguir el resultado deseado o para tener un efecto sobre una afección no deseada. Por ejemplo, una “cantidad eficaz terapéuticamente” se refiere a una cantidad que es suficiente para conseguir el resultado terapéutico deseado o para tener un efecto sobre los síntomas no deseados, pero que, en general, es insuficiente para provocar efectos secundarios adversos. El nivel de dosis eficaz terapéuticamente específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, entre los que se incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la composición específica utilizada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración; la vía de administración; la tasa de excreción del compuesto específico utilizado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o simultáneamente con el compuesto específico utilizado y factores similares.

bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, es ampliamente conocido en la técnica comenzar con dosis de un compuesto a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en múltiples dosis con fines de administración. En consecuencia, las composiciones de dosis única pueden contener estas cantidades o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria. La dosificación puede ser ajustada por el médico individual en caso de contraindicaciones. La dosificación puede variar y se puede administrar en una o varias dosis diarias, durante uno o varios días. Se puede encontrar orientación en la bibliografía para las dosificaciones apropiadas para determinadas clases de productos farmacéuticos. En diversos aspectos adicionales, se puede administrar una preparación en una "cantidad eficaz profilácticamente"; es decir, una cantidad eficaz para la prevención de una enfermedad o afección.

Los términos "individuo" o "individuo que lo necesita" se refieren a un objetivo de administración, que opcionalmente muestra síntomas relacionados con una enfermedad, una afección, un trastorno o similar en particular. El individuo o los individuos de los procedimientos dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden ser humanos o no humanos (por ejemplo, primates, caballos, cerdos, conejos, perros, ovejas, cabras, vacas, gatos, cobayas, roedores y no mamíferos). El término "individuo" no denota una edad o un sexo en particular. De este modo, se pretenden cubrir a individuos adultos y recién nacidos, así como a fetos, ya sean hombres o mujeres. El término "individuo" incluye individuos humanos y veterinarios.

Tal como reconocerá un experto en la materia, los términos "supresión", "suprimir", "supresor", "inhibición", "inhibir" o "inhibidor" no se refieren a una eliminación completa de la angiogénesis en todos los casos. Más bien, el experto en la materia entenderá que el término "suprimir" o "inhibir" se refiere a una reducción o disminución de la angiogénesis. Esta reducción o disminución se puede determinar con relación a un control. En algunas realizaciones, la reducción o disminución con relación a un control puede ser de, aproximadamente, el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100 % de disminución.

En algunas realizaciones de ejemplo, el objeto dado a conocer en la presente invención incluye procedimientos para tratar el daño y/o degeneración de la retina. De hecho, algunos procedimientos de la presente invención comprenden administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de una composición para tratar el daño y/o la degradación de la retina.

En algunas realizaciones, la composición comprende un nucleósido y/o un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa (INTI). Además, en algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende un nucleósido y/o un compuesto INTI, así como un vehículo aceptable farmacéuticamente.

Tal como se analiza en la presente memoria descriptiva, en algunos procedimientos de ejemplo de la presente invención, la composición administrada es una composición que comprende un nucleósido y/o INTI. De este modo, las composiciones de ejemplo se componen de compuestos entre los que se incluyen, pero sin constituir limitación, estavudina (d4T), lamivudina (3TC), cordicepina, azidotimidina (AZT), abacavir (ABC), derivados químicos de los mismos (por ejemplo, derivados metoxi para anular la fosforilación) y similares. Entre otros posibles compuestos se incluyen, por ejemplo, los dados a conocer en la Patente US6,514,979 de Heredia et al. Los expertos en la materia también reconocerán nucleósidos y/o INTI adicionales, tal como los que se describen en la presente memoria descriptiva, que se pueden utilizar en las composiciones y los procedimientos de la presente invención.

En algunas realizaciones, un procedimiento de la presente invención comprende inhibir la activación de uno o varios procesos fisiológicos mediante ARN Alu. Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, los aumentos de ARN Alu (entre los que se incluyen el ARN de repeticiones de Alu en células humanas y ARN de repeticiones de elementos de tipo Alu, B1 y B2) están asociados con células que están asociadas con ciertas afecciones de interés. Por ejemplo, un aumento de ARN Alu está asociado con las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) de ojos con atrofia geográfica. Este aumento de ARN Alu induce la muerte de las células del EPR. Los procedimientos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden tratar la degradación del EPR, tratando de este modo las afecciones asociadas con dicha muerte celular.

En algunas realizaciones, un procedimiento de la presente invención comprende inhibir la activación de, como mínimo, un inflammasoma. En determinadas realizaciones el, como mínimo, un inflammasoma se selecciona entre un inflammasoma NLRP3, un inflammasoma IL-1beta y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la inhibición de uno o varios inflammasomas de una célula incluye administrar un inhibidor (una composición) a la célula y/o a un individuo, en la que la célula es la célula de un individuo. Para las composiciones que comprenden un inhibidor, un inhibidor tal como los que se describen en la presente memoria descriptiva puede ser, por ejemplo, un inhibidor polipeptídico (entre los que se incluye un inhibidor oligonucleotídico), un inhibidor de molécula pequeña y/o un inhibidor de ARNip.

Además, algunos procedimientos de administración de ejemplo de las composiciones de la presente invención pueden inhibir la inflamación mediante LPS/ATP, la activación del inflammasoma mediante LPS/ATP, la activación del

inflammasoma mediante ARN Alu y/o la activación del inflammasoma inducida por nigericina. Los procedimientos de ejemplo también pueden tratar la degradación retiniana y/u otro daño retiniano reduciendo las especies reactivas del oxígeno mitocondriales, en particular las provocadas por la expresión de ARN Alu, bloqueando la entrada a través del receptor P2X7 y/o reduciendo la permeabilidad celular inducida por ATP.

En algunas realizaciones, un procedimiento de la presente invención comprende tratar el daño retiniano inhibiendo una acción particular en una célula. En algunas realizaciones, la célula se selecciona entre una célula del EPR, una célula fotorreceptora retiniana o una célula coroidea. En algunas realizaciones, la célula es una célula del EPR. En algunas realizaciones, la célula es la célula de un individuo. En algunas realizaciones, la célula es una célula de un individuo que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una afección de interés. En algunas realizaciones, la célula es una célula de un individuo que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener degeneración macular asociada con la edad. En algunas realizaciones, la célula es una célula de un individuo que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener atrofia geográfica. En algunas realizaciones, la célula es una célula de un individuo que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener atrofia geográfica y la célula es una célula del EPR. En algunas realizaciones, un individuo que tiene degeneración macular asociada con la edad se puede tratar utilizando procedimientos y composiciones tal como los que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva.

De este modo, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva con referencia a un polipéptido que se inhibe, "de una célula" se refiere a un polipéptido que está dentro de la célula (dentro de la membrana celular), sobre la célula (en la membrana celular, presentado en la membrana celular o sobre la célula de otra manera) o fuera de una célula, pero siempre y cuando el polipéptido esté fuera de la célula, está en el medio extracelular de manera que un experto en la materia reconocería que el polipéptido está asociado con la célula. Por ejemplo, VDAC1, VDAC2, caspasa-8, NFκB o un polipéptido de un inflammasoma (por ejemplo, NLRP3, PYCARD, caspasa-1) podrían estar en la célula. Como otro ejemplo, NLRP3 podría estar en la célula o sobre la célula.

Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, el objeto dado a conocer en la presente invención incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva junto con un vehículo aceptable farmacéuticamente.

La expresión "vehículo aceptable farmacéuticamente" se refiere a soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, así como a polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su utilización. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante la utilización de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante la utilización de surfactantes. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede garantizar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede producir mediante la inclusión de agentes, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, que retrasan la absorción. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Dependiendo de la proporción de fármaco respecto a polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Las formulaciones de depósito inyectables también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales. Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otros medios inyectables estériles justo antes de su utilización. Entre los vehículos inertes adecuados se pueden incluir azúcares, tales como la lactosa.

Entre las formulaciones adecuadas se incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, agentes reguladores del pH, bacteriostáticos, antibióticos bactericidas y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con los líquidos corporales del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su utilización.

Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado congelado o secado criogénicamente (liofilizado), requiriendo solo la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su utilización.

Para la administración oral, las composiciones pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas

preparados mediante una técnica convencional con excipientes aceptables farmacéuticamente, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su utilización. Estas preparaciones líquidas se pueden preparar mediante técnicas convencionales con aditivos aceptables farmacéuticamente, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales reguladoras del pH, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo. Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o grageas formulados de manera convencional.

Las composiciones se pueden formular como colirios. Por ejemplo, el vehículo aceptable farmacéuticamente puede comprender una solución salina u otras sustancias utilizadas para formular un colirio, opcionalmente con otros agentes. De este modo, las formulaciones de colirio permiten la administración tópica directamente al ojo de un individuo.

Las composiciones también se pueden formular como una preparación para implantación o inyección. De este modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble). Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales, cremas o lociones, o parches transdérmicos.

El objeto dado a conocer en la presente invención incluye además un kit que puede incluir un compuesto o una composición farmacéutica, tal como los que se describen en la presente memoria descriptiva, envasados junto con un dispositivo útil para la administración del compuesto o la composición. Tal como reconocerán los expertos en la materia, el dispositivo auxiliar de administración apropiado dependerá de la formulación del compuesto o la composición que se seleccione y/o del sitio de administración deseado. Por ejemplo, si la formulación del compuesto o la composición es apropiada para inyección en un individuo, el dispositivo podría ser una jeringa. Como otro ejemplo, si el sitio de administración deseado es un medio de cultivo celular, el dispositivo podría ser una pipeta estéril.

Además, los INTI de la presente invención son una clase diversa, ampliamente utilizada y económica de moléculas pequeñas, con amplios datos farmacocinéticos y de seguridad recopilados durante las últimas décadas de utilización en humanos; por lo tanto, los INTI están listos para su reutilización como fármacos. De este modo, la presente invención da a conocer una base novedosa y ampliamente aplicable para la utilización de uno o varios INTI al abordar importantes necesidades médicas no cubiertas.

Tal como se ha descrito anteriormente de manera breve, la degeneración macular asociada con la edad es una enfermedad que afecta a decenas de millones de personas en todo el mundo y no existe un tratamiento eficaz para la DMAE (Ambati y Fowler, 2012). De manera similar, la enfermedad de injerto contra huésped es el principal obstáculo que impide el éxito del trasplante de tejido (Ferrara et al., 2009); y la inflamación estéril del hígado es un factor importante que contribuye a la lesión hepática inducida por fármacos y a la esteatohepatitis, un factor determinante importante de la fibrosis y la carcinogénesis (Kubes y Mehal, 2012). De este modo, algunos procedimientos y/o compuestos de la presente invención están destinados a tratar la degeneración macular asociada con la edad, la enfermedad de injerto contra huésped y/o la inflamación estéril del hígado mediante la administración, en algunas realizaciones, de un compuesto que comprende, como mínimo, un INTI, tal como los que se dan a conocer en la presente invención.

Dado que la inhibición del inflammasoma mediante los INTI se puede conseguir sin la fosforilación de un INTI particular, la utilización de me-d4T u otros análogos nucleosídicos incompetentes para la fosforilación, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, debería prevenir las toxicidades terapéuticas limitantes asociadas con la inhibición de la polimerasa mediada por NRT1-trifosfato (Lewis et al., 2003). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a procedimientos para tratar la enfermedad de la retina mediante la administración de me-d4T u otro análogo nucleosídico incompetente para la fosforilación a un individuo que lo necesita.

Además, en determinadas realizaciones, la presente invención da a conocer procedimientos para tratar el daño retiniano, que comprenden: administrar una cantidad eficaz de un compuesto o una composición a un individuo que

lo necesita, en los que la composición comprende un compuesto, tal como los que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, o combinaciones de los mismos.

5 En algunas realizaciones, el objeto dado a conocer en la presente invención da a conocer procedimientos para proteger una célula del EPR, una célula fotorreceptora retiniana, una célula coroidea o una combinación de las mismas, que comprenden, como mínimo, la etapa de administrar una cantidad eficaz de un compuesto o una composición a un individuo que lo necesita, en los que la composición comprende un compuesto, tal como los que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, o combinaciones de los mismos.

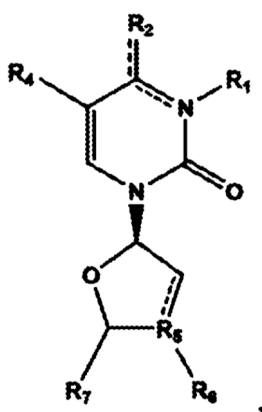
10 En algunas realizaciones, el objeto dado a conocer en la presente invención da a conocer procedimientos para las afecciones asociadas con el daño y/o la degradación de la retina, que implican administrar una cantidad eficaz de un compuesto o una composición a un individuo que lo necesita, en los que la composición comprende un compuesto, tal como los que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, o combinaciones de los mismos.

15 En algunas realizaciones, el objeto dado a conocer en la presente invención da a conocer procedimientos para tratar la degeneración macular asociada con la edad (DMAE), que implican administrar una cantidad eficaz de un compuesto o una composición a un individuo que lo necesita, en los que la composición comprende un compuesto, tal como los que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la DMAE es DMAE húmeda. En algunas realizaciones, la DMAE es DMAE seca.

20 Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, los inventores de la presente invención han descubierto que los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa, que están aprobados por la FDA para el tratamiento del VIH y el VHB, resultaron sorprendentemente eficaces en modelos de ratón de degeneración macular asociada con la edad (DMAE) seca y húmeda (Fowler et al. Science 2014). Sin embargo, algunos de los INTI analizados por los inventores de la presente invención (es decir, d4T, AZT) provocan efectos secundarios indeseables en los pacientes, que se cree que ocurren debido a efectos inespecíficos sobre la ADN polimerasa-gamma, lo que conduce al agotamiento mitocondrial. Si los INTI se van a utilizar para tratar enfermedades crónicas, tales como la DMAE, la inhibición de la polimerasa a largo plazo con los INTI podría dificultar su traducción clínica.

25 Los inventores de la presente invención diseñaron una novedosa versión modificada con metoxilo de d4T (Fowler et al. Science 2014). Sin embargo, la síntesis de me-d4T fue laboriosa (más de 10 etapas). Además, otros INTI, tales como AZT y 3TC, también bloquearon modelos de ratón de DMAE seca y húmeda (Fowler et al. Science 2014; Mizutani et al. IOVS 2015, en impresión), aunque no se sabe si las versiones modificadas de estos fármacos también son eficaces en estos modelos. Por consiguiente, el objeto dado a conocer en la presente invención incluye compuestos únicos útiles para las indicaciones que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, sin los inconvenientes de los compuestos conocidos anteriormente.

30 El objeto dado a conocer en la presente invención da a conocer, en determinadas realizaciones, un compuesto que tiene la estructura



o una sal aceptable farmacéuticamente del mismo, en la que

45 R₁ se selecciona entre enlace covalente, H, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquileo, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino; en algunas realizaciones, R₁ se selecciona entre etilo, butilo, propilo, 2-metilpropilo y t-butilo; y, en algunas realizaciones, R₁ se selecciona entre enlace covalente, H y -CH₃;
R₂ se selecciona entre H, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquileo, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino; en algunas realizaciones, R₂ se selecciona entre etilo, butilo, propilo, 2-metilpropilo y t-butilo; y, en algunas realizaciones, R₂ es -N-(R₃)₂, en el que cada R₃ se selecciona independientemente entre alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquileo, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino, y, en algunas realizaciones, cada R₃ se selecciona independientemente entre H, CH₃, etilo, butilo, t-butilo, isobutilo, propilo, 2-metilpropilo, isopropilo, pentilo y hexilo;

R₄ se selecciona entre H, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilenos, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino; y, en algunas realizaciones, R₄ se selecciona entre -CR₃ y etilo,

R₅ se selecciona entre C, CH y S;

R₆ se selecciona entre H, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilenos, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino; en algunas realizaciones, R₆ se selecciona entre etilo, butilo, propilo, 2-metilpropilo y t-butilo; y, en algunas realizaciones, R₆ se selecciona entre -N=N'=NH y N₃; y

R₇ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquilo ramificado, alquilenos, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino; en algunas realizaciones, R₇ se selecciona entre etilo, butil, propilo, 2-metilpropilo y t-butilo; en algunas realizaciones, R₇ se selecciona entre -CH₂-O-CH₃, -CH₃, =CH₂, -CH₂-NH₂ y -CH₂-N=N'=NH; y, en algunas realizaciones, R₇ es -CH₂-O-R₈, en el que R₈ se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, alquilenos, acilo, alcoxilo, aciloxilo y acilamino, y, en algunas realizaciones, R₈ se selecciona entre -CH₃, etilo, propilo, 2-metilpropilo, isopropilo, butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "alquilo" se refiere a cadenas de hidrocarburo C1-20 inclusivas, lineal (es decir, "de cadena lineal"), ramificado o cíclico, saturado o, como mínimo, parcialmente saturado y, en algunos casos, completamente insaturado (es decir, alqueno y alquino), entre las que se incluyen, por ejemplo, los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, butadienilo, propinilo, metilpropinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y alenilo. "Ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena de alquilo lineal. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a, aproximadamente, 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C1-8), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono. "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de, aproximadamente, 10 a, aproximadamente, 20 átomos de carbono, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C1-8 de cadena lineal. En otras realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C1-8 de cadena ramificada.

Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos (un "alquilo sustituido") con uno o varios sustituyentes de grupo alquilo, que pueden ser iguales o diferentes. El término "sustituyente de grupo alquilo" incluye, pero sin constituir limitación, alquilo, alquilo sustituido, halo, arilamino, acilo, hidroxilo, ariloxilo, alcoxilo, alquiltio, ariltio, aralquilo, aralquiltio, carboxilo, alcoxycarbonilo, oxo y cicloalquilo. Se pueden insertar opcionalmente a lo largo de la cadena de alquilo uno o varios átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido, en el que el sustituyente del nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (en la presente memoria descriptiva, denominado también "alquilaminoalquilo") o arilo.

De este modo, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "alquilo sustituido" incluye grupos alquilo, tal como los que se definen en la presente memoria descriptiva, en los que uno o varios átomos o grupos funcionales del grupo alquilo se sustituyen con otro átomo o grupo funcional, entre los que se incluyen, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

Además, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, los términos alquilo y/o "alquilo sustituido" incluyen un "alilo" o un "grupo alílico". Los términos "grupo alílico" o "alilo" se refieren al grupo CH₂HC=CH₂ y a derivados del mismo formados por sustitución. De este modo, los términos alquilo y/o alquilo sustituido incluyen grupos alilo, tales como, pero sin constituir limitación, alilo, metilalilo, dimetilalilo y similares. El término "posición alílica" o "sitio alílico" se refiere al átomo de carbono saturado de un grupo alílico. De este modo, un grupo unido a un sitio alílico, tal como un grupo hidroxilo u otro grupo sustituyente, se puede denominar "alílico".

"Alquilenos" se refiere a un grupo hidrocarburo alifático bivalente lineal o ramificado que tiene de 1 a, aproximadamente, 20 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. El grupo alquilenos puede ser lineal, ramificado o cíclico. El grupo alquilenos también puede estar opcionalmente insaturado y/o sustituido con uno o varios "sustituyentes de grupo alquilo". Se pueden insertar opcionalmente a lo largo del grupo alquilenos uno o varios átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido (en la presente memoria descriptiva, denominado también "alquilaminoalquilo"), en el que el sustituyente del nitrógeno es alquilo, tal como se ha descrito anteriormente. Entre los grupos alquilenos de ejemplo se incluyen metileno (-CH₂-); etileno (-CH₂-CH₂-); propileno (-CH₂)₃-; ciclohexileno (-C₆H₁₀-); -CH=CH-CH=CH-; -CH=CH-CH₂-; -(CH₂)_qN(R)-(CH₂)_r-, en el que cada q y r es independientemente un número entero de 0 a, aproximadamente, 20, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20, y R es hidrógeno o alquilo inferior; metilendioxisilo (-O-CH₂-O-) y etilendioxisilo (-O-(CH₂)₂-O-). Un grupo alquilenos puede tener de, aproximadamente, 2 a, aproximadamente, 3 átomos de carbono y puede tener además de 6 a 20 átomos de carbono.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "acilo" se refiere a un grupo ácido orgánico en el que el OH del grupo carboxilo se ha reemplazado por otro sustituyente (es decir, tal como se representa por RCO-, en el que R es un grupo alquilo o arilo, tal como se ha definido en la presente memoria descriptiva). De este modo, el término "acilo" incluye específicamente grupos arilacilo, tales como un acetilfurano y un grupo fenacilo. Entre los ejemplos específicos de grupos acilo se incluyen acetilo y benzoilo.

“Alcoxilo” o “alcoxialquilo” se refiere a un grupo alquil-O- en el que alquilo es tal como se ha descrito anteriormente. El término “alcoxilo”, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se puede referir a cadenas de oxohidrocarburo C1-20 inclusives, lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, entre las que se incluyen, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, t-butoxilo y pentoxilo.

“Aciloxilo” se refiere a un grupo acil-O- en el que acilo es tal como se ha descrito anteriormente.

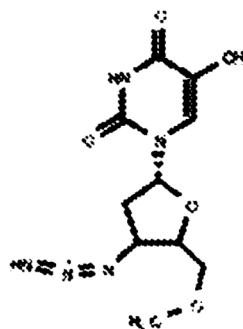
“Acilamino” se refiere a un grupo acil-NH- en el que acilo es tal como se ha descrito anteriormente.

El término “amino” se refiere al grupo -NH₂.

Una línea discontinua que representa un enlace en una estructura de anillo cíclico indica que el enlace puede estar presente o ausente en el anillo. Es decir, una línea discontinua que representa un enlace en una estructura de anillo cíclico indica que la estructura de anillo se selecciona entre el grupo que consiste en una estructura de anillo saturado, una estructura de anillo parcialmente saturado y una estructura de anillo insaturado.

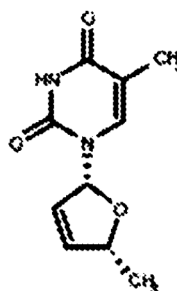
Además, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a los compuestos dados a conocer a continuación, a las composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos dados a conocer a continuación, a la síntesis y/o la utilización de uno o varios de los compuestos dados a conocer a continuación.

En algunas realizaciones, el compuesto dado a conocer en la presente invención tiene la estructura de cualquiera de las fórmulas I-XIV, o la de una sal aceptable farmacéuticamente del mismo.



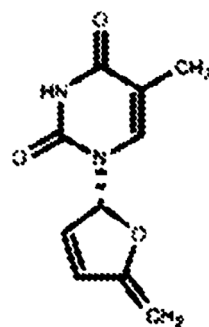
(I)

Me-AZT: 1-[(5R)-2-(metoximetil)-5-(5-metil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-1-il)oxolan-3-il]triazol-2-il (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 5)



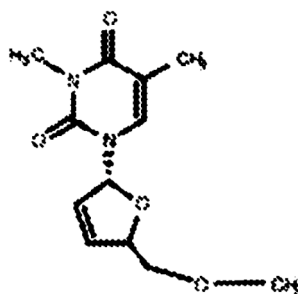
(II)

desoxi-metil-d4T: 5-metil-1-[(2R,5R)-5-metil-2,5-dihidrofuran-2-il]-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona



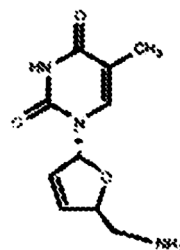
(III)

metilen-d4T: 5-metil-1-[(2R)-5-metiliden-2,5-dihidrofuran-2-il]-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona



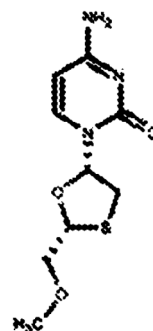
(IV)

2Me-d4T: 1-[(2R)-5-(metoximetil)-2,5-dihidrofuran-2-il]-3,5-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona (en la presente memoria descriptiva, denominado también "kamuvudina 2")



(V)

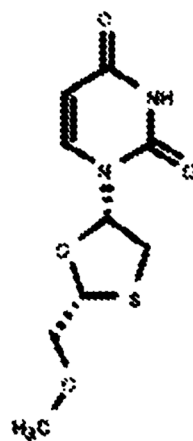
desoxi-amino-d4T: 1-[(2R)-5-(aminometil)-2,5-dihidrofuran-2-il]-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona



(VI)

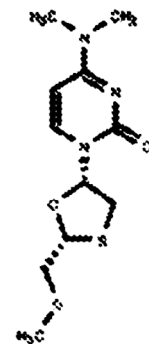
Me-3TC: 4-amino-1-(2R,5S)-2-(metoximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2-dihidropirimidin-2-ona

(VII)



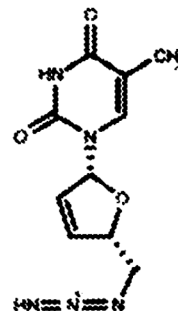
desamino-Me-3TC: 1-[(2R,5S)-2-(metoximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona

(VIII)



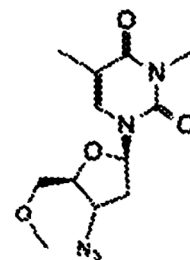
3Me-3TC: 4-(dimetilamino)-1-[(2R,5S)-2-(metoximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2-dihidropirimidin-2-ona (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 6 y TM-3TC)

(IX)

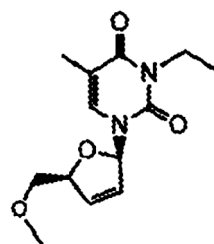


Azido-d4T: 1-[[[(2S,5R)-5-(5-metil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-1-il)-2,5-dihidrofuran-2-il]metil]triazaz-1,2-dien-2-io

(X)



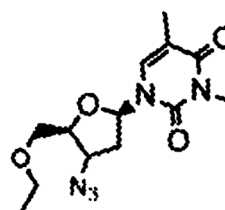
2Me-AZT: 1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(metoximetil)oxolan-2-il]-3,5-dimetil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 4)



(XI)

O-Me N-Et d4T: 3-etil-1-((2R,5S)-5-(metoximetil)-2,5-dihidrofuran-2-il)-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 3)

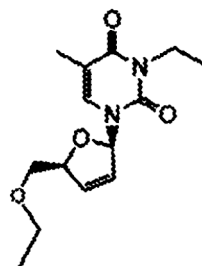
5



(XII)

2Et-AZT: 1-[(2R,4S,5S)-4-azido-5-(etoximetil)oxolan-2-il]-3-etil-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 8)

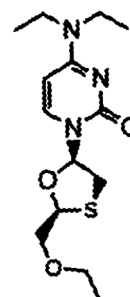
10



(XIII)

2Et-d4T: 1-[(2R,5S)-5-(etoximetil)-2,5-dihidrofuran-2-il]-3-etil-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2,4-diona (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 7)

15

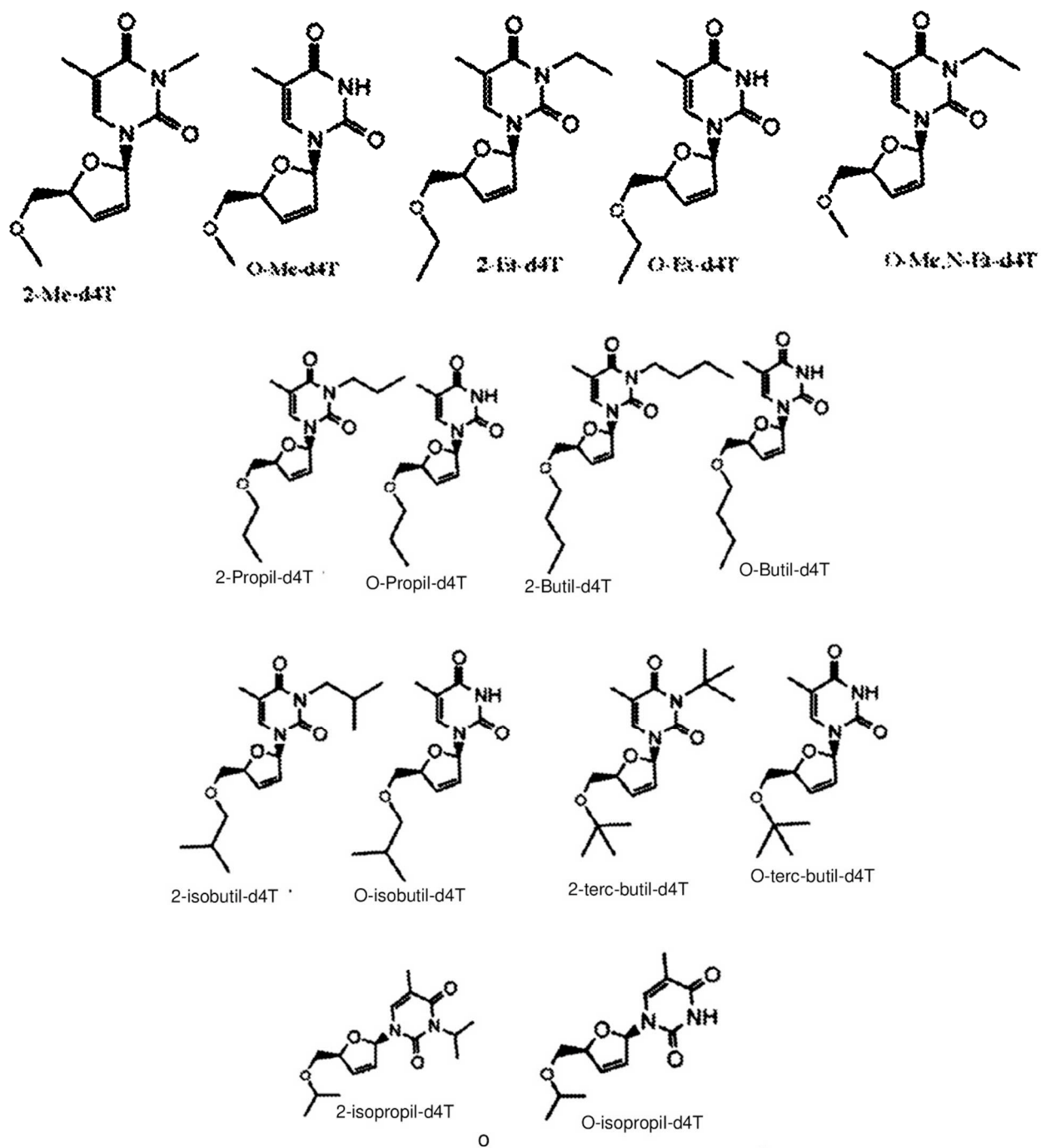


(XIV)

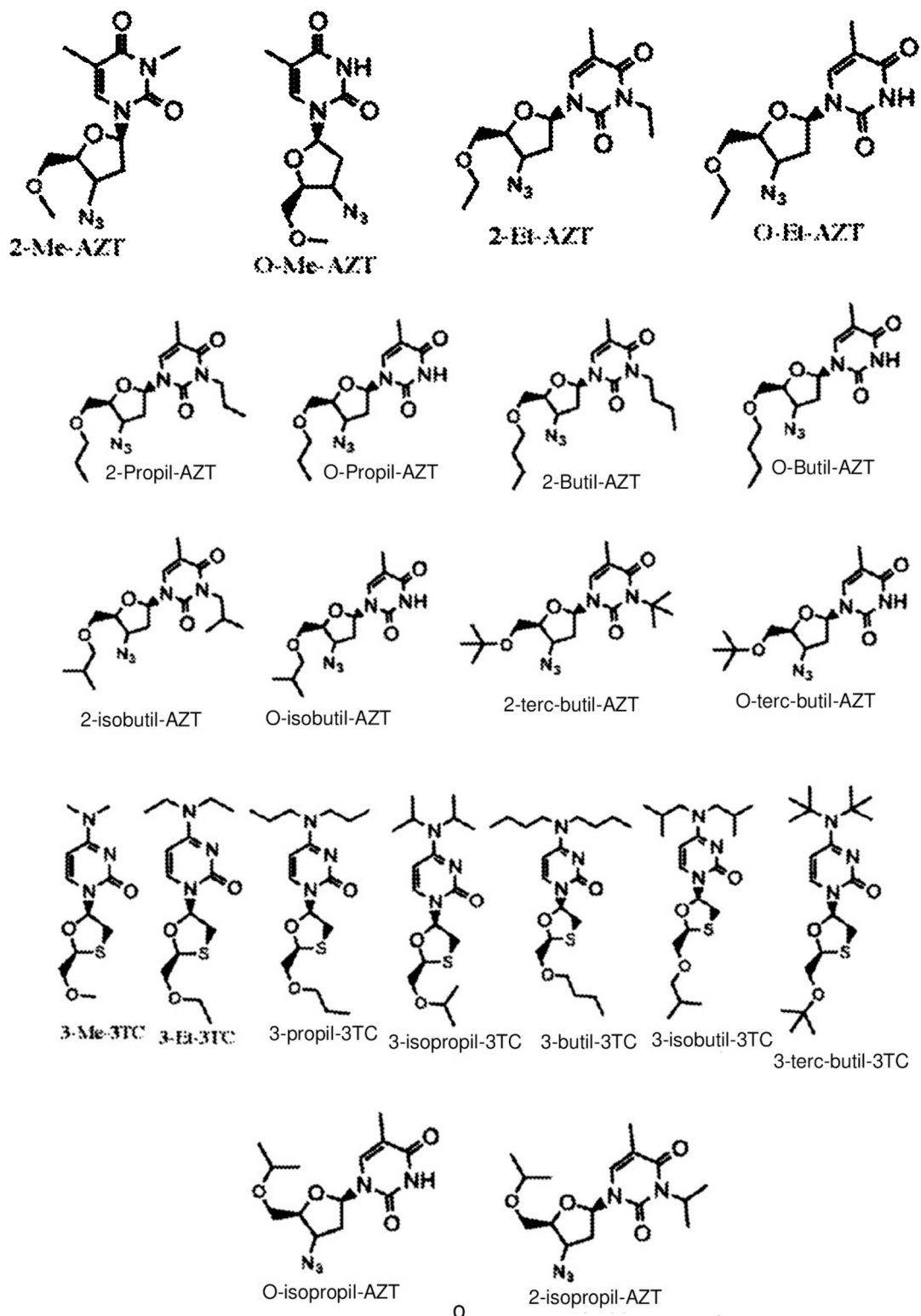
3Et-3TC: 4-(dietilamino)-1-[2-(etoximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-1,2-dihidropirimidin-2-ona (en la presente memoria descriptiva, denominado también kamuvudina 9)

20

En algunas realizaciones, el compuesto dado a conocer en la presente invención tiene la estructura de cualquiera de los siguientes compuestos, o la de una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos:

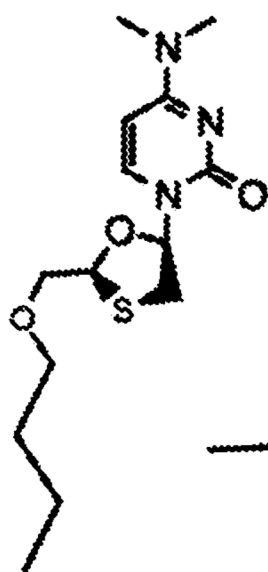


En alguna realización, el compuesto dado a conocer en la presente invención tiene la estructura de cualquiera de los siguientes compuestos, o la de una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos:

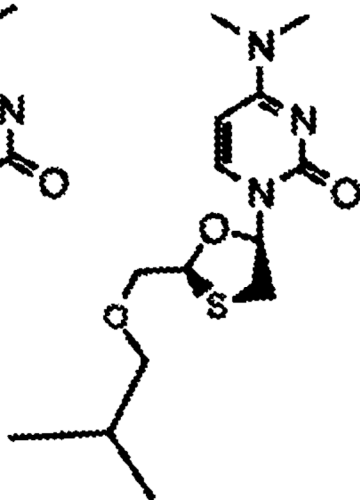


En algunas realizaciones, el compuesto dado a conocer en la presente invención tiene la estructura de cualquiera de los siguientes compuestos, o la de una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos:

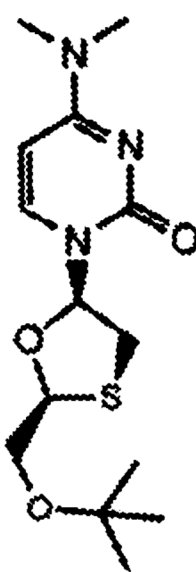
5



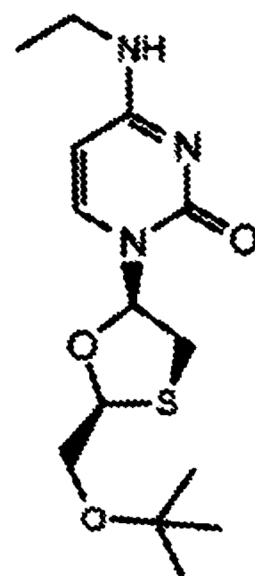
3tc-C6-4,1,1



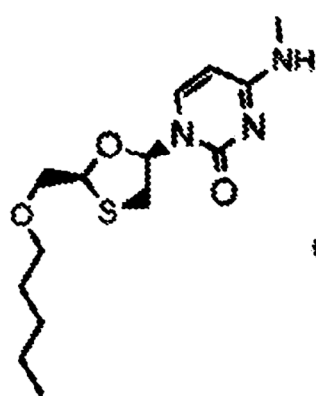
3tc-C6-4*,1,1



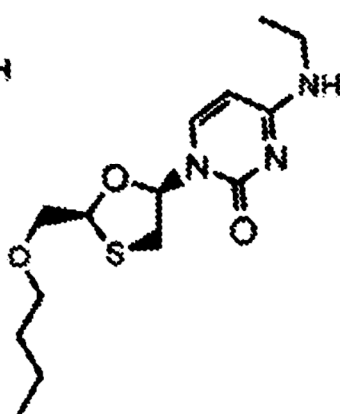
3tc-C6-4**,1,1



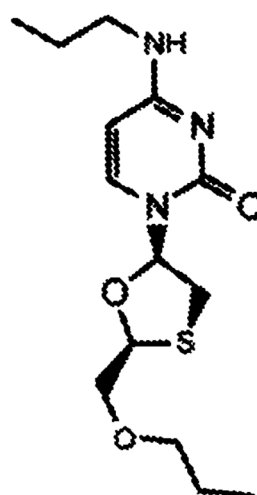
3tc-C6-4**,2,0



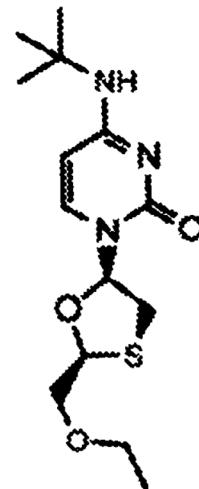
3tc-C6-5,1,0



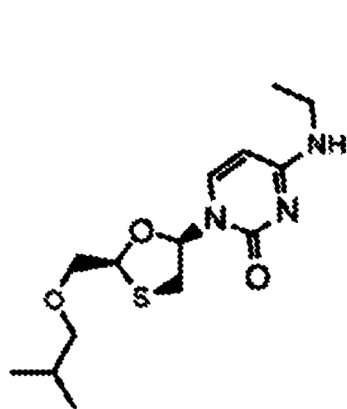
3tc-C6-4,2,0



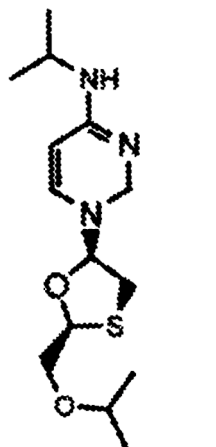
3tc-C6-3,3,0



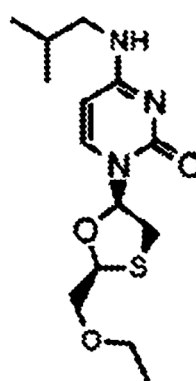
3tc-C6-2,4**,0



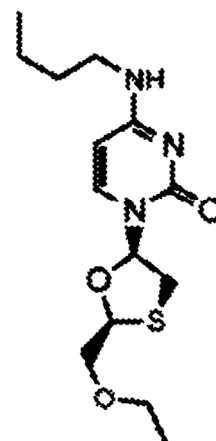
3tc-C6-4*,2,0



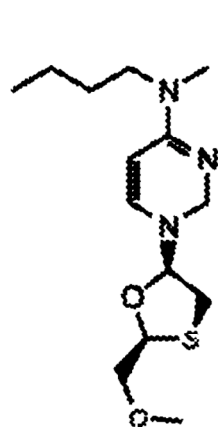
3tc-C6-3*,3*,0



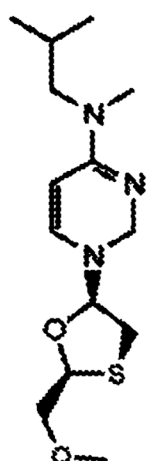
3tc-C6-2,4*,0



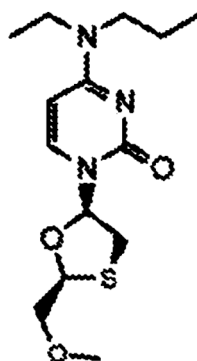
3tc-C6-2,4,0



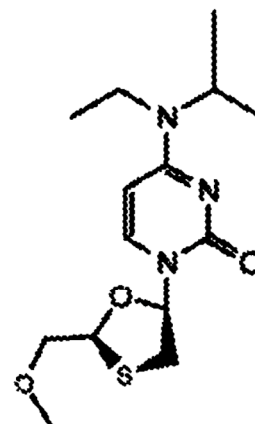
3tc-C6-1,4,1



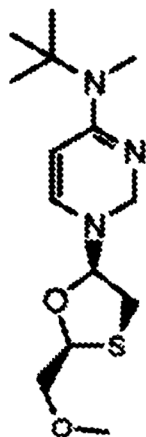
3tc-C6-1,4*,1



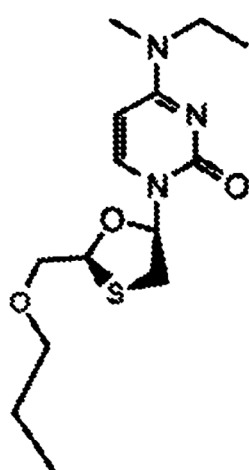
3tc-C6-1,2,3



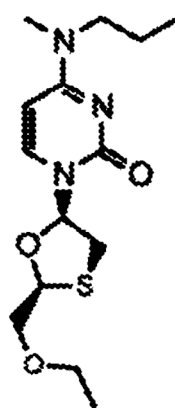
3tc-C6-1,2,3*



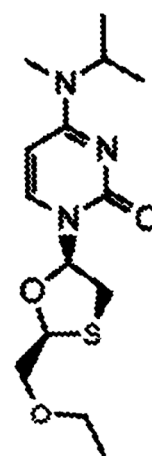
3tc-C6-1,3**,1



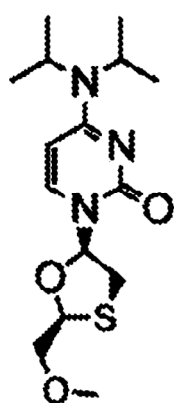
3tc-C6-3,1,2



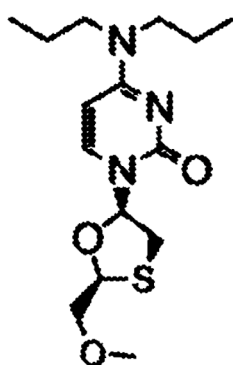
3tc-C6-2,1,3



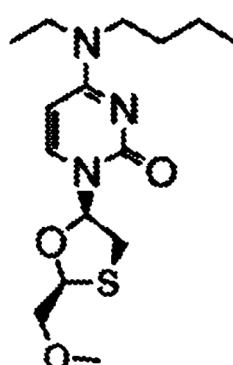
3tc-C6-2,1,3*



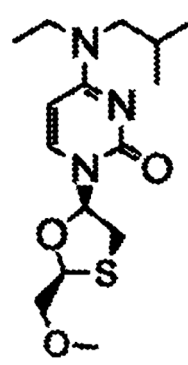
3tc-C7-1,3*,3*



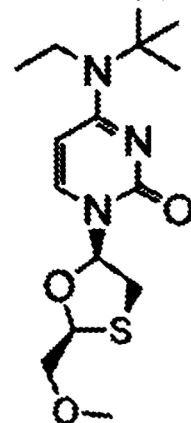
3tc-C7-1,3,3



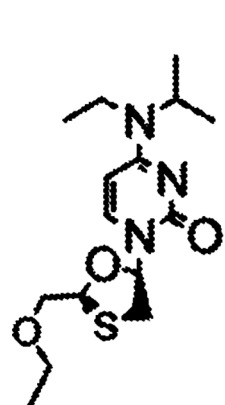
3tc-C7-1,2,4



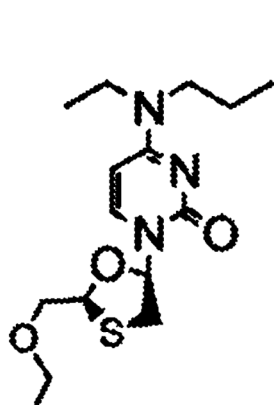
3tc-C7-1,2,4*



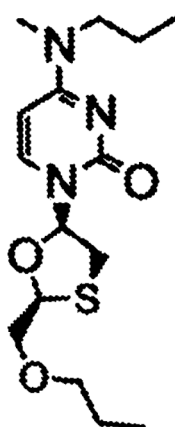
3tc-C7-1,2,4**



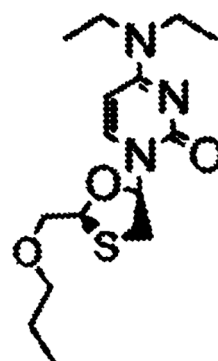
3tc-C7-2,2,3*



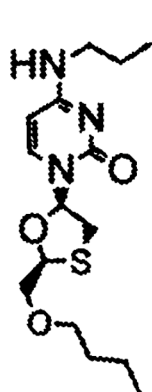
3tc-C7-2,2,3



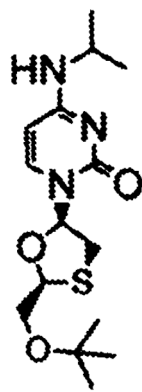
3tc-C7-3,1,3



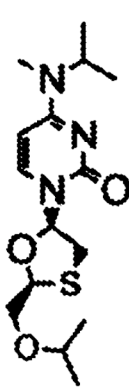
3tc-C7-3,2,2



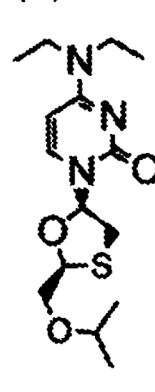
3tc-C7-4,0,3



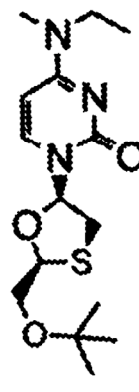
3tc-C7-4**,0,3



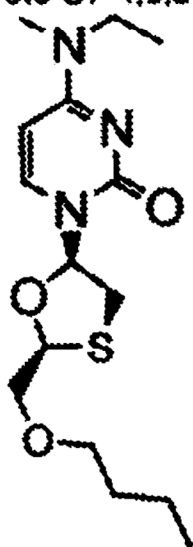
3tc-C7-3*,1,3*



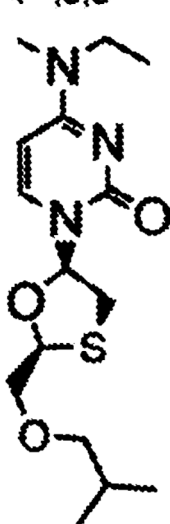
3tc-C7-3*,2,2



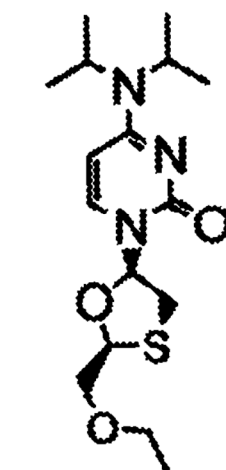
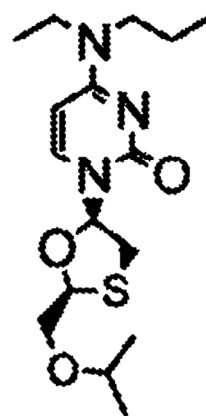
3tc-C7-4**,1,2



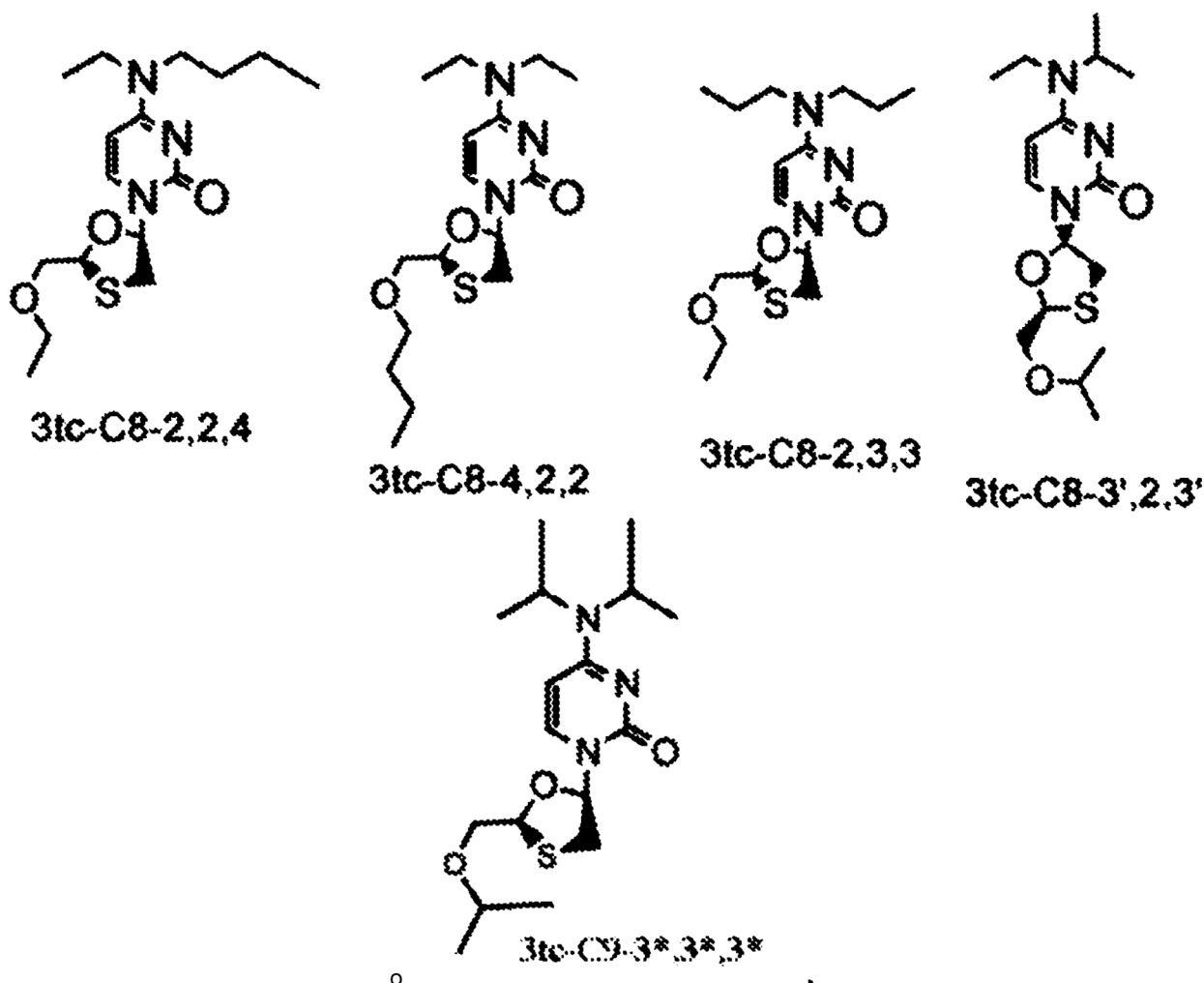
3tc-C7-4,1,2



3tc-C8-3',2,3



3tc-C8-2,3'3'



Además, la presente invención da a conocer utilizaciones de los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva, o cualquier combinación de los mismos, en la preparación o fabricación de una composición farmacéutica, tal como un fármaco y/o medicamento, especialmente una composición para el tratamiento del daño y/o degeneración de la retina en un mamífero. En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva, cualquier sal, en particular cualquier sal aceptable farmacéuticamente, cualquier solvato y/o cualquier derivado fisiológico de los mismos, junto con un vehículo aceptable farmacéuticamente.

En determinadas realizaciones, los procedimientos y las composiciones de la presente invención inhiben la enfermedad de injerto contra huésped, dolor crónico, vitreorretinopatía proliferativa, glaucoma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, trastorno bipolar, trastorno depresivo mayor, fibrosis renal, nefritis, fibrosis pulmonar, enfermedad de Huntington, osteoporosis, leucemia linfocítica crónica, trastornos de ansiedad, tuberculosis pulmonar, osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y pacientes con fracturas, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, dolor crónico inflamatorio y neuropático, enfermedad renal poliquística autosómica dominante, lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, dolor neuropático, hipertensión, venas varicosas, diabetes tipo I, diabetes tipo II, gota, hepatitis autoinmune, lesión vascular del injerto, aterosclerosis, trombosis, síndrome metabólico, inflamación de las glándulas salivales, lesión cerebral traumática, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, enfermedad de Parkinson, melanoma, neuroblastoma, cánceres de próstata, mama, piel y tiroides, cáncer gástrico temprano tubular, cáncer neuroendocrino, cáncer de colon mucosoide, cáncer de colon; carcinoma urotelial de alto grado, carcinoma de células claras de riñón, carcinoma de ovario indiferenciado, carcinoma de mama intraquístico papilar, septicemia gramnegativa, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Legionella spp.*, *Francisella spp.*, *Leishmania spp.* y *Chlamydia spp.* infecciosas, criopirinas, queratitis, acné vulgar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, resistencia a la insulina, obesidad, síndrome hemolítico-urémico, infección por virus polio, enfermedad renal por inmunocomplejos, lesión tubular aguda, nefritis lúpica, síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío, síndrome de Muckle-Wells y enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal, enfermedades autoinflamatorias cutáneas y articulares neurológicas infantiles crónicas, lesión por isquemia-perfusión renal, glomerulonefritis, crioglobulinemia, vasculitis sistémica, nefropatía por IgA, malaria, helmintiasis, choque séptico, asma alérgica, fiebre del heno, enfermedad pulmonar

obstructiva crónica, inflamación pulmonar inducida por fármacos, dermatitis de contacto, lepra, infección por *Burkholderia cenocepacia*, infección por virus respiratorio sincitial, psoriasis, esclerodermia, artritis reactiva, fibrosis quística, sífilis, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, esteatosis hepática no alcohólica, cirugía cardíaca (inflamación perioperatoria o posoperatoria), rechazo agudo y crónico al trasplante de órganos, rechazo agudo y crónico al trasplante de médula ósea, angiogénesis tumoral, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno del espectro autista (por ejemplo, a través del bloqueo por kamuvudina de P2X7, tal como se muestra en modelos de ratón de autismo) y/o cualquier combinación de los mismos.

Además, en algunas realizaciones, la presente invención da a conocer que la función no canónica de INTI, independiente de la terminación de la cadena, previene la ceguera dependiente de P2X7, la enfermedad de injerto contra huésped y/o la inflamación estéril. Por consiguiente, la presente invención se refiere, en determinadas realizaciones, a procedimientos para prevenir la ceguera dependiente de P2X7, la enfermedad de injerto contra huésped y/o la inflamación en un individuo mediante la administración de una cantidad eficaz de, como mínimo, un INTI, tal como los que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva, a un individuo que lo necesita.

Además, en determinadas realizaciones, los procedimientos y las composiciones de la presente invención inhiben (i) la activación del inflammasoma mediante el ARN Alu asociado con una célula; (ii) la inflamación mediante LPS/ATP, (iii) la activación del inflammasoma mediante LPS/ATP, (iv) la activación del inflammasoma inducida por nigericina y/o combinaciones de las mismas. Y, en algunas realizaciones, el inflammasoma se selecciona entre el grupo que consiste en un inflammasoma NLRP3 y/o un inflammasoma IL-1 beta. Además, algunas realizaciones de los procedimientos de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, las etapas de (i) bloquear la entrada a través de un receptor P2X7 asociado con una célula; (ii) reducir las especies reactivas del oxígeno mitocondriales provocadas por la expresión de ARN Alu; y/o (iii) reducir la permeabilidad celular inducida por ATP de una célula. Y una célula contemplada en la presente invención puede incluir, por ejemplo, una célula del EPR, una célula fotorreceptora retiniana, una célula coroidea o cualquier combinación de las mismas.

Además, los INTI son principios terapéuticos fundamentales para el VIH y bloquean la replicación de los retrovirus. El ARN *Alu*, un retroelemento endógeno que también requiere transcriptasa inversa (RT, del inglés reverse transcriptase) para su ciclo de vida, activa el inflammasoma NLRP3 para provocar la muerte de las células del epitelio pigmentario de la retina en la atrofia geográfica, que es la forma intratable de degeneración macular asociada con la edad que ciega a millones de personas. Además, los inventores de la presente invención han descubierto que los INTI, como clase, son novedosos inhibidores del inflammasoma NLRP3. Y, sorprendentemente, este efecto es independiente de la inhibición de la transcriptasa inversa.

En la presente memoria descriptiva se exponen los detalles de una o varias realizaciones del objeto dado a conocer en la presente invención. Las modificaciones de las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva, y otras realizaciones, serán evidentes para los expertos en la materia después de un estudio de la información dada a conocer en la presente memoria descriptiva. La información dada a conocer en la presente memoria descriptiva, y en particular los detalles específicos de las realizaciones de ejemplo dadas a conocer, se dan a conocer principalmente por motivos de claridad de comprensión y no se deben entender limitaciones innecesarias a partir de los mismos. En caso de conflicto, prevalecerá la especificación de la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

El objeto dado a conocer en la presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos, pero que no constituyen limitación. Los siguientes ejemplos pueden incluir compilaciones de datos que son representativos de los datos recopilados en diversos momentos durante el transcurso del desarrollo y la experimentación relacionados con la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Los inventores de la presente invención han descubierto que los INTI d4T, AZT, ABC y 3TC bloquean la activación de caspasa-1 mediante ARN *Alu*, al igual que 5'-metoxi-d4T, que no inhibe la transcriptasa inversa. Además, los inventores de la presente invención han descubierto que el AZT no se fosforila en células deficientes en timidina cinasa pero aún bloquea la secreción de interleucina-1 beta inducida por LPS/ATP; que los INTI bloquean la absorción de colorante YOPRO-1 dependiente de P2X7 y los modelos de ratón de atrofia geográfica, enfermedad de injerto contra huésped e inflamación estéril del hígado; y que los INTI son novedosos inhibidores del inflammasoma NLRP3 independientes de la inhibición canónica de la transcriptasa inversa. En consecuencia, los INTI están listos para su reutilización como fármacos en una variedad de enfermedades impulsadas por P2X7.

Se descubrió por primera vez que los INTI eran compuestos antivirales en 1974 (Ostertag et al., 1974) y se utilizan ampliamente para tratar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El mecanismo de acción canónico de los INTI es mediante la terminación de la cadena de la síntesis de ADN a partir de un molde de ARN viral, lo que interfiere con el ciclo de vida viral de los virus dependientes de la transcriptasa inversa.

La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las principales causas de ceguera en los ancianos en todo el mundo (Ambati et al., 2003; Ambati y Fowler, 2012). En la forma seca de la DMAE, más prevalente e intratable, la abundancia excesiva de ARN *Alu* no codificante provoca ceguera al inducir la muerte de las células del epitelio pigmentario de la retina (Dridi et al., 2012; Kaneko et al., 2011; Tarallo et al., 2012). Las secuencias *Alu* son retrotransposones no codificantes que, como el VIH, dependen de la transcriptasa inversa para su ciclo de vida (Batzner y Deininger, 2002; Dewannieux et al., 2003).

El ARN *Alu* media la muerte de las células del EPR a través de la activación de caspasa-1 y del inflammasoma NLRP3 (Tarallo et al., 2012). La presente invención da a conocer que un inhibidor de la transcriptasa inversa, tal como la estavudina (d4T; 2',3'-didesoxitimidina; Zerit, Bristol-Myers Squibb), que está aprobado por la FDA para el tratamiento del VIH, previene la escisión de la caspasa-1 para dar su forma activa de 20 kDa (Hentze et al., 2003; Yamin et al., 1996) en células primarias del EPR humanas (figura 34) y de ratón (figura 44) sin reducir los niveles de ARN *Alu* (figura 45). Además, la presente invención muestra que d4T también bloquea la fosforilación de IRAK4, una cinasa aguas abajo del adaptador MyD88 que media la muerte de células del EPR inducida por *Alu* (Tarallo et al., 2012), en células del EPR humanas y de ratón (figura 34 y figura 44). Los inventores de la presente invención también han descubierto que otros INTI, entre los que se incluyen los fármacos anti-VIH azidotimidina (AZT; 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina; Retrovir, ViiV Healthcare), lamivudina (3TC; 2',3'-didesoxicitidina; Zeffix, GlaxoSmithKline) y abacavir (ABC; un análogo de di-desoxiguanosina; Ziagen, ViiV Healthcare), también bloquean la escisión de caspasa-1 inducida por ARN *Alu* (figura 35).

Además, la presente invención da a conocer que d4T y AZT previenen la degeneración del EPR en el modelo de ratón de DMAE seca inducido por ARN *Alu* (Kaneko et al., 2011; Tarallo et al., 2012). Además, se ha descubierto que los ratones que recibieron la administración oral diaria de d4T bloquearon la degeneración del EPR después de la inyección subretiniana de un plásmido que expresa ARN *Alu* (figura 36), como hizo la administración intraperitoneal de AZT (figura 37).

Para analizar si la inhibición de la transcriptasa inversa era necesaria para el bloqueo del inflammasoma por d4T, se sintetizó una versión modificada con 5'-O-metilo de d4T (5'-OCH₃-d4T; me-d4T) (figura 20; figura 25, figura 36, figura 27, figura 28). Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a procedimientos para sintetizar una versión modificada con 5'-O-metilo de d4T, tal como la que se da a conocer en la presente memoria descriptiva.

Solo la versión trifosfato de los análogos nucleosídicos inhibe la transcriptasa inversa; la modificación con metilo en la posición 5' previene la fosforilación y, de este modo, la formación de trifosfato de nucleósido (Nykanen et al., 2001). Por consiguiente, como d4T, me-d4T también bloquea la activación de caspasa-1 en células del EPR humanas (figura 21).

Los inventores de la presente invención han confirmado que me-d4T no inhibe la transcriptasa inversa y, a diferencia de d4T sin modificar, me-d4T no bloquea la replicación del lentivirus (figura 22). Además, el metabolito trifosfato de los análogos de di-desoxinucleósidos provocó el agotamiento del ADN mitocondrial; y de acuerdo con la idea de que me-d4T no se fosforila, se ha descubierto que d4T, pero no me-d4T, reduce los niveles de ADNmt (figura 23). Me-d4T también previene la degeneración del EPR inducida por *Alu* en ratones (figura 24). Estos datos indican que d4T puede bloquear la activación de caspasa-1 y la degeneración del EPR independientemente de la inhibición de la transcriptasa inversa.

Además, los inventores de la presente invención también analizaron si los INTI bloqueaban la activación del inflammasoma por LPS/ATP, que no se sabe si señaliza a través de la transcriptasa inversa (Mariathasan et al., 2004; Mariathasan et al., 2006; Martinon et al., 2002). Se descubrió que d4T inhibía la maduración de caspasa-1 inducida por LPS/ATP en macrófagos primarios derivados de la médula ósea de ratón (figura 38), según se detecta mediante transferencia Western.

La caspasa-1 procesa directamente la interleucina-1 beta (IL-1 beta) tras la estimulación con LPS/ATP; d4T también bloquea la secreción de IL-1 beta madura en estas células (figura 39). Para determinar si la activación del inflammasoma inducida por LPS/ATP se puede inhibir sin la inhibición de la RT, los inventores de la presente invención utilizaron células deficientes en timidina cinasa (Raji/TK⁻) y que la expresan (Raji/TK⁺) (Balzarini et al., 1989). Después de la adición de AZT, las células TK⁺, pero no las TK⁻, los inventores de la presente invención produjeron AZT-trifosfato (AZT-TP), el metabolito de AZT necesario para la inhibición de la RT (figura 40; figura 46, figura 47, figura 48, figura 49, figura 50). Aunque AZT no estaba fosforilado en las células TK⁻, AZT todavía inhibía la maduración de interleucina-1 beta inducida por LPS/ATP (figura 41), lo que indica que AZT no inhibía la maduración de interleucina-1 beta mediante la inhibición de la transcriptasa inversa.

ARN *Alu* (Kerur et al., 2013) y LPS/ATP (Qu et al., 2011) activan el inflammasoma a través del receptor de ATP P2X7. Por lo tanto, los inventores de la presente invención plantearon la hipótesis de que d4T bloquea P2X7 o alguna ruta dependiente de P2X7. En primer lugar, se realizaron ensayos para determinar si d4T actúa aguas arriba de P2X7 modulando los niveles de ATP; sin embargo, d4T no bloquea la liberación de ATP a los medios de cultivo celular inducida por ARN *Alu* (figura 42).

A continuación, se realizaron ensayos para determinar si d4T antagoniza directamente la función de P2X7: tras la unión de ATP, el P2X7 de la superficie celular forma canales catiónicos no selectivos que median la activación del inflamasoma (Kahlenberg y Dubyak, 2004; Petrilli et al., 2007). Sin embargo, d4T no moduló significativamente la función del canal catiónico de P2X7, según se controla mediante análisis de registro electrofisiológico de fijación de voltaje ("patch clamp") de células HEK293 que expresaban el receptor P2X7 de ratón o rata (Humphreys et al., 2000).

Finalmente, la activación de P2X7 se asocia con la formación de un poro grande que es permeable a moléculas de hasta ~1.000 Da (Adinolfi et al., 2005; Cheewatrakoolpong et al., 2005; Surprenant et al., 1996). Se descubrió que d4T, y también AZT y 3TC, inhibieron la absorción dependiente de P2X7 del colorante fluorescente YO-PRO1 (P.M. Da) en la línea celular estable HEK293 que sobreexpresa P2X7 humana (figura 43) después de la adición del agonista selectivo de P2X7 bzATP.

De acuerdo con la idea de que los INTI bloquean la activación del inflamasoma mediada por P2X7 inducida por *Alu* a través de un mecanismo que implica la absorción de colorante, la activación de caspasa-1 inducida por ARN *Alu* se inhibió mediante un péptido pequeño que bloquea la absorción de colorante mediada por P2X7 y la activación del inflamasoma inducida por LPS/ATP, pero no el flujo de cationes (Pelegrin y Surprenant, 2006) (figura 51). Por otra parte, no se inhibió la activación de caspasa-1 inducida por *Alu* mediante calmidazolio, que bloquea selectivamente el flujo de cationes mediado por P2X7, pero no la absorción de colorante (figura 52).

Además, el extremo C-terminal intracelular de P2X7 gobierna la absorción de colorante asociada a P2X7, y una versión de d4T que no es permeable a las células (Agarwal et al., 2011) no bloquea la activación de caspasa-1 por ARN *Alu* (figura 53, figura 32). De acuerdo con el antagonismo en P2X7, o aguas abajo del mismo, pero aguas arriba de la disfunción mitocondrial, d4T bloquea la producción de ROS mitocondriales (ROSmt), que se producen con la estimulación de LPS/ATP (Adinolfi et al., 2005; Cruz et al., 2007; García-Marcos et al., 2005; Nakahira et al., 2011) y se midió la sobreexpresión de *Alu* (Tarallo et al., 2012) mediante el ensayo MitoSox (figura 54). Finalmente, d4T no previene la secreción de interleucina 1-beta independiente de P2X7 en células THP-1 sensibilizadas con PMA tratadas con urato monosódico cristalino (figura 11) (Martinon et al., 2006; Riteau et al., 2012).

Para explorar la relevancia terapéutica potencial de los INTI más allá del modelo de atrofia geográfica (GA, del inglés geographic atrophy) inducido por *Alu*, se planteó la hipótesis de que, si los INTI funcionan como inhibidores genéricos del inflamasoma, entonces podrían ser ampliamente útiles en otros modelos animales de enfermedad que también son impulsados por P2X7. En el modelo de enfermedad de injerto contra huésped impulsado por P2X7 y el inflamasoma NLRP3 (Jankovic et al., 2013; Wilhelm et al., 2010), el tratamiento de ratones que recibieron médula ósea y células T alógenas con d4T mostró una supervivencia mejorada en comparación con los controles tratados con solución salina (el 30-70 % frente al 0 %). Además, en el modelo de inflamación estéril impulsado por NLRP3 y P2X7 (McDonald et al., 2010), d4T redujo la migración de neutrófilos al foco de la lesión hepática.

Curiosamente, se ha demostrado que la función de poro dependiente de P2X7 por sí sola puede influir en el fenotipo (Sorge et al., 2012). Sin embargo, en la actualidad, no existen medicamentos aprobados por la FDA que se dirijan selectivamente a la señalización de P2X7 aguas abajo y no a la activación del canal iónico. Por lo tanto, los INTI podrían ser valiosos tanto clínica como experimentalmente en el direccionamiento selectivo de la función de P2X7.

Recientemente se ha propuesto un papel para P2X7 en la regulación de la replicación del VIH (Hazleton et al., 2012), y los pacientes con VIH tienen niveles plasmáticos de IL-18 elevados (Ahmad et al., 2002; Iannello et al., 2010), que disminuyen después del tratamiento con terapia antirretroviral altamente activa que contiene INTI (Stylianou et al., 2003). En particular, la reducción de los niveles plasmáticos de IL-18 mediante el tratamiento con INTI de pacientes infectados por VIH-1 no se asoció significativamente con la carga viral o el recuento de células T CD4⁺ (David et al., 2000), lo que indica que los INTI pueden disminuir los niveles de IL-18 antes de que se produzca la inhibición de la replicación viral. La maduración de IL-18 requiere la escisión de pro-IL18 por la caspasa-1 activa, que normalmente también requiere la activación de P2X7. De este modo, los procedimientos y experimentos de la presente invención son consistentes con la idea de que los INTI pueden modular la expresión de citocinas inducida por VIH independientemente de la inhibición de la transcriptasa inversa.

En algunas realizaciones, d4T previene la degeneración del EPR inducida por ARN *Alu* en ratones de tipo natural ("wild-type"). Tal como se muestra en la figura 1, la administración subretiniana de ARN *Alu* a ratones provoca la degeneración del EPR en un modelo de ratón de degeneración macular asociada con la edad. De hecho, tal como se muestra, el d4T coadministrado al humor vítreo de ratones de tipo natural previene la muerte de las células del EPR inducida por ARN *Alu* de una manera dependiente de la dosis una semana después de la administración. La fila superior de la figura 1 proporciona una fotografía del fondo ocular de ratones que recibieron tratamiento con PBS de control o ARN *Alu*, con o sin cantidades crecientes de d4T (de izquierda a derecha). Las flechas indican regiones despigmentadas de muerte de las células del EPR, que se revelan con la dosis más elevada de d4T. La fila inferior de la figura 1 muestra un montaje plano de EPR, teñido de rojo para las uniones intercelulares (ZO-1) que se rompen con la administración de ARN *Alu*, pero que se restauran a la morfología/uniones intercelulares del EPR sanas con la dosis más elevada de d4T.

Asimismo, en determinadas realizaciones, d4T protege contra la citotoxicidad inducida por el plásmido que expresa ARN Alu *in vitro*. La figura 2 muestra que las células humanas (HeLa) tratadas con un plásmido de expresión forzada para ARN Alu (pAluA) durante los periodos de tiempo indicados mostraron una viabilidad profundamente reducida en comparación con un plásmido nulo (pUC19), según se controla mediante el ensayo de proliferación MTS, y que la coadministración de d4T previno la muerte celular inducida por la sobreexpresión de Alu.

En algunas realizaciones de ejemplo, d4T no restablece la citotoxicidad mediante la reducción de los niveles de ARN Alu. Tal como se presenta en la figura 3, las células primarias del EPR humanas tratadas con oligonucleótidos antisentido dirigidos a DICER1 (Dcr as) (carril 3 (tercer carril desde la izquierda)) muestran niveles aumentados de ARN Alu en el compartimento nuclear en comparación con los oligonucleótidos antisentido de control (Ctr as) (carril 1 (más a la izquierda)), controlado mediante transferencia Northern utilizando una sonda específica de Alu. Asimismo, la coadministración de d4T (carriles 2 y 4) no reduce los niveles de ARN Alu. La figura 3 muestra u6 (fila inferior) como un control de carga para la fracción nuclear.

Además, en algunas realizaciones, d4T no reduce los niveles de ARN Alu. Por ejemplo, las células primarias del EPR humanas se pueden transfectar con ARN Alu, con o sin d4T (figura 4). Y, tal como se presenta en la figura 4, la coadministración de d4T no cambia los niveles de ARN Alu 1, 4 o 24 horas después de la transfección en la fracción nuclear, según se detecta mediante transferencia Northern utilizando una sonda específica de Alu. Se muestra U6 (fila inferior) como control de carga para la fracción nuclear en la figura 4.

La presente invención da a conocer además que, en algunas realizaciones, d4T inhibe la activación del inflammasoma mediante ARN Alu. De hecho, el ARN Alu provoca la activación del inflammasoma NLRP3, que está marcado por el procesamiento de la enzima caspasa-1, y la figura 5 proporciona una transferencia Western que muestra que el ARN Alu provoca la maduración de caspasa-1 en las células primarias del EPR humanas 24 horas después de la administración de Alu (parte superior, carril 2, banda inferior), que se bloquea mediante el tratamiento conjunto con d4T (100 μ M; carril 3). La fila inferior de la figura 5 es un control de carga de vinculina.

En determinadas realizaciones, 3TC inhibe la activación del inflammasoma mediante ARN Alu. De hecho, el ARN Alu provoca la activación del inflammasoma NLRP3, que está marcado por el procesamiento de la enzima caspasa-1. La figura 6 es una transferencia Western que muestra que el ARN Alu provoca la maduración de caspasa-1 en las células primarias del EPR humanas 24 horas después de la administración de Alu (parte superior, carril 2, banda inferior), que se bloquea con el tratamiento conjunto con 3TC (20-100 μ M; carril 3). En la parte inferior, se observa el control de carga, vinculina.

A continuación, la figura 7 proporciona evidencias de la inhibición mediante AZT, cordicepina y abacavir de la activación del inflammasoma mediante ARN Alu. De hecho, el ARN Alu provoca la activación del inflammasoma NLRP3, que está marcado por el procesamiento de la enzima caspasa-1. La figura 7 es una transferencia Western que muestra que el ARN Alu provoca la maduración de caspasa-1 en las células primarias del EPR humanas 24 horas después de la administración de Alu (parte superior, carril 2, banda inferior), que se bloquea con el tratamiento conjunto con azidotimidina (AZT), cordicepina y abacavir (ABC) (50-100 μ M; carriles 3-8). Nuevamente, la vinculina como control de carga se muestra en la parte inferior.

En determinadas realizaciones, la presente invención da a conocer que d4T inhibe la activación del inflammasoma por LPS/ATP. De este modo, la figura 8 proporciona un gel que muestra que las células primarias del EPR humanas tratadas con LPS/ATP, un activador del inflammasoma clásico, muestran una mayor activación de Casp-1 y fosforilación de IRAK4, que también es un marcador de la señalización del inflammasoma a través de la proteína adaptadora del receptor de superficie celular MyD88. Además, tal como se muestra en la figura 8, d4T (25/100 μ M) bloquea la activación de Casp-1 y la fosforilación de IRAK4 inducidas por LPS/ATP. El control de carga de la figura 8 es vinculina. Además, tal como se muestra, LPS y ATP activan el inflammasoma NLRP3 solo en combinación, por lo que el tratamiento con uno u otro solo es útil como control para este experimento.

La presente invención da a conocer además que, en realizaciones de ejemplo, d4T y otros INTI reducen la activación del inflammasoma por LPS/ATP. Tal como se presenta en la figura 9, d4T, 3TC y cordicepina (a 100 μ M), todos inhibidores di-desoxinucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhiben la activación de caspasa-1 (banda p20 activa, parte superior) y la maduración de IL-18 (parte inferior) inducidas por LPS/ATP. Para producir la figura 9, los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron después de (i) ningún tratamiento, (ii) tratamiento con LPS o (iii) tratamiento con LPS/ATP de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón, y se realizaron ensayos de transferencia Western con anticuerpos para caspasa-1 e IL-18.

En algunas realizaciones de la presente invención, d4T inhibe la activación del inflammasoma inducida por nigericina. Según la figura 10, d4T (100, 250 μ M) inhibe la maduración de IL-1 beta (parte superior, formas de 18 y 22 kDa) y la activación de caspasa-1 (banda p20 activa, parte inferior) inducidas por nigericina. Los sobrenadantes del cultivo celular se recogieron después de (i) ningún tratamiento, (ii) tratamiento con LPS o (iii) tratamiento con LPS/nigericina de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón, y se realizaron ensayos de transferencia Western con

anticuerpos para IL-1 beta y caspasa-1. La figura 10 muestra los resultados de estos esfuerzos.

Además, en algunas realizaciones, d4T no inhibe la secreción de IL-1 beta a partir de monocitos THP-1 diferenciados con PMA inducida por MSU. Los monocitos THP-1 humanos se diferenciaron en macrófagos con PMA. Tal como se muestra en la figura 11, el tratamiento con urato monosódico (MSU), un conocido activador del inflamasoma, aumentó la secreción de IL-1 beta en comparación con las células no tratadas, mientras que la coadministración de d4T en un intervalo de dosis (25-1000 μ M) no afectó significativamente a la secreción de IL-1beta. Además, d4T no bloquea la secreción de IL-1 beta inducida por MSU, según se determina mediante ELISA (n = 3-4).

En determinadas realizaciones, d4T y otros inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa no inhiben la secreción de IL-1 beta a partir de monocitos THP-1 diferenciados con PMA inducida por MSU. Para ilustrar esto, se diferenciaron monocitos THP-1 humanos en macrófagos con PMA. El tratamiento con MSU aumentó la secreción de IL-1 beta en comparación con las células no tratadas (figura 12). Asimismo, la coadministración de d4T, 3TC o cordicepina (todos son análogos di-desoxinucleotídicos) en un intervalo de dosis (25-1000 μ M) no afectó significativamente a la secreción de IL-1 beta, tal como se muestra en la figura 12.

A continuación, en algunas realizaciones, d4T reduce la sensibilización de NLRP3 inducida por ARN Alu. Tal como se proporciona en el gráfico de barras de la figura 13, la transfección de ARN Alu aumenta los niveles de ARNm de NLRP3 en células primarias del EPR humanas a las 16 horas, un evento denominado "sensibilización" (eje Y) en comparación con el control (solo reactivo de transfección). Este efecto se atenúa por la coadministración de d4T (100 μ M) y se normaliza al control de ARN 18S.

Además, en realizaciones de ejemplo de la presente invención, d4T reduce la sensibilización de IL-1beta inducida por ARN Alu. La figura 14 ilustra que la transfección de ARN Alu aumenta los niveles de ARNm de IL-1 beta en células primarias del EPR humanas a las 24 horas, un evento denominado "sensibilización" (eje Y) en comparación con el control (solo reactivo de transfección). Este efecto se atenúa por la coadministración de d4T (100 μ M) y se normaliza al control de ARN 18S.

Asimismo, en algunas realizaciones, d4T reduce las ROS mitocondriales provocadas por la expresión de Alu. La figura 15 demuestra que la expresión forzada de Alu (pAluA) provoca un aumento de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales (ROSmt), según se detecta mediante el ensayo MitoSox. Para producir la figura 15, se incubaron células primarias del EPR humanas con plásmido de expresión de Alu o plásmido de control (pUC19), con o sin d4T. Después de 15 horas, las células se tiñeron conjuntamente para ROSmt (rojo) y para el recuento celular y nuclear (azul; tinción de ADN de Hoechst). Las células del grupo pAluA exhibieron una mayor tinción de ROSmt (rojo) en comparación con el control pUC19, un efecto que se reduce en las células tratadas con pAluA+d4T.

Y en realizaciones adicionales, d4T no inhibe la liberación de ATP inducida por ARN Alu (figura 16). Las células primarias del EPR humanas tratadas con ARN Alu durante los tiempos indicados liberan ATP. Para proporcionar la figura 16, el sobrenadante del cultivo celular se recogió de células tratadas con ARN de control o Alu, con o sin d4T. El ATP se detectó utilizando un ensayo de luciferasa dependiente de ATP. Y, en particular, d4T no afectó a la liberación de ATP.

En determinadas realizaciones, d4T reduce la permeabilidad celular inducida por ATP a Yo-Pro1 (ensayo del receptor P2X7), tal como se muestra en la figura 17. Para preparar la figura 17, las células THP-1 diferenciadas en macrófagos por PMA permitieron la entrada del colorante fluorescente grande Yo-Pro 1, en un ensayo de actividad del receptor P2X7. Se observó que d4T reducía de forma dependiente de la dosis la entrada de Yo-Pro inducida por ATP, determinada por una medición fluorescente de barrido de área en un lector de microplacas de 96 pocillos. De hecho, la figura 17 proporciona los resultados de la medición de fluorescencia en unidades de fluorescencia relativa (UFR, eje y).

Además, se ha demostrado que d4T reduce los niveles de potasio extracelular que aumentan después de la transfección de ARN Alu (figura 18). Los niveles de potasio del cultivo celular aumentan en las células primarias del EPR humanas tratadas con ARN Alu durante 6 horas, un efecto que se reduce mediante la coadministración de d4T. Para la figura 18, los niveles de potasio se determinaron espectrofotométricamente en los sobrenadantes del cultivo celular utilizando un ensayo de piruvato cinasa dependiente de potasio.

A continuación, en algunas realizaciones, d4T bloquea la permeabilidad celular inducida por bzATP a Yo-Pro 1 (ensayo del receptor P2X7), tal como se muestra en la figura 19, d4T bloqueó la entrada de yoduro de YO-PRO-1 en células HEK293 que expresan de manera estable el receptor P2X7 humano, estimulado con el agonista bzATP selectivo de P2X7. Las células se preincubaron con d4T durante 30 minutos antes de la adición de bzATP/YO-PRO, y se midió la fluorescencia a 485/515 nm a t = 30 minutos.

Además, d4T bloquea la degeneración del EPR inducida por *Alu* y la activación de caspasa-1 independientemente de la inhibición de la transcriptasa inversa.

En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un compuesto que tiene la estructura o estructuras proporcionadas en la figura 20. La figura 20 incluye una estructura química de metoxi-d4T (me-d4T) y de d4T. Tal como se muestra en la figura 20, los inventores de la presente invención han diseñado una única sustitución del grupo hidroxilo en 5' de la ribosa por un grupo metoxilo (encerrado en un círculo) para prevenir la fosforilación de d4T. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende una única sustitución de un grupo hidroxilo en 5' de la ribosa por un grupo metoxilo. Y, en algunas realizaciones, la presente invención da a conocer compuestos que comprenden un grupo metoxilo en lugar de un grupo hidroxilo en 5' de la ribosa para prevenir la fosforilación, tal como la fosforilación de d4T.

La presente invención da a conocer además los resultados de experimentos adicionales en la figura 21-figura 23. La figura 21 es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu* ± me-d4T; la figura 22 muestra células, en las que d4T sin modificar, pero no me-d4T, bloquea la replicación de un lentivirus que expresa GFP en células HeLa; y la figura 23 proporciona un gráfico que ilustra que d4T sin modificar, pero no me-d4T, reduce los niveles de ADNmt (normalizados a la secuencia de unión exón-intrón del ADN cromosómico) en células primarias del EPR de ratón, según se determina mediante PCR cuantitativa en tiempo real. $n = 4$, $^*p < 0,05$ mediante la prueba de la *t* de Student.

En algunas realizaciones, se ha demostrado que Me-d4T (inyección intraperitoneal) previene la degeneración del EPR inducida por *Alu* en ratones. La figura 24, fila superior, proporciona preparaciones planas teñidas para la zona de oclusión-1 (ZO-1; rojo), fila inferior. La degeneración se destaca en la figura 24 mediante puntas de flecha azules. Se muestran imágenes representativas de $n = 4$.

Asimismo, la figura 25 proporciona una descripción esquemática de la síntesis de me-d4T, y la figura 26 es un cromatograma de HPLC del producto final me-d4T (pico nº 6), $> 97\%$ de pureza. Y la figura 27 es una espectroscopia de ^1H -RMN del producto final me-d4T, en la que los desplazamientos químicos son coherentes con la estructura, y la figura 28 proporciona los resultados de la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas del producto final me-d4T, relación m/z consistente con la estructura.

La figura 29, la figura 30 y la figura 31 proporcionan variantes metoxi de análogos nucleosídicos. Específicamente, la figura 29 muestra la estructura química de 3TC (2',3'-didesoxicitidina); la figura 30 proporciona la estructura química de AZT (3'-azido-2',3'-didesoxitimidina); y la figura 31 muestra la estructura química de ABC (ciclopropilaminopurinilciclopenteno). En cada una de las figuras 29-31, la variación metoxi (grupo O-metilo) del análogo nucleosídico está encerrada en un círculo. Además, la figura 32 muestra una variante de permeabilidad celular de d4T (IC-d4T), en la que el grupo "n" es igual a 11. Los derivados incluyen variantes de permeabilidad celular de 3TC, AZT, ABC, en los que el grupo de base nitrogenada (encerrado en un círculo) puede estar sustituido, en varias realizaciones, por 3TC, AZT, ABC o variantes metoxi de d4T, 3TC, AZT, ABC (figuras 29-31), o derivados de los mismos.

Asimismo, la figura 33 proporciona la estructura química de un INTI de ejemplo, según la presente invención.

En determinadas realizaciones, la presente invención da a conocer que los INTI bloquean la degeneración del EPR y/o la activación de caspasa-1 inducidas por *Alu*. Por ejemplo, la figura 34 muestra una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) y la fosforilación de IRAK4 en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu* ± d4T. La figura 35 es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 en células del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu* ± INTI (3TC, AZT, ABC). La figura 36 muestra que p*Alu* provoca la degeneración del EPR, que se previene mediante la administración oral de d4T, y la figura 37 muestra que p*Alu* provoca la degeneración del EPR, que se previene mediante la administración intraperitoneal de AZT. La figura 36 y la figura 37 incluyen fotografías del fondo ocular: fila superior; preparaciones planas teñidas para zona de oclusión-1 (ZO-1; rojo), fila inferior. La degeneración está destacada por puntas de flecha azules. Barras de escala, 50 μm .

Las figuras 38-41 ilustran que los INTI bloquean la activación del inflammasoma inducida por LPS/ATP. Las figuras 38 y 39 muestran que d4T bloqueó la activación de caspasa-1 (figura 38) e IL-1 beta (figura 39) en macrófagos primarios derivados de médula ósea de ratón tratados con LPS/ATP, según se determina mediante transferencia Western del medio de cultivo y del lisado celulares. Además, la figura 40 presenta cromatogramas que muestran que las células Raji TK⁺, pero no las células Raji TK⁻, fosforilan AZT a AZT-trifosfato (AZT-TP), según se determina mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). Y la figura 41 muestra que AZT bloquea la activación de IL-1 beta por LPS/ATP en células Raji TK⁺ y TK⁻, según se determina mediante transferencia Western de lisados celulares. En cada una de las figuras 38-41 se proporcionan imágenes representativas de $n = 3-4$ experimentos.

En algunas realizaciones, la presente invención da a conocer que los INTI bloquean selectivamente la función de poro de P2X7 y los modelos impulsados por P2X7 de rechazo del injerto e inflamación estéril del hígado, tal como se muestra en las figuras 42-43. La figura 42 es un gráfico de barras que ilustra que d4T no bloquea la liberación de ATP inducida por *Alu* a partir de células primarias del EPR humanas ($n = 4$). Asimismo, la figura 43 es una ilustración gráfica que muestra que los INTI bloquean selectivamente la función de poro de P2X7 y los modelos impulsados por

P2X7 de rechazo del injerto e inflamación estéril del hígado, proporcionando un gráfico de la fluorescencia (% de bzATP) a lo largo del tiempo (minutos).

Y, en determinadas realizaciones de ejemplo, la presente invención da a conocer que d4T bloquea la activación de caspasa-1 sin reducir los niveles de ARN *Alu*. Por consiguiente, la figura 44 proporciona una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) y la fosforilación de IRAK4 en células primarias del EPR de ratón transfectadas con ARN *Alu* ± d4T. Y la figura 45 presenta una transferencia Northern de células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu* marcadas con biotina-UTP. En particular, en la figura 45, d4T no redujo los niveles de ARN *Alu* (normalizados al ARN de u6).

A continuación, las figuras 46-47 proporcionan espectros de LC-MS/MS de AZT-trifosfato (AZT-TP, compuesto objetivo; figura 46) y AZU-trifosfato (AZU-TP, patrón interno; figura 47). Y las figuras 48-49 muestran la separación cromatográfica de células Raji TK⁺ con adiciones conocidas de AZT-TP (figura 48) y AZU-TP (figura 49) con espectros de MS (recuadros) para confirmar la identidad de los picos designados.

La **figura 50** es una curva de calibración de los patrones de AZT-TP (círculo negro). Las muestras de Raji TK⁺ tratadas con AZT produjeron AZT-TP (triángulos blancos), mientras que AZT-TP no fue detectable en células Raji TK⁺ tratadas con AZT. La figura 50 es representativa de dos experimentos.

Las **figuras 51-54** muestran que, en algunas realizaciones de ejemplo, la función de poro dependiente de P2X7 media la activación de caspasa-1 inducida por *Alu*. De hecho, la figura 51 es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*, con péptido corto (Panx1¹⁰), que bloquea la función de poro de P2X7 pero no el flujo de cationes (frente al péptido desordenado: Scr Panx1¹⁰); la figura 52 es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias de EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*, con calmidazolol (la figura 32 proporciona la estructura química de los IC-d4T y EC-d4T utilizados), que bloquea el flujo de cationes de P2X7 pero no la función de poro; y la figura 53 es una transferencia Western de la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*, con d4T permeable a las células (IC), impermeable a las células (EC) o sin modificar (sin etiqueta). Además, la **figura 54** muestra que d4T previene la generación de ROS mitocondriales inducida por pAlu en células primarias del EPR humanas. En la figura 54, las especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales se visualizaron con MitoSox (rojo) y los núcleos celulares con Hoechst (azul).

Se estudió la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del epitelio pigmentario de la retina (EPR) humanas en presencia de citrato de amonio y hierro (III). La adición de TM-3TC (estructura 8) (25 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por hierro, tal como se refleja en la transferencia Western que se muestra en la figura 55. La adición de 2me-d4T (estructura 4) (25 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por hierro, tal como se refleja en la transferencia Western que se muestra en la figura 57.

Se estudió la activación de caspasa-1 (subunidad p10) en células primarias del EPR humanas en presencia de citrato de amonio y hierro (III). La adición de d4T-eno (estructura 3) (25 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por hierro, tal como se refleja en la transferencia Western expuesta en la figura 56.

Se estudió la activación de caspasa-1 (subunidad p20) en células primarias del EPR humanas transfectadas con ARN *Alu*. La adición de d4T-eno (estructura 3) y TM-3TC (estructura 8) (25 y 100 μM) bloqueó la activación de caspasa-1 inducida por *Alu*, tal como se refleja en la transferencia Western expuesta en la figura 58.

Se estudió la cantidad relativa de ADNmt en células primarias del EPR humanas tratadas con INTI o derivados (50 μM para cada uno) utilizando un tratamiento con vehículo (DMSO) ("No Tx") como control. El ADN se recogió después de cuatro días en cultivo celular con exposición al fármaco. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para el ADNmt y se normalizó a la secuencia del ADN genómico. Tal como se refleja en la figura 59, las versiones modificadas de d4T que no están fosforiladas (por ejemplo, Me-d4T (figura 20), 2me-d4T (estructura 4)) no muestran agotamiento del ADNmt en comparación con los INTI originales (d4T). TM-3TC es la estructura 8. Tal como se refleja en la figura 60, las versiones modificadas de AZT que no están fosforiladas (me-AZT (estructura 1), N-Me-Me-AZT (estructura 10)) no exhiben agotamiento del ADNmt en comparación con el compuesto original (AZT).

Se realizaron estudios en ratones para estudiar el tratamiento con INTI o derivados. Los ratones que recibieron el plásmido de vector vacío de control subretiniano (pNull), o el plásmido que expresa ARN *Alu* (pAlu), se trataron por vía intraperitoneal con INTI modificados dos veces al día (me-AZT (estructura 1), N-me-me-AZT (estructura 10) o 2 me-d4T (estructura 4); 25 mg/kg/administración) o vehículo de control. La fila superior de la figura 61 muestra fotografías del fondo ocular de los ratones. La fila inferior de la figura 61 muestra preparaciones planas de EPR, teñidas de rojo para las uniones intercelulares (ZO-1) que se rompen con la expresión de ARN *Alu*, pero que se restauran a la morfología uniones intercelulares del EPR sanas con el tratamiento con INTI modificado.

Una descripción esquemática de la síntesis de la fórmula I (estructura C en el esquema 1), la fórmula IV (estructura

B), la fórmula VIII (estructura E), la fórmula X (estructura D) y metoxi-d4T (estructura A; también la figura 20) se muestra en la figura 62. El procedimiento de síntesis general es el siguiente: se añadió NaH (15 mmol) a una suspensión de nucleótido (1,5 mmol) en THF seco (5 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió yoduro de metilo (15 mmol) en una porción a la mezcla y se agitó durante 1-3 h. Se comprobó la finalización de la reacción mediante TLC y se inactivó mediante la adición gota a gota de metanol. La mezcla se neutralizó con ácido acético y se evaporó. El residuo se suspendió en diclorometano y se lavó con una solución acuosa de NaHSO₃, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente. El producto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida utilizando gel de sílice y metanol al 2 % en diclorometano. Las estructuras de los derivados se confirmaron mediante LCMS y espectroscopía ¹H-RMN.

Estructura A) rendimiento de 200 mg (56 %). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO) 11,31 (s, 1H, NH), 7,50 (d, 1H, 6-H), 6,82 (dd, 1H, T-H), 6,42 (dd, 1H, 3'-H), 5,91 (dd, 1H, 2'-H), 4,88 (s, 1H, 4'-H), 3,56 (m, 2H, 5'-H), 3,28 (s, 3H, OCH₃), 1,75 (s, 3H, CH₃).

Estructura B) 67 mg (18,7 %). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO) 7,56 (s, 1H, 6-H), 6,88 (dt, 1H, 1'-H), 6,43 (dd, 1H, 3'-H), 5,90 (d, 1H, 2'-H), 4,89 (s, 1H, 4'-H), 3,56 (m, 2H, 5'-H), 3,27 (s, 3H, OCH₃), 3,18 (s, 3H, NCH₃), 1,8 (s, 3H, CH₃).

Estructura C) El rendimiento a escala de 1 g fue de 0,4 g sólidos (36 %). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO) 11,31 (s, 1H, NH), 7,56 (d, 1H, 6-H), 6,88 (dt, 1H, 1'-H), 6,43 (dd, 2H, 3'-H), 5,91 (m, 2H, 2'-H), 4,89 (s, 1H, 4'-H), 6,43 (dd, 1H, 3'-H), 5,91 (d, 2H, 2'-H), 4,89 (s, 1H, 4'-H), 3,55 (t, 2H, 5'-H), 3,27 (s, 3H, OCH₃), 3,18 (s, 3H, NCH₃), 1,8 (d, 3H, CH₃).

Estructura D) aceite (0,5 g, 46 %). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO) 7,56 (d, 1H, 6-H), 6,88 (dt, 1H, 1'-H), 6,43 (dd, 2H, 3'-H), 5,91 (m, 2H, 2'-H), 4,89 (s, 1H, 4'-H), 6,43 (dd, 1H, 3'-H), 5,91 (d, 2H, 2'-H), 4,89 (s, 1H, 4'-H), 3,55 (t, 2H, 5'-H), 3,27 (s, 3H, OCH₃), 3,18 (s, 3H, NCH₃), 1,8 (d, 3H, CH₃).

Estructura E) La reacción se completó en una hora. Rendimiento de 0,224 g (55 %). ¹H-RMN (500 MHz, DMSO) 7,81 (d, 1H, H6), 6,23 (t, 1H, H4'), 6,09 (d, 1H, H5), 5,31 (t, 1H, H2'), 3,70 (m, 2H, H6'), 3,43 (dd, 1H, H5'b), 3,34 (s, 3H, OCH₃), 3,08 (dd, 1H, H5'a), 3,04 (s, 6H, N(CH₃)₂).

Ejemplo 2

En este ejemplo, se estudian las estructuras de los INTI únicos, también denominados "kamuvudinas". En la presente memoria descriptiva se da a conocer un procedimiento para la síntesis de estas kamuvudinas. También se proporcionan datos de RMN y espectrometría de masas para estas kamuvudinas y datos sobre la actividad biológica de las kamuvudinas.

Síntesis de kamuvudinas 5'-O-alkil sustituidas y di-alkil sustituidas

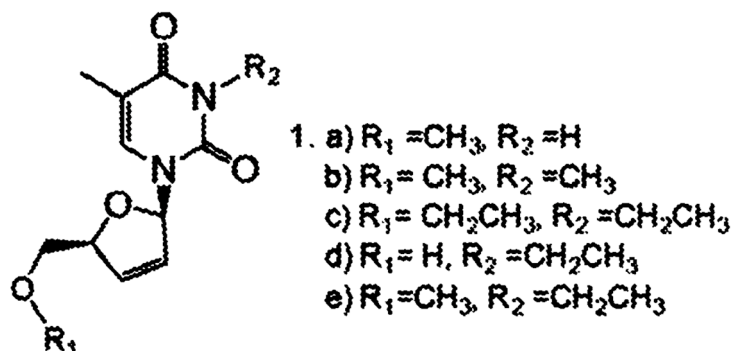
Se añadió NaH (4,5 mmol) a una suspensión de nucleótido (1,5 mmol) en THF seco (5 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió yoduro de alquilo (4,5 mmol) en una porción a la mezcla y se agitó durante 1-3 h. Se comprobó la finalización de la reacción mediante TLC y se inactivó mediante la adición gota a gota de metanol. La mezcla se neutralizó con ácido acético y se evaporó. El residuo se suspendió en diclorometano y se lavó con una solución acuosa de NaHSO₃, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente. El producto se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida utilizando gel de sílice utilizando acetato de etilo/hexano como disolvente. Las estructuras de los derivados se confirmaron mediante LCMS y espectroscopía de ¹H-RMN.

Síntesis de kamuvudinas asimétricas disustituidas.

A) Síntesis de nucleósidos N-sustituídos. Se añadió NaH (1,5 mmol) a una suspensión de nucleótido (1,5 mmol) en diclorometano (5 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió yoduro de alquilo (1,5 mmol) en una porción a la mezcla y se agitó durante 1-3 h. Se comprobó la finalización de la reacción mediante TLC. Se lavó el extracto con solución saturada de cloruro sódico y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el solvente y se purificó el producto N-sustituído mediante cromatografía ultrarrápida.

B) Se añadió NaH (1,5 mmol) a una suspensión de nucleótido N-sustituído (1,5 mmol) en diclorometano (5 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió yoduro de alquilo (1,5 mmol) en una porción a la mezcla y se agitó durante 1-3 h. Se comprobó la finalización de la reacción mediante TLC. Se lavó el extracto con solución saturada de cloruro sódico y se secó con sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el solvente y se purificó el producto N-sustituído mediante cromatografía ultrarrápida.

Datos de RMN y espectrometría de masas para las kamuvudinas



1. a) O-Me-d4T

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,37 (s, 1H), 7,26 (c, $J = 1,3$ Hz, 1H), 6,85 (dt, $J = 3,6, 1,7$ Hz, 1H), 6,44 (dt, $J = 6,0, 1,6$ Hz, 1H), 6,05 (dt, $J = 6,1, 1,8$ Hz, 1H), 5,04 (s, 1H), 4,41 (t, $J = 2,7$ Hz, 2H), 3,17 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H), 1,75 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H). MS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Masa calculada $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+ = 261,23$, encontrada = 261,2.

1. b) 2-Me-d4T

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,56 (c, $J = 1,2$ Hz, 1H), 6,89 (ddd, $J = 3,4, 1,9, 1,4$ Hz, 1H), 6,44 (dt, $J = 6,0, 1,8$ Hz, 1H), 5,91 (ddd, $J = 6,0, 2,5, 1,4$ Hz, 1H), 4,96-4,83 (m, 1H), 3,60-3,52 (m, 2H), 3,28 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,08 (s, 2H), 1,81 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H). MS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Masa calculada $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+ = 275,28$, encontrada 275,2.

1. c) 2-Et-d4T

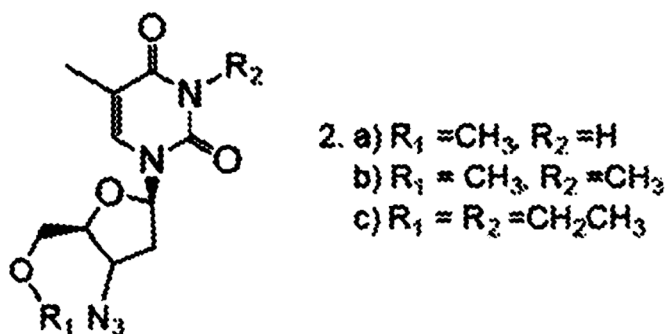
^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,50 (t, $J = 1,3$ Hz, 1H), 6,89 (dc, $J = 3,4, 1,5$ Hz, 1H), 6,44 (dt, $J = 5,9, 1,6$ Hz, 1H), 5,93 (ddt, $J = 6,0, 2,5, 1,4$ Hz, 1H), 4,90 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 3,93-3,78 (m, 2H), 3,59 (td, $J = 3,1, 1,3$ Hz, 2H), 3,45 (ct, $J = 7,0, 1,5$ Hz, 3H), 1,80 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H), 1,10 (tdd, $J = 7,0, 5,2, 1,3$ Hz, 6H). MS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Masa calculada $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+ = 303,3$, encontrada 303,2

1. d) N-Et d4T

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,69 (c, $J = 1,2$ Hz, 1H), 6,89 (dt, $J = 3,4, 1,7$ Hz, 1H), 6,41 (dt, $J = 6,0, 1,8$ Hz, 1H), 5,92 (ddd, $J = 6,0, 2,4, 1,4$ Hz, 1H), 5,01 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H), 4,84-4,75 (m, 1H), 3,85 (cd, $J = 7,1, 1,8$ Hz, 2H), 3,60 (dd, $J = 5,3, 3,4$ Hz, 2H), 1,78 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H), 1,09 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). MS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Masa calculada $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+ = 275,28$, encontrada 275,2

1. c) O-Me N-Et d4T

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,55 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 6,90 (dt, $J = 3,3, 1,7$ Hz, 1H), 6,45 (dt, $J = 6,0, 1,7$ Hz, 1H), 5,93 (ddd, $J = 6,1, 2,3, 1,4$ Hz, 1H), 4,91 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H), 3,91-3,81 (m, 2H), 3,56 (dd, $J = 3,1, 1,5$ Hz, 2H), 3,28 (s, 3H), 1,81 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H), 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H). MS (ESI): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Masa calculada $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}^+ = 289,31$, encontrada 289,2.



2. a) O-Me-AZT

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,30 (s, 1H), 7,50 (c, $J = 1,1$ Hz, 1H), 6,82 (dt, $J = 3,3, 1,6$ Hz, 1H), 6,41 (dt, $J = 6,1, 1,7$ Hz, 1H), 5,91 (ddd, $J = 6,2, 2,5, 1,3$ Hz, 1H), 4,93-4,77 (m, 1H), 3,55 (d, $J = 3,1$ Hz, 2H), 3,28 (s, 3H), 1,75 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H). EM (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4^+$, calculada 282,26, encontrada 282,2

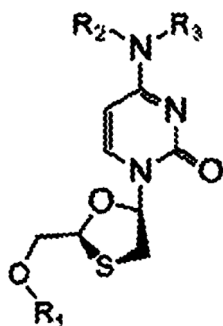
2. b) 2-Me-AZT

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,63 (c, $J = 1,2$ Hz, 1H, H6), 6,15 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, H1'), 4,43 (dt, $J = 7,3, 5,4$ Hz, 1H, H3'), 3,97 (dt, $J = 5,1, 4,1$ Hz, 1H, H4'), 3,67-3,50 (m, 2H, H5'), 3,35 (s, 3H, OCH₃), 3,17 (s, 3H, NCH₃), 2,46-2,27 (m, 2H, H2'), 1,85 (d, $J = 1,2$ Hz, 3H, CH₃).

EM (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₁₂H₁₈N₅O₄⁺, calculada = 296,29, encontrada 296,2

2. c) 2-Et-AZT

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,62 (t, $J = 1,2$ Hz, 1H, H6), 6,16 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, H1'), 4,43 (c, $J = 5,8$ Hz, 1H, H3'), 3,96 (c, $J = 4,4$ Hz, 1H, H4'), 3,83 (c, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,68-3,55 (m, 2H, H5'), 3,55-3,44 (m, 2H), 2,37 (dp, $J = 20,5, 7,0$ Hz, 2H, H2'), 1,84 (d, 1,2 Hz, 3H, CH₃), 1,15 (td, $J = 7,0, 1,1$ Hz, 3H), 1,08 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), EM (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₁₄H₂₂N₅O₄⁺, calculada = 324,35, encontrada 324,2.



3. a) $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{CH}_3$

b) $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{CH}_2\text{CH}_3$

3. a) 3-Me-3TC

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) 67,82 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,23 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 6,09 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 5,31 (t, $J = 4,7$ Hz, 1H), 3,77-3,65 (m, 2H), 3,44 (dd, $J = 11,7, 5,5$ Hz, 1H), 3,34 (s, 3H), 3,09 (dd, $J = 11,7, 4,9$ Hz, 1H), 3,05 (s, 6H). EM (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₁₁H₁₈N₃O₃S⁺, calculada 272,34, encontrada 272,2

3. b) 3-Et-3TC

^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,89-7,77 (m, 1H), 6,22 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 6,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 5,29 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 3,74 (d, $J = 4,7$ Hz, 2H), 3,60-3,48 (m, 4H, CH₂), 3,32 (s, 2H), 3,10 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 1,18-1,01 (m, 9H, CH₃), EM (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₁₄H₂₄N₃O₃S⁺, calculada 314,41, encontrada 314,4

Características de los INTI y las kamuvudinas

En algunas realizaciones, en comparación con los INTI originales (d4T, 3TC, AZT), las kamuvudinas (INTI modificados) tienen características similares a fármacos más deseables. Por ejemplo, con referencia a la tabla 1 a continuación, en comparación con los INTI, las kamuvudinas tienen valores de LogP mayores (mayores de 0 y cercanos a 1) y menor solubilidad en agua. Durante ciertos tipos de liberación de compuestos, tal como en un sistema de administración intraocular de fármacos de liberación sostenida, los mayores valores de LogP y la menor solubilidad de las kamuvudinas proporcionan mayores tiempos de residencia (es decir, semividas más largas) en el humor vítreo y la retina, en comparación con los INTI originales.

TABLA 1

Nombre	LogP	Solubilidad (mg/ml)
d4T	-0,23	106
Me-d4T	0,41	30
2Me-d4T	0,63	10
2Et-d4T	1,35	0,09
O-Me, N-Et-d4T	0,99	1,5
3TC	-1,1	64
TM-3TC	0,09	7
3Et-3TC	1,16	1,6
AZT	-0,41	16
2Me-AZT	0,45	0,94
2Et-AZT	1,17	0,01
LogP: Coeficiente de reparto en 1-octanol		
Solubilidad en agua, pH 7,2 a 37 °C.		

Eficacia de los INTI y las kamuvudinas en las células

- 5 Con referencia a las figuras 64-73 y 74-78, los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva inhiben la activación de caspasa-1. La caspasa-1 es la enzima que se encuentra en el núcleo del complejo del inflammasoma y es una importante señal de respuesta al peligro y mediadora de la muerte de las células del EPR en la DMAE. Las figuras 64-73 muestran que las kamuvudinas inhiben de forma dependiente de la dosis la caspasa-1, según se determina mediante el ensayo de luminiscencia iGluC en células J774 iGluC de ratón. Es importante
10 destacar que hubo alguna diferencia entre los compuestos individuales en cuanto a la curva de respuesta a la dosis, lo que enfatiza la necesidad de analizar cada compuesto (con uno o varios grupos R únicos) individualmente. Además, las kamuvudinas exhibieron una inhibición incompleta y variable de la activación de caspasa-1, lo que también sugiere que existen diferencias en la actividad de los compuestos dentro de la clase de kamuvudinas.
- 15 Para obtener los datos expuestos en las figuras 64-73, se realizó un ensayo iGluC (modificado de Bartok et al. iGluC: a luciferase-based inflammasome and protease activity reporter. Nature Methods 2013; 10(2):147-54). Brevemente, se sembraron 100.000 células iGluC por pocillo en una placa de 96 pocillos durante toda la noche. A la mañana siguiente, se aspira el medio de la placa y se reemplaza por 75 µl de DMEM sin scrum con fármacos (INTI o INTI modificados) durante 30 min. Después de 30 minutos de exposición al fármaco, se añade ATP 20 mM (25 µl)
20 hasta una concentración final de 5 mM. Se recogen 50 µl de medio de cada pocillo y se añaden 50 µl de coelenterazina 4,4 µM a cada muestra, y se lee la luminiscencia inmediatamente.

La **figura 64** muestra que 3TC inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGluC de ratón. La exposición a 3TC (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 65** muestra que 3Me-3TC inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGluC de ratón. La exposición a 3Me-3TC (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 66** muestra que 3Et-3TC inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGluC de ratón. La exposición a 3Et-3TC (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 67** muestra que AZT inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGluC de ratón. La exposición a AZT (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la

dosis. N = 3.

La **figura 68** muestra que 2Me-AZT inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGLuc de ratón. La exposición a 2Me-AZT (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 69** muestra que 2Et-AZT inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGLuc de ratón. La exposición a 2Et-AZT (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 70** muestra que d4T inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGLuc de ratón. La exposición a d4T (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 71** muestra que O-Me N-Et d4T inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGLuc de ratón. La exposición a O-Me N-Et d4T (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 72** muestra que Me-d4T inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGLuc de ratón. La exposición a Me-d4T (100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

La **figura 73** muestra que 2Et-d4T inhibe la activación de caspasa-1. El ATP (5 mM) induce la activación de caspasa-1, que se mide mediante el control de la luminiscencia de la escisión de luciferasa por caspasa-1 en células J774 iGLuc de ratón. La exposición a 2Et-d4T (1 nM-100 µM) reduce la escisión de caspasa-1 de una manera dependiente de la dosis. N = 3.

Tal como se ilustra en las figuras 70-73, en comparación con d4T, hubo una mayor reducción en la activación del inflammasoma por las kamuvudinas (INTI modificados). Específicamente, d4T redujo la activación del inflammasoma en, aproximadamente, un 35 %, mientras que O-Me, N-Et-d4T redujeron la activación del inflammasoma en, aproximadamente, un 55 %, Me-d4T redujo la activación del inflammasoma en, aproximadamente, un 70 % y 2Et-d4T redujo la activación del inflammasoma en, aproximadamente, un 45 %. Sin desear quedar limitado por la teoría, como cada una de las kamuvudinas proporcionó una mayor reducción en la activación del inflammasoma en comparación con el INTI original (es decir, d4T), se cree que las kamuvudinas también proporcionan un mayor bloqueo de la degeneración retiniana.

La **figura 74** muestra que las kamuvudinas bloquean la activación de caspasa-1 inducida por ARN Alu en células primarias del EPR humanas, tal como se controla mediante transferencia Western. La activación de caspasa-1 inducida por ARN Alu en células primarias del EPR humanas, controlada mediante transferencia Western, se reduce con 2Et-d4T (25 µM), 2Me-AZT (25 µM), O-Me N-Et d4T (25 µM), d4T-eno (25-100 µM) y TM-3TC (25-100 µM), N = 3-4.

El ARN *Alu* es un retroelemento endógeno tóxico que se acumula y provoca la muerte del EPR en pacientes con DMAE seca. La figura 75, muestra que las kamuvudinas bloquean la activación de caspasa-1 en células primarias humanas expuestas a citrato de amonio y hierro (Fe^{3+}) (FAC, del inglés *ferric ammonium citrate*). El FAC activa la caspasa-1 a través de un producto intermedio de ARN *Alu* e induce la degeneración del EPR dependiente de NLRP3 (Gelfand et al. Cell Reports 2015). La activación de caspasa-1 inducida por citrato de amonio y Fe(III) (100 µM) en células primarias del EPR humanas, controlada mediante transferencia Western, se reduce con TM-3TC (25 µM), d4T-eno (25 µM), 2Me-d4T (25 µM), Me-AZT (25-100 µM) y 2Me-AZT (25 µM). N = 3-4.

Las **figuras 76-78** muestran que el INTI 3TC bloquea la activación de caspasa-1 inducida por factores estresantes asociados con la DMAE (proteína del complemento C3a, Paraquat generador de ROS y beta amiloide) en células primarias del EPR humanas. La **figura 76** muestra que los INTI reducen la activación de caspasa-1 inducida por el complemento en las células del EPR humanas. La activación de caspasa-1 inducida por C3a humana (100 nM) después de la sensibilización con LPS en células primarias del EPR humanas, controlada mediante transferencia Western, se reduce con 3TC (25 µM). N = 3-4. La **figura 77** muestra que los INTI reducen la activación de caspasa-1 inducida por Paraquat en células del EPR humanas. La activación de caspasa-1 inducida por Paraquat (250 µM) en células primarias del EPR humanas, controlada mediante transferencia Western, se reduce con 3TC (25 µM). N = 3-4. La **figura 78** muestra que los INTI reducen la activación de caspasa-1 inducida por beta amiloide en células del EPR humanas. La activación de caspasa-1 inducida por el péptido Aβ1-40 oligomerizado (0,5 µM) en células

primarias del EPR humanas, controlada mediante transferencia Western, se reduce con 3TC (10-25 μ M). N = 3-4.

Eficacia de los INTI y las kamuvudinas en ratones

En la presente memoria descriptiva, se muestra la eficacia de las kamuvudinas en modelos de ratón de DMAE seca y húmeda. Con referencia a las **figuras 79-87**, los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva reducen la neovascularización coroidea (NVC) en un modelo de "DMAE húmeda" y bloquean la degeneración del EPR en un modelo de "DMAE seca".

Las **figuras 79 y 80** muestran que los INTI y las kamuvudinas son eficaces en el modelo inducido por láser de neovascularización coroidea (NVC; DMAE húmeda). La **figura 79** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva reducen la neovascularización coroidea en un modelo de "DMAE húmeda". La administración intravítrea de 3TC (0,55 nmol), ABC (0,64 nmol) o AZT (0,55 nmol) después de la lesión por láser redujo el volumen de NVC inducida por lesión por láser en ratones de tipo natural. La inyección de PBS o DMSO fueron controles de vehículo. N = 16. La **figura 80** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva reducen la neovascularización coroidea (NVC) en un modelo de "DMAE húmeda". La administración intravítrea de Me-d4T, O-Me-N-Et-d4T, 2Et-AZT o 3Et-3TC (0,14 nmol) después de la lesión por láser redujo el volumen de neovascularización coroidea (NVC) en ratones de tipo natural el día 7. Las inyecciones de DMSO fueron controles de vehículo. N = 16. En comparación con los INTI (figura 79), los INTI modificados (figura 80) son más potentes (se requiere una dosis menor) para suprimir la NVC y son más eficaces (se consigue un mayor grado de supresión).

Sin pretender quedar limitado por ninguna teoría, se cree que tanto los INTI como las kamuvudinas proporcionan efectos antiangiogénicos de una manera dependiente de P2X7, lo que reduce la NVC. Específicamente, la inyección intravítrea de los INTI o las kamuvudinas suprimió la NVC inducida por láser en ratones de tipo natural en comparación con PBS o DMSO, respectivamente, mientras que la inyección intravítrea de los INTI no suprimió la NVC inducida por láser en ratones P2rx7^{-/-}. Además, la inyección intravítrea de los INTI suprimió la NVC inducida por láser en ratones *Nlrp3*^{-/-}, lo que indica que los efectos antiangiogénicos son independientes de *Nlrp3*. También se cree que la inhibición de P2X7 y/o los efectos angiainhibidores de los INTI y las kamuvudinas son eficaces en el tratamiento de otras enfermedades, entre las que se incluyen, pero sin constituir limitación, el bloqueo del crecimiento tumoral y/o el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

Las **figuras 81 y 82** muestran que, en comparación con los INTI originales, las kamuvudinas tienen una mayor eficacia y potencia en el tratamiento de la enfermedad neovascular existente. Los ratones JR5558 desarrollan neovascularización coroidea (NVC) espontánea y son un modelo animal de degeneración macular asociada con la edad (DMAE) húmeda/neovascular. La actividad de las lesiones de NVC se puede controlar mediante angiografía con fluoresceína para evaluar el grado de fuga de colorante de las lesiones, tal como se realiza en humanos con esta enfermedad. Las **figuras 81 y 82** son imágenes representativas de dos ratones JR5558 (N = 8). Las filas primera y tercera de las **figuras 81 y 82** muestran una fuga de colorante dependiente del tiempo de lesiones de NVC preexistentes en el ojo izquierdo (primera fila) y el ojo derecho (tercera fila) de un primer y segundo ratón JR5558, respectivamente. La segunda fila de las **figuras 81 y 82** muestra una fuga de colorante dependiente del tiempo en el ojo izquierdo después de una única administración intravítrea de 125 ng de 3TC, a mitad de la cuarta fila se muestra una fuga de colorante dependiente del tiempo en el ojo derecho después de una única administración intravítrea de 62,5 ng de 3-Me-3TC. Tal como se observa en las filas dos y cuatro, tanto el 3TC como el 3-Me-3TC suprimen la actividad de las lesiones de NVC preexistentes 3 días después de la administración (es decir, reducen la fuga de colorante). Además, en comparación con el INTI original (3TC), la kamuvudina (es decir, 3-Me-3TC) proporciona una mayor reducción en la fuga de lesiones de NVC (es decir, es más eficaz) en dosis más bajas (es decir, es más potente).

En modelos de DMAE seca, en las **figuras 83-86**, se ha demostrado que las kamuvudinas bloquean la degeneración del EPR inducida por Alu, según se controla mediante fotografía del fondo ocular y tinción de preparación plana con ZO-1 del EPR, en un modelo de DMAE seca.

La **figura 83** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva bloquean la degeneración del EPR inducida por ARN Alu en un modelo de "DMAE seca". La inyección subretiniana de ARN Alu (0,3 μ g) induce la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular a color (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior) en ratones de tipo natural. La administración intraperitoneal de 3Me-3TC (25 mg/kg, dos veces al día durante 6 días después de la inyección de ARN Alu) protege contra la degeneración del EPR, tal como se observa en las fotos del fondo ocular (parte superior, área más pequeña del área blanquecina de decoloración) y en las preparaciones planas de EPR inmunoteñidas con ZO-1 (parte inferior, apariencia más hexagonal, teselada). Los paneles inferiores muestran fotografías del fondo ocular que demuestran que la administración intraperitoneal de O-Me N-Et d4T (25 mg/kg, dos veces al día durante 6 días después de la inyección de ARN Alu) protege contra la degeneración del EPR inducida por ARN Alu en ratones de tipo natural. Imagen representativa de 6 experimentos.

La **figura 84** muestra que el 3Me-3TC dado a conocer en la presente memoria descriptiva bloquea la degeneración

del EPR inducida por pAlu en un modelo de "DMAE seca". La inyección subretiniana de un plásmido que codifica Alu (pAlu) induce la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior) en ratones de tipo natural. La administración intraperitoneal de 3Me-3TC (25 mg/kg, dos veces al día durante 6 días después de la inyección de pAlu) protege contra la degeneración del EPR, tal como se observa en las fotos del fondo ocular (parte superior) y en las preparaciones planas de EPR inmunoteñidas con ZO-1 (parte inferior). Imagen representativa de 6 experimentos.

La **figura 85** muestra que 3Et-3TC bloquea la degeneración del EPR inducida por pAlu en un modelo de "DMAE seca". La inyección subretiniana de un plásmido que codifica Alu (pAlu) induce la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior) en ratones de tipo natural. La administración intraperitoneal de 3Et-3TC (25 mg/kg, dos veces al día durante 6 días después de la inyección de pAlu) protege contra la degeneración del EPR, tal como se observa en las fotos del fondo ocular (parte superior) y en las preparaciones planas de EPR inmunoteñidas con ZO-1 (parte inferior). Imagen representativa de 6 experimentos.

La **figura 86** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva bloquean la degeneración del EPR inducida por pAlu en un modelo de "DMAE seca". La inyección subretiniana de un plásmido que codifica Alu (pAlu) induce la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior) en ratones de tipo natural. La administración intraperitoneal de 2Et-d4T o 2Et-AZT (25 mg/kg, dos veces al día durante 6 días después de la inyección de pAlu) protege contra la degeneración del EPR, tal como se observa en las fotografías del fondo ocular. Imagen representativa de 6 experimentos.

En las **figuras 87-89**, se ha demostrado que las kamuvudinas son eficaces para bloquear la degeneración del EPR después de la inyección intraocular de poli IC, beta amiloide y hierro.

La **figura 87** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva bloquean la degeneración del EPR inducida por poli IC en un modelo de "DMAE seca". El poli IC (0,2 µg) administrado en el espacio subretiniano de ratones de tipo natural induce la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular a color (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior). La administración intravítrea de Me-d4T o 2-Me-d4T (0,14 mmol) (después de la inyección de poli IC) bloquea esta degeneración (medida 7 días después de poli IC). La fila superior muestra fotografías representativas del fondo ocular. La fila inferior muestra preparaciones planas de EPR teñidas con ZO-1 representativas. N = 4-6.

La **figura 88** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva bloquean la degeneración del EPR inducida por beta amiloide en un modelo de "DMAE seca". Se inyectó péptido beta amiloide 1-40 oligomerizado (0,83 µmol) en el espacio subretiniano de ratones para inducir la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular a color (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior). La administración intraperitoneal de 3TC o K-2 (2Me-d4T) en los días 1 a 6 (25 mg/kg) bloqueó el desarrollo de la degeneración del EPR en el día 7. La fila superior muestra fotografías del fondo ocular a color. La fila inferior muestra preparaciones planas de EPR teñidas con ZO-1.

La **figura 89** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva bloquean la degeneración del EPR inducida por hierro en un modelo de "DMAE seca". Se inyectó citrato de amonio y Fe(III) (3 nM) en el espacio subretiniano de ratones para inducir la degeneración del EPR (región de color amarillo blanquecino en la fotografía del fondo ocular a color (fila superior) y la desorganización de la matriz hexagonal (fila inferior). La administración intraperitoneal de d4T, K-1 (Me-d4T) o K-2 (2Me-d4T) en los días 1 a 6 (25 mg/kg) bloqueó el desarrollo de la degeneración del EPR en el día 7, en comparación con el tratamiento con vehículo. La fila superior muestra fotografías del fondo ocular a color. La fila inferior muestra preparaciones planas de EPR teñidas con ZO-1.

Seguridad/toxicidad de los INTI frente a las kamuvudinas en ratones y células

También se estudió la seguridad y toxicidad de los compuestos. La figura 90 muestra que los INTI son tóxicos para la retina después de la inyección intravítrea. De manera sorprendente e inesperada, la adición de una única sustitución R a los INTI eliminó esta toxicidad: la **figura 91** muestra que la inyección intravítrea de la misma dosis de kamuvudinas no es tóxica, lo que indica que son más seguras que los INTI para la administración intraocular. Además, en la **figura 92** se demuestra que las kamuvudinas son seguras porque su administración intravítrea no induce una alteración anatómica de la retina.

La **figura 90** muestra que los INTI conocidos pueden provocar toxicidad retiniana. La inyección intravítrea de d4T, AZT o 3TC (0,56 nmol) en ratones indujo áreas de toxicidad retiniana por degeneración retiniana (puntas de flecha rojas). Se muestran imágenes de fotografías del fondo ocular a color representativas (N = 8). Estos datos indican que los INTI podrían tener efectos adversos después de la administración intraocular.

La **figura 91** muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva no son tóxicos para

la retina. La inyección intravítrea de las kamuvudinas 1-9 (2,8 nmol) en ratones no indujo toxicidad retiniana. Se muestran imágenes de fotografías del fondo ocular a color representativas (N = 8). Estos datos indican que, a diferencia de los INTI, las kamuvudinas son más seguras para la administración intraocular.

La **figura 92** también muestra que los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva no son tóxicos para la retina. La inyección intravítrea de las kamuvudinas 1-5 (2,8 nmol) en ratones no indujo ninguna alteración anatómica de la retina (tinción H&E; fila superior) ni cambios en el grosor de las diversas capas de la retina (ILM: membrana limitante interna; OLM: membrana limitante externa; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; ONL: capa nuclear externa; IS: segmentos internos; OS: segmentos externos). N = 8. Estos datos indican que, a diferencia de los INTI, las kamuvudinas son más seguras para la administración intraocular incluso a concentraciones muy elevadas.

Finalmente, las **figuras 93 y 94** muestran que las kamuvudinas carecen de inhibición de la polimerasa inespecífica de los INTI. Es decir, la sustitución de un grupo R en los INTI cambió completamente su actividad hacia la inhibición de la polimerasa.

La **figura 93** muestra que los INTI, pero no las kamuvudinas, bloquearon el número de copias de ADN mitocondrial en las células primarias del EPR humanas en cultivo. Los INTI agotan el ADN mitocondrial (mt) al competir con los nucleótidos endógenos por la ADN polimerasa gamma; se cree que la representación del ADNmt es en gran parte responsable de muchos efectos secundarios asociados con la utilización de los INTI. Hubo algunas diferencias entre las kamuvudinas en el restablecimiento de los niveles de ADNmt, lo que indica la necesidad de analizar cada compuesto modificado individualmente. Los gráficos muestran la cantidad relativa de ADNmt en células primarias del EPR humanas tratadas con INTI (d4T, 3TC o AZT) o INTI modificados (Me-d4T, 2Me-d4T, TM-3TC, Me-AZT o 2Me-AZT), en comparación con el tratamiento con vehículo (DMSO, también conocido como "No Tx") a una concentración de 50 µM para todos los fármacos. El ADN se recogió después de cuatro días en cultivo celular con exposición al fármaco. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para el ADNmt y se normalizó a la secuencia del ADN genómico. d4T, 3TC y AZT exhiben agotamiento del ADNmt. Las versiones modificadas de d4T y AZT no exhiben agotamiento del ADNmt. N = 3-4/grupo, las barras de error son el E.E.M. Estos datos indican que los INTI pueden provocar toxicidad mitocondrial, mientras que la mayoría de los INTI modificados no provocan toxicidad mitocondrial. Dado que se ha atribuido a la toxicidad mitocondrial la miopatía, la neuropatía periférica y la esteatosis hepática con acidosis láctica observadas en pacientes que toman INTI, y los INTI modificados no provocan toxicidad mitocondrial, se espera que los INTI modificados sean más seguros que los INTI originales, es decir, que reduzcan o eliminen la toxicidad mitocondrial.

La **figura 94** muestra los resultados de un ensayo de retrotransposición de L1, en el que un indicador de EGFP se expresa solo tras la transcripción inversa y la integración con éxito del retrotransposón LINE-1 humano. Los INTI, pero no las kamuvudinas, bloquearon la retrotransposición de L1, lo que indica que no bloquean la actividad de la ADN polimerasa dependiente de ARN. Estos descubrimientos allanan el camino para el rediseño racional y la mejora de los análogos nucleosídicos como terapias novedosas. El ensayo de retrotransposición de L1 de cultivo celular de proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) se realizó en células HeLa. Las células se transfectaron con un plásmido que expresa una secuencia de L1 activa etiquetada con un indicador de EGFP en presencia de vehículo (RPS) o en presencia de los INTI (d4T, AZT o 3TC) o metoxi-INTI (Me-d4T, 2Me-d4T, Me-AZT, 2Me-AZT, 3Me-3TC, 2Et-d4T, 2Et-AZT o 3Et-3TC). Las células transfectadas se seleccionaron en puromicina. 7 días después de la transfección, las células que se sometieron a retrotransposición (positivas para EGFP) se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se seleccionaron basándose en la fluorescencia de fondo del plásmido JM111, que tiene dos mutaciones puntuales en L1-ORF1 que anulan la retrotransposición. Los datos se normalizan con RPS establecido en 1. Estos datos indican que los INTI interfieren con la actividad de L1 endógena mientras que los INTI modificados no interferirían con esta actividad de L1 natural de la célula. 3Et-3TC parece tener alguna interferencia residual con la actividad de L1 natural, mientras que las otras kamuvudinas (INTI modificados) no tienen ningún efecto sobre la actividad de L1.

REFERENCIAS

1. Patente PCT/US11/38753.
2. Patente PCT/US12/46928.
3. Patente 61/586,427.
4. Patente 61/780,105.
5. Adinolfi, E., Callegari, M.G., Ferrari, D., Bolognesi, C., Minelli, M., Wieckowski, M.R., Pinton, P., Rizzuto, R., y Di Virgilio, F. (2005). Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* 16, 3260-3272.
6. Agarwal, H.K., Loethan, K., Mandal, D., Doncel, G.F., and Parang, K. (2011). Synthesis and biological evaluation of fatty acyl ester derivatives of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 1917-1921.
7. Ahmad, R., Sindhu, S.T., Toma, E., Morisset, R., y Ahmad, A. (2002). Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. *J Virol* 76, 12448-12456.
8. Ambati, J., Ambati, B.K., Yoo, S.H., Ianchulev, S., y Adamis, A.P. (2003). Age-related macular degeneration:

etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 48, 257-293.

9. Ambati, J., y Fowler, B.J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26-39.

10. Balzarini, J., Herdewijn, P., y De Clercq, E. (1989). Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J Biol Chem* 264, 6127-6133.

11. Batzer, M.A., y Deininger, P.L. (2002). Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 3, 370-379.

12. Cheewatrakoolpong, B., Gilchrist, H., Anthes, J.C., y Greenfeder, S. (2005). Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 17-27.

13. Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L., Persechini, P.M., y Ojcius, D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 282, 2871-2879.

14. David, D., Chevrier, D., Treilhou, M.P., Joussemet, M., Dupont, B., Theze, J., y Guesdon, J.L. (2000). IL-18 underexpression reduces IL-2 levels during HIV infection: a critical step towards the faulty cell-mediated immunity? *Aids* 14, 2212-2214.

15. Dewannieux, M., Esnault, C., y Heidmann, T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* 35, 41-48.

16. Dridi, S., Hirano, Y., Tarallo, V., Kim, Y., Fowler, B.J., Ambati, B.K., Bogdanovich, S., Chiodo, V.A., Hauswirth, W.W., Kugel, J.F., et al. (2012). ERK1/2 activation is a therapeutic target in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 13781-13786.

17. Ferrara, J.L., Levine, J.E. Reddy, P., y Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* 373, 1550-1561.

18. Garcia-Marcos, M., Fontanils, U., Aguirre, A., Pochet, S., Dehay, J.P., y Marino, A. (2005). Role of sodium in mitochondrial membrane depolarization induced by P2X7 receptor activation in submandibular glands. *FEBS Lett* 579, 5407-5413.

19. Hazleton, J.E., Barman, J.W., y Eugenin, E.A. (2012). Purinergic receptors are required for HIV-1 infection of primary human macrophages. *J Immunol* 188, 4488-4495.

20. Hentze, H., Lin, X.Y., Choi, M.S., y Porter, A.G. (2003). Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ* 10, 956-968.

21. Humphreys, B.D., Rice, J., Kertesz, S.B., y Dubyak, G.R. (2000). Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 275, 26792-26798.

22. Iannello, A., Boulassel, M.R., Samarani, S., Tremblay, C., Toma, E., Routy, J.P., y Ahmad, A. (2010). HIV-1 causes an imbalance in the production of interleukin-18 and its natural antagonist in HIV-infected individuals: implications for enhanced viral replication. *J Infect Dis* 201, 608-617.

23. Jankovic, D., Ganesan, J., Bscheider, M., Stickel, N., Weber, F.C., Guarda, G., Follo, M., Pfeifer, D., Tardivel, A., Ludjig, K., et al. (2013). The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 210, 1899-1910.

24. Kahlenberg, J.M., y Dubyak, G.R. (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1100-1108.

25. Kaneko, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Fowler, B.J., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Ponicsan, S.L., Hauswirth, W.W., Chiodo, V.A. et al. (2011). DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 471, 325-330.

26. Krcur, N., Hirano, Y., Tarallo, V., Fowler, B.J., Bastos-Carvalho, A., Yasuma, T., Yasuma, R., Kim, Y., Hinton, D.R., Kirschning, C.J., et al. (2013). TLR-Independent and P2X7-Dependent Signaling Mediate Alu RNA-Induced NLRP3 Inflammasome Activation in Geographic Atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 7395-7401.

27. Kubes, P., y Mehal, W.Z. (2012). Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 143, 1158-1172.

28. Lewis, W., Day, B.J., y Copeland, W.C. (2003). Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2, 812-822.

29. Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Ginna, M., Erickson, S., y Dixit, V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430, 213-218.

30. Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., y Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-232.

31. Martinon, F., Burns, K., y Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-426.

32. Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., y Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.

33. McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, L., Waterhouse, C.C., Beck, P.L., Muruve, D.A., y Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362-366.

34. Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., et al. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12, 222-230.

35. Nykanen, A., Haley, B., y Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

36. Ostertag, W., Roesler, G., Krieg, C.J., Kind, J., Cole, T., Crozier, T., Gaedicke, G., Steinheider, G., Kluge, N., y

Dube, S. (1974). Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 4980-4985.

37. Pelegrin, P., y Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J* 25, 5071-5082.

5 38. Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., y Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14, 1583-1589.

39. Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L.L., Louie, S., Cupp, J.E., Dubyak, G.R., Hackos, D., y Dixit, V.M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol* 186, 6553-6561.

10 40. Riteau, N., Baron, L., Villeret, B., Guillou, N., Savigny, F., Ryffel, B., Rassendren, F., Le Bert, M., Gombault, A., y Couillin, I. (2012). ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis* 3, e403.

41. Sorge, R.E., Trang, T., Dorfman, R., Smith, S.B., Beggs, S., Ritchie, J., Austin, J.S., Zaykin, D.V., Vander Meulen, H., Costigan, M., et al. (2012). Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18, 595-599.

15 42. Stylianou, E., Bjerkeli, V., Yndestad, A., Heggelund, L., Waehre, T., Damas, J.K., Aukrust, P., y Froland, S.S. (2003). Raised serum levels of interleukin-18 is associated with disease progression and may contribute to virological treatment failure in HIV-1-infected patients. *Clin Exp Immunol* 132, 462-466.

43. Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., y Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735-738.

20 44. Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B.D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., Cho, W.G., Kaneko, H., Fowler, B.J., Bogdanovich, S., et al. (2012). DICER1 Loss and Alu RNA Induce Age-Related Macular Degeneration via the NLRP3 Inflammasome and MyD88. *Cell* 149, 847-859.

25 45. Wilhelm, K., Ganesan, J., Muller, T., Durr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempf, C.D., Sorichter, S., Gerlach, U.V., Juttner, E., et al. (2010). Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16, 1434-1438.

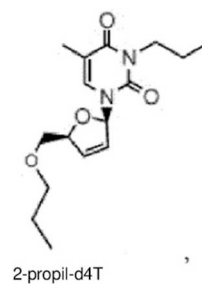
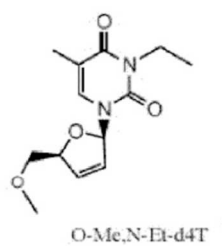
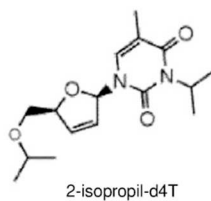
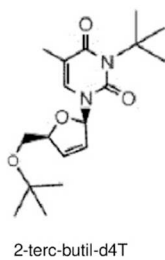
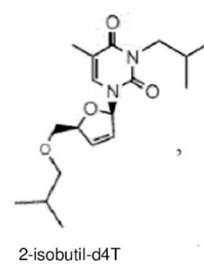
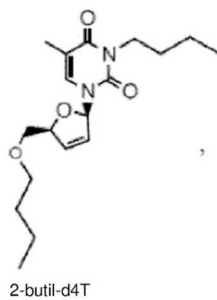
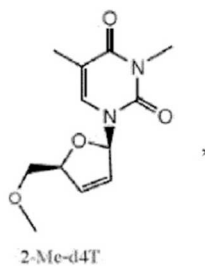
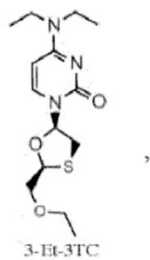
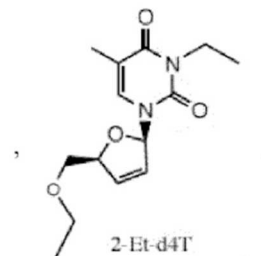
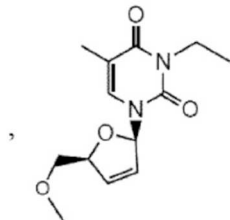
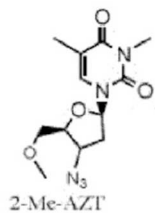
46. Yamin, T.T., Ayala, J.M., y Miller, D.K. (1996). Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem* 271, 13273-13282.

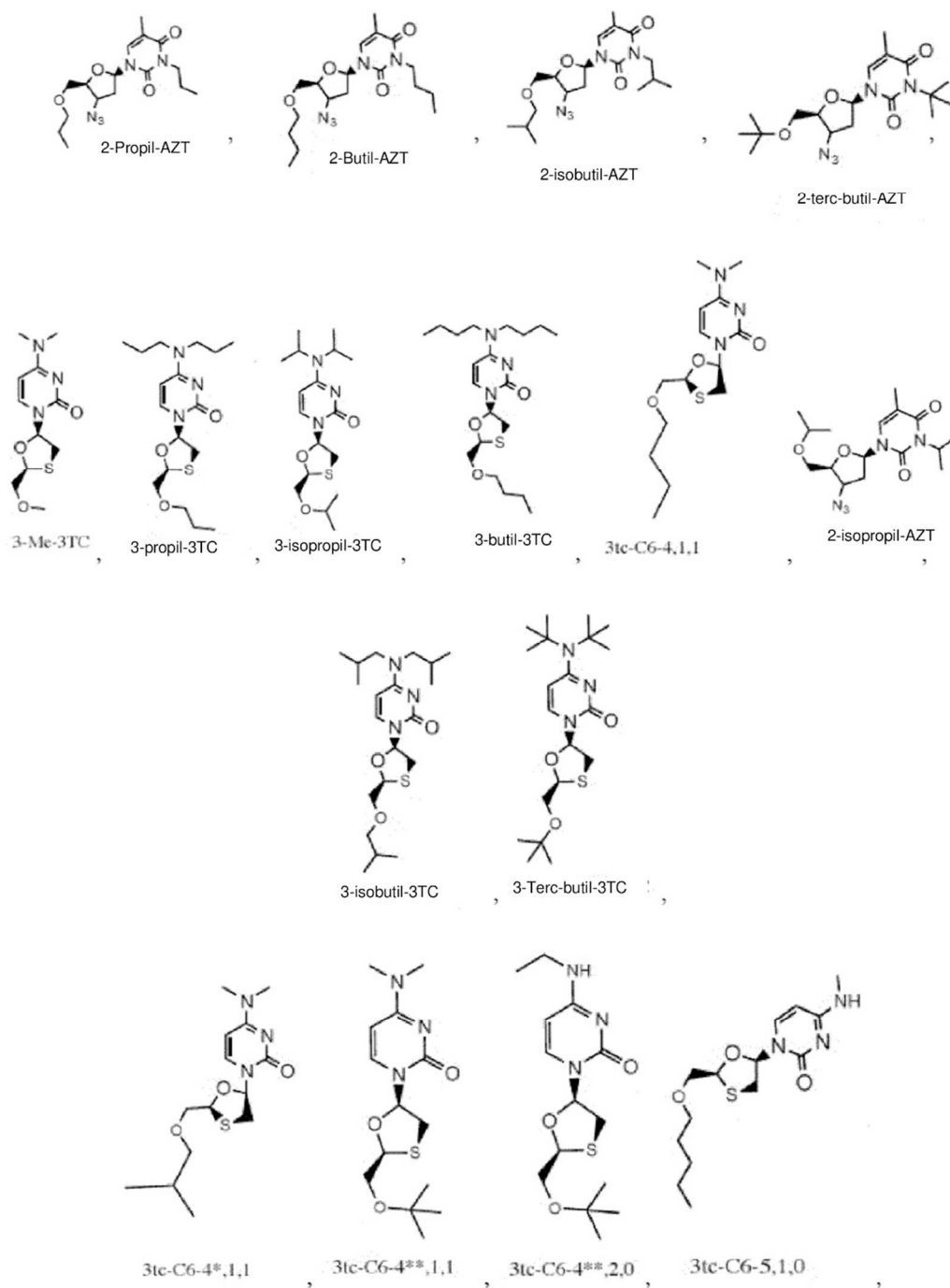
30 47. Fowler, et al. (2014) Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic antiinflammatory activity. *Science* 346: 6212, 1000-1003.

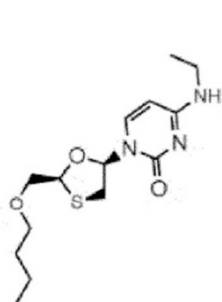
Un experto en la materia reconocerá que son posibles realizaciones o implementaciones adicionales sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención o del alcance de las reivindicaciones que siguen. Esta descripción detallada, y en particular los detalles específicos de las realizaciones e implementaciones de ejemplo dados a 35 conocer en la presente memoria descriptiva, se dan principalmente por motivos de claridad de comprensión y no se deben entender limitaciones innecesarias a partir de los mismos, ya que las modificaciones serán obvias para los expertos en la materia al leer la presente invención y se pueden llevar a cabo dentro del alcance de la presente invención reivindicada.

REIVINDICACIONES

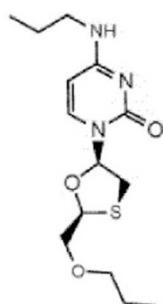
1. Compuesto que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



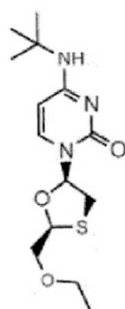




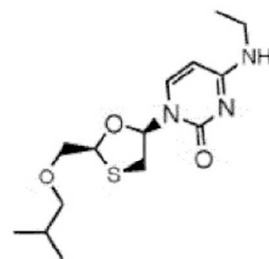
3tc-C6-4,2,0



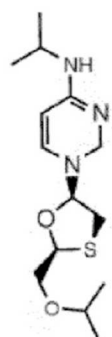
3tc-C6-3,3,0



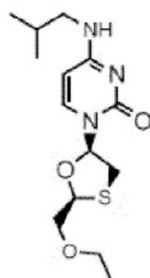
3tc-C6-2,4**,0



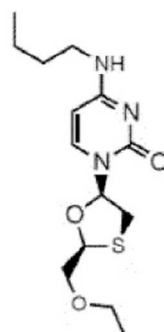
3tc-C6-4*,2,0



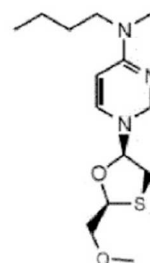
3tc-C6-3*,3*,0



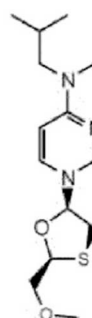
3tc-C6-2,4*,0



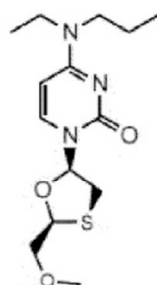
3tc-C6-2,4,0



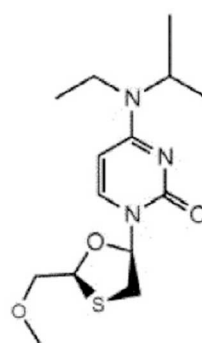
3tc-C6-1,4,1



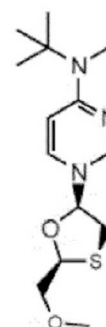
3tc-C6-1,4*,1



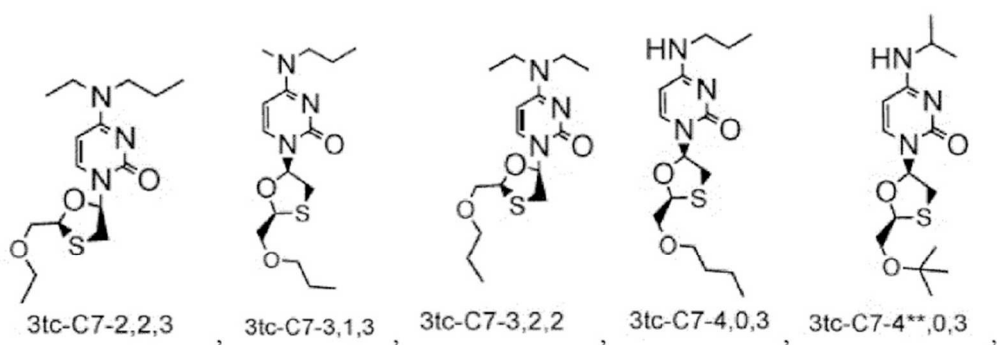
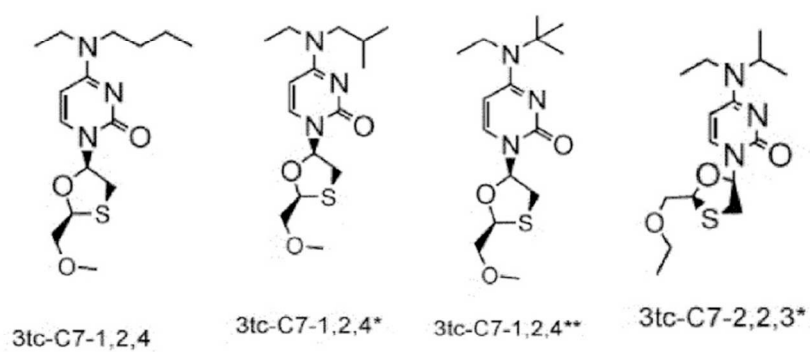
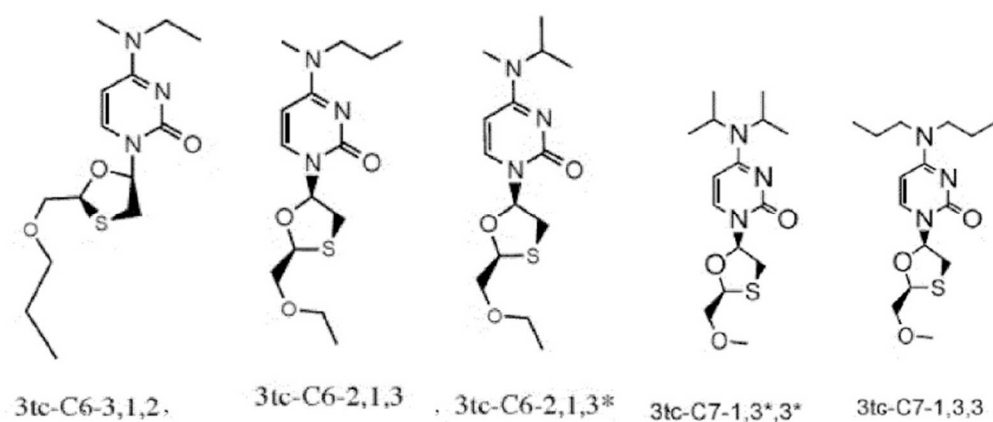
3tc-C6-1,2,3

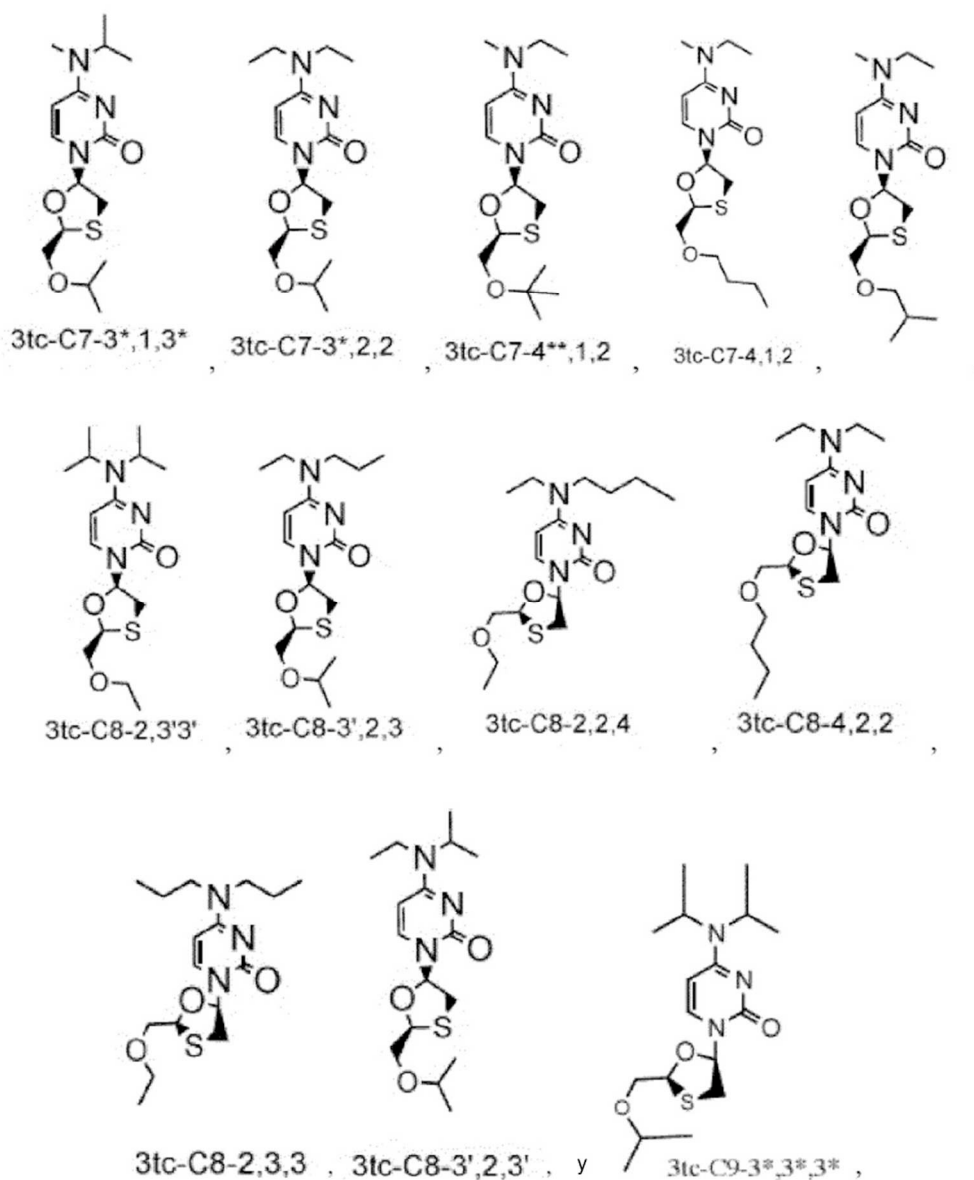


3tc-C6-1,2,3*



3tc-C6-1,4**,1

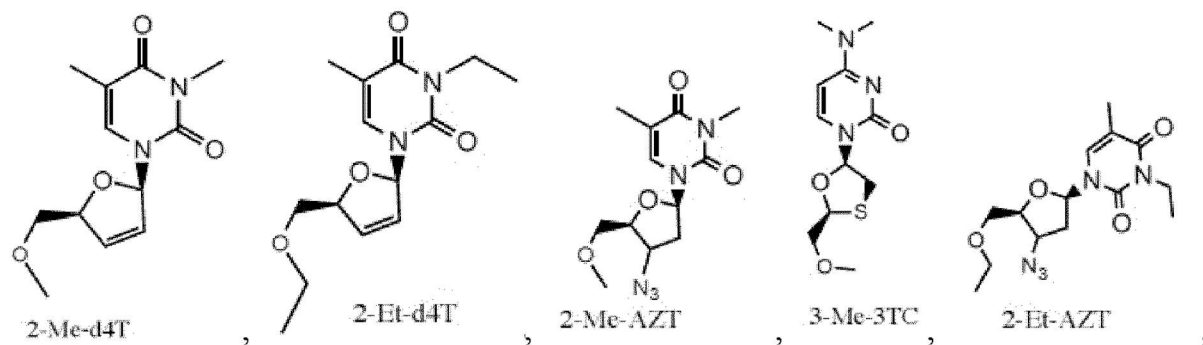




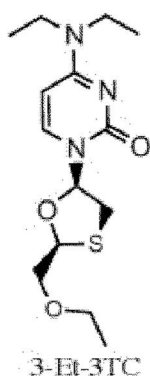
o sal aceptable farmacéuticamente de los mismos

2. Compuesto, según la reivindicación 1, que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:

5

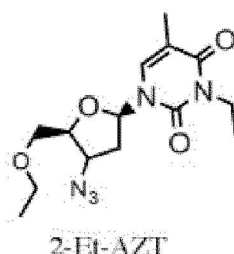


y



o sal aceptable farmacológicamente de los mismos.

3. Compuesto, según la reivindicación 2, que tiene la siguiente estructura:



o sal aceptable farmacológicamente del mismo.

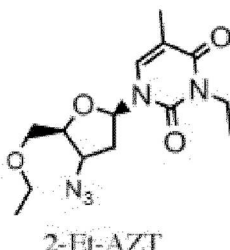
4. Composición farmacéutica que comprende el compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

5. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o composición, según la reivindicación 4, para su utilización en el tratamiento de una afección asociada con el daño y/o la degradación de la retina, que incluye la degeneración macular asociada con la edad (DMAE) seca y DMAE húmeda, diversas formas de artritis, entre las que se incluyen artritis reumatoide y artritis reactiva, diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de injerto contra huésped, dolor crónico, vitreorretinopatía proliferativa, glaucoma, esclerosis múltiple, trastorno bipolar, trastorno depresivo mayor, fibrosis renal, nefritis, fibrosis pulmonar, enfermedad de Huntington, osteoporosis, leucemia linfocítica crónica, trastornos de ansiedad, tuberculosis pulmonar, osteoporosis en mujeres posmenopáusicas y pacientes con fracturas, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, dolor crónico inflamatorio y neuropático, enfermedad renal poliquística autosómica dominante, lesión de la médula espinal, enfermedad de Alzheimer, dolor neuropático, hipertensión, venas varicosas, diabetes tipo I, diabetes tipo II, gota, hepatitis autoinmune, lesión vascular del injerto, aterosclerosis, trombosis, síndrome metabólico, inflamación de las glándulas salivales, lesión cerebral traumática, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular isquémico, enfermedad de Parkinson, melanoma, neuroblastoma, cánceres de próstata, mama, piel y tiroides, cáncer gástrico temprano tubular, cáncer neuroendocrino, cáncer de colon mucoide, cáncer de colon; carcinoma urotelial de alto grado, carcinoma de células claras de riñón, carcinoma de ovario indiferenciado, carcinoma de mama intraquístico papilar, septicemia gramnegativa, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Legionella spp.*, *Francisella spp.*, *Leishmania spp.* y *Chlamydia spp.* infecciosas, criopirinosopatías; queratitis, acné vulgar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, resistencia a la insulina, obesidad, síndrome hemolítico-urémico, infección por virus polio, enfermedad renal por inmunocomplejos, lesión tubular aguda, nefritis lúpica, síndrome autoinflamatorio familiar inducido por frío, síndrome de Muckle-Wells y enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal, enfermedades autoinflamatorias cutáneas y articulares neurológicas infantiles crónicas, lesión por isquemia-perfusión renal, glomerulonefritis, crioglobulinemia, vasculitis sistémica, nefropatía por IgA, malaria, helmintiasis, choque séptico, asma alérgica, fiebre del heno, inflamación pulmonar inducida por fármacos, dermatitis de contacto, lepra, infección por *Burkholderia cenocepacia*, infección por virus respiratorio sincitial, psoriasis, esclerodermia, fibrosis quística, sífilis, síndrome de Sjögren, enfermedad inflamatoria de las articulaciones, esteatosis hepática no alcohólica, inflamación estéril del hígado, cirugía cardíaca (inflamación perioperatoria/posoperatoria), rechazo agudo y crónico al trasplante de órganos, rechazo agudo y crónico al trasplante de médula ósea, angiogénesis tumoral, esclerosis lateral amiotrófica y trastorno del espectro autista.

6. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o composición, según la reivindicación 4, para su

utilización en el tratamiento del daño retiniano.

- 5 7. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 6, en los que el tratamiento del daño retiniano comprende inhibir la activación del inflammasoma mediante ARN Alu asociado con una célula.
8. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 7, en los que el inflammasoma se selecciona entre un inflammasoma NLRP3, un inflammasoma IL-1beta y una combinación de los mismos.
- 10 9. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 6, en los que el tratamiento del daño retiniano comprende reducir la permeabilidad inducida por ATP de una célula.
10. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 6, en los que el tratamiento del daño retiniano comprende reducir una cantidad de especies reactivas del oxígeno mitocondriales en una célula.
- 15 11. Compuesto o composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en los que la célula se selecciona entre el grupo que consiste en una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula fotorreceptora retiniana y una célula coroidea.
- 20 12. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 11, en los que la afección es DMAE seca.
13. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 5, en los que la afección se selecciona entre DMAE húmeda, artritis reumatoide, enfermedad de injerto contra huésped e inflamación estéril del hígado.
- 25 14. Compuesto o composición para su utilización, según la reivindicación 5, en los que la afección se selecciona entre lesión hepática inducida por fármacos y esteatohepatitis.
15. Compuesto o composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 5-14, en los que el compuesto tiene la siguiente estructura:



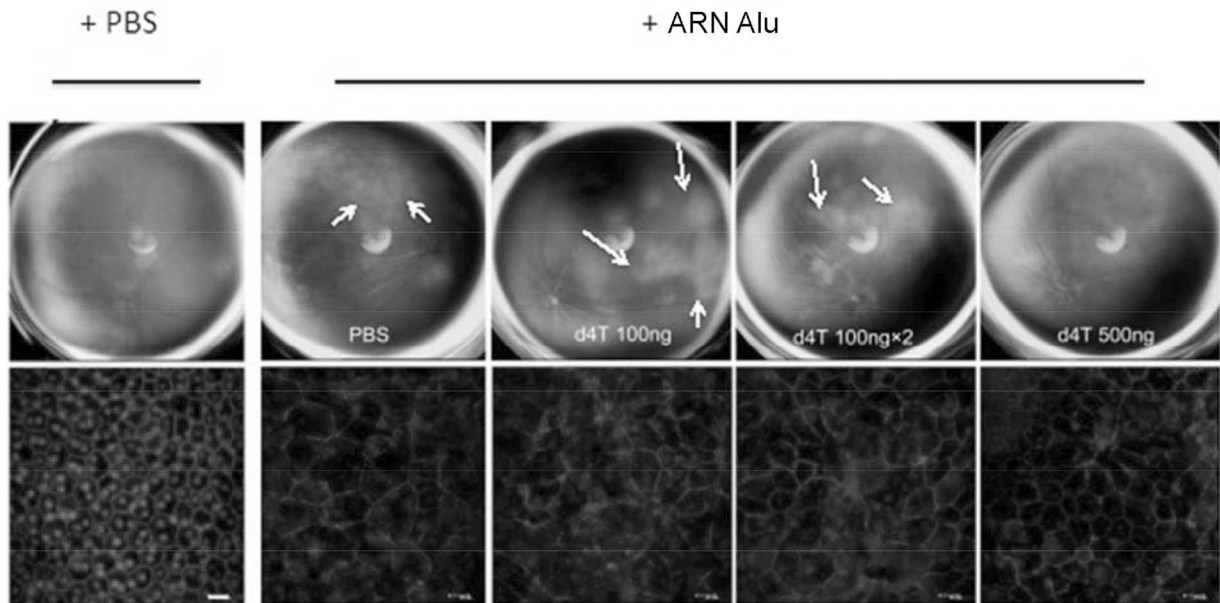


FIG. 1

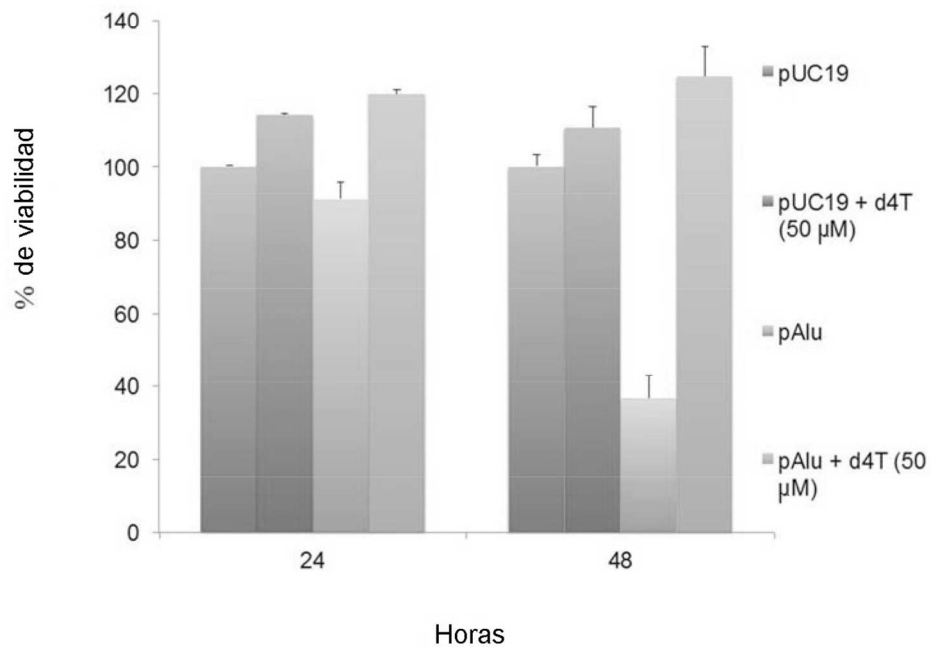


FIG. 2

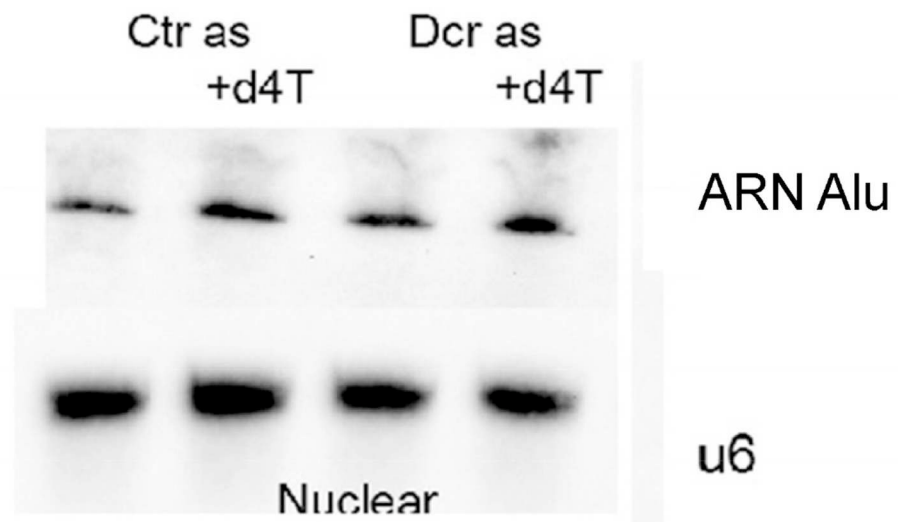


FIG. 3

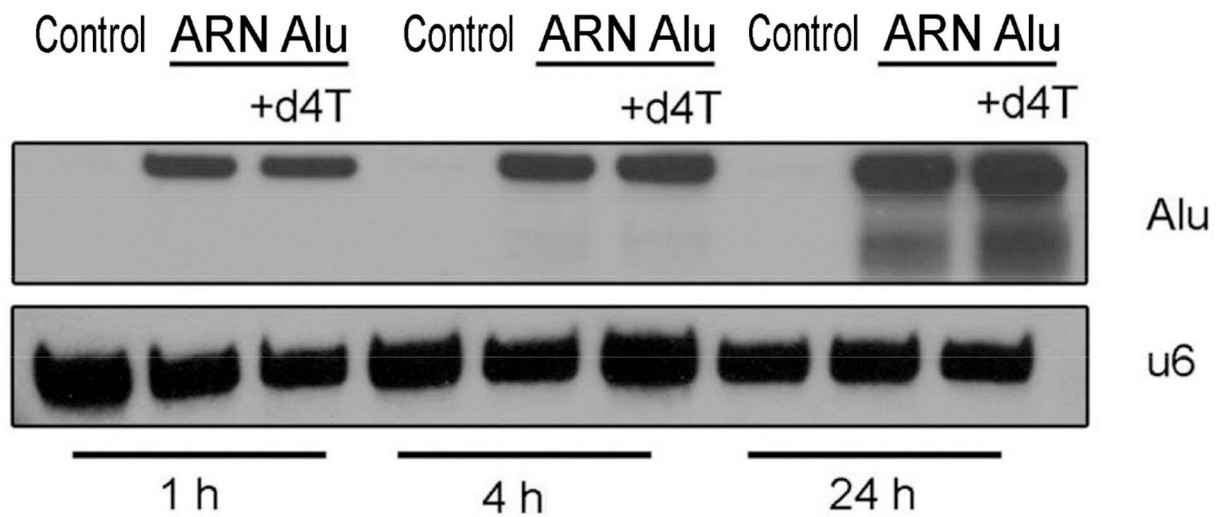


FIG. 4

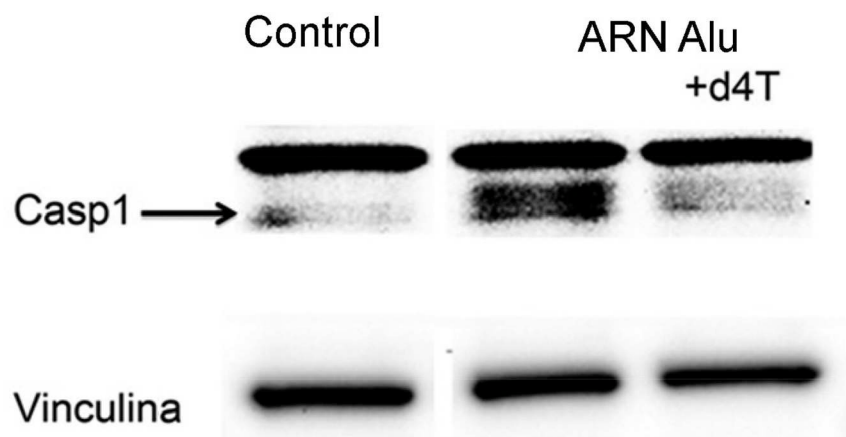


FIG. 5

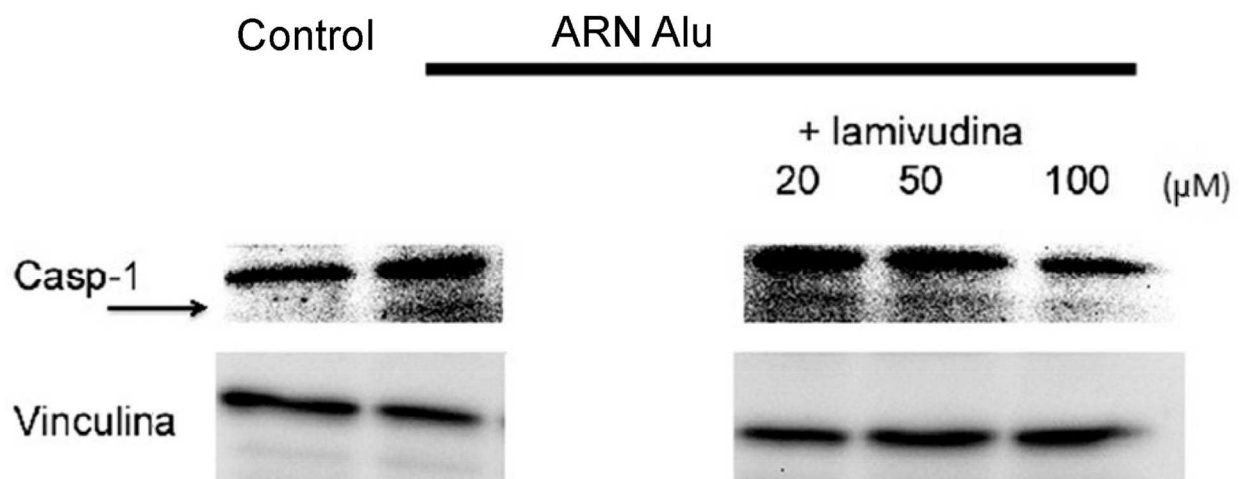


FIG. 6

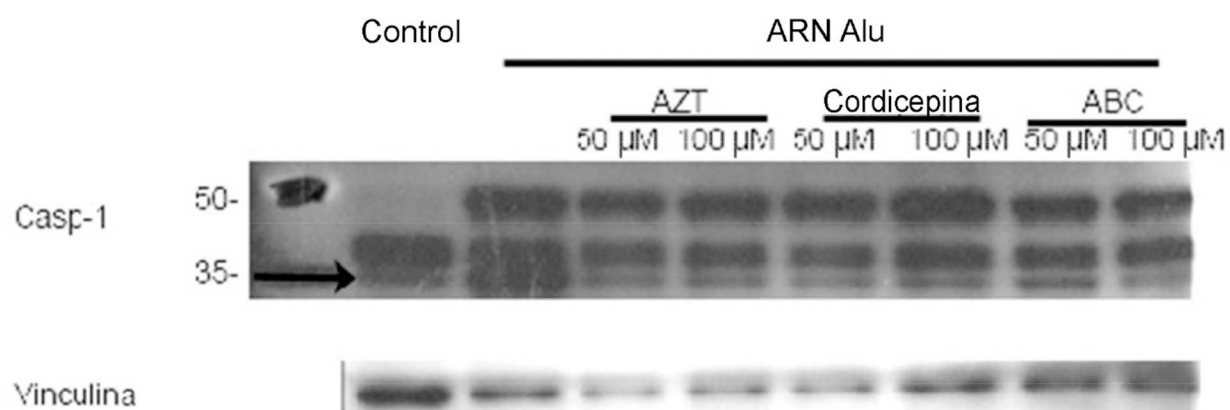


FIG. 7

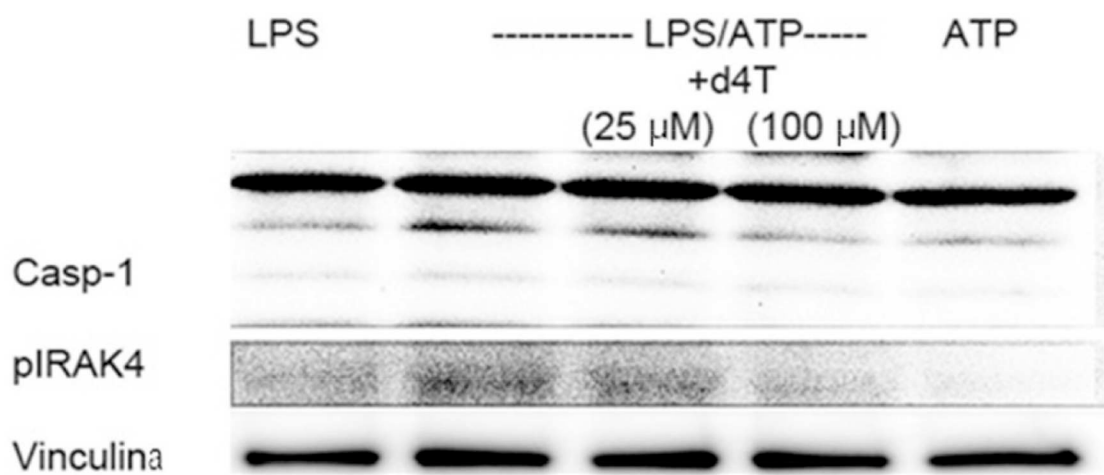


FIG. 8

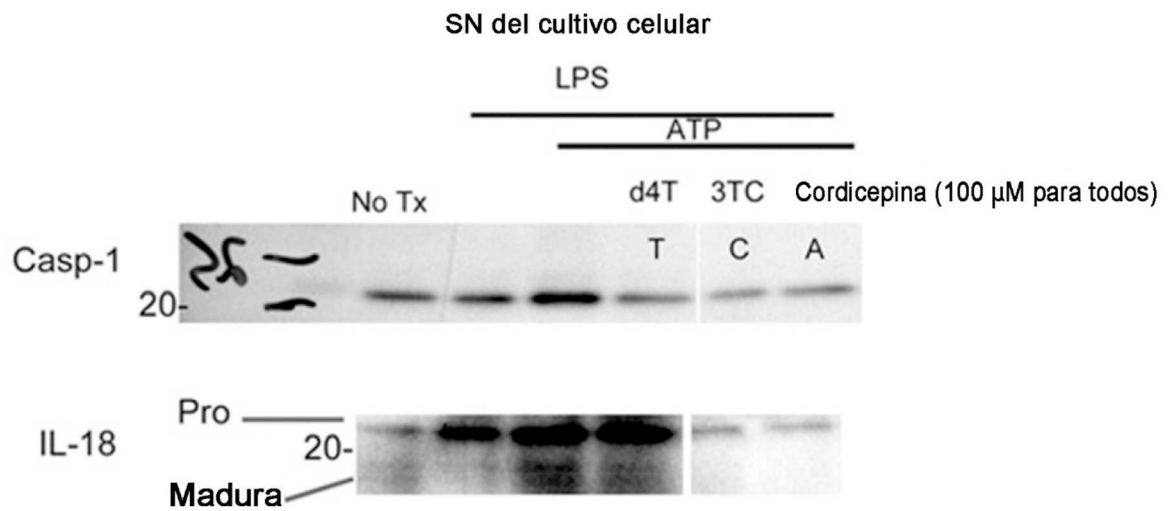


FIG. 9

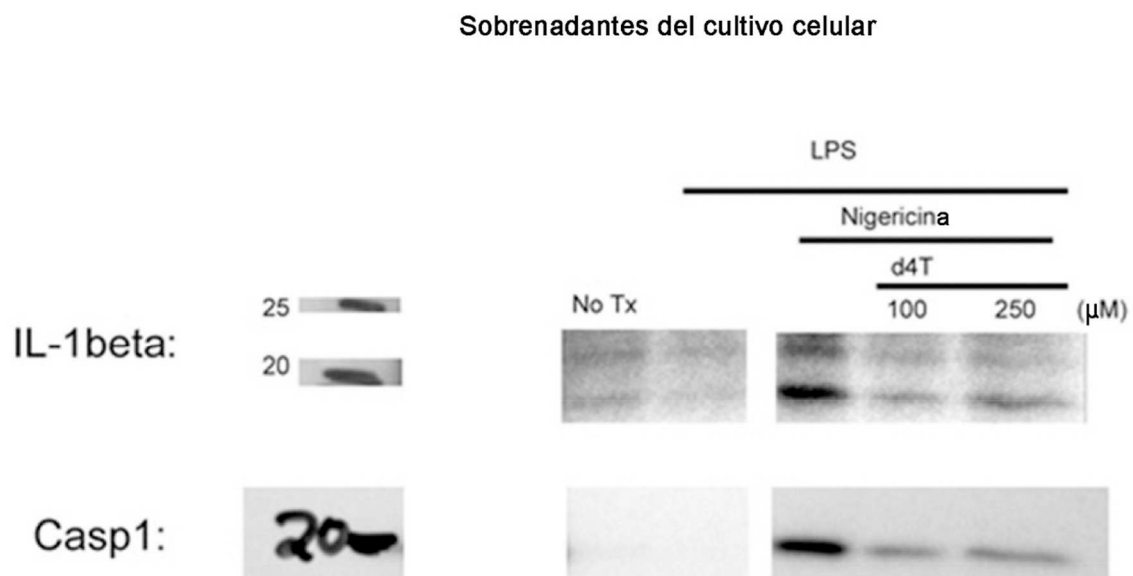


FIG. 10

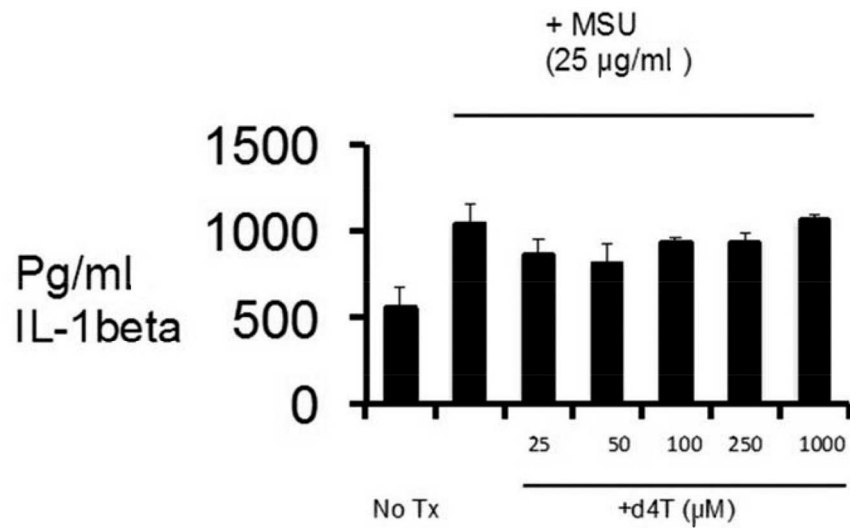


FIG. 11

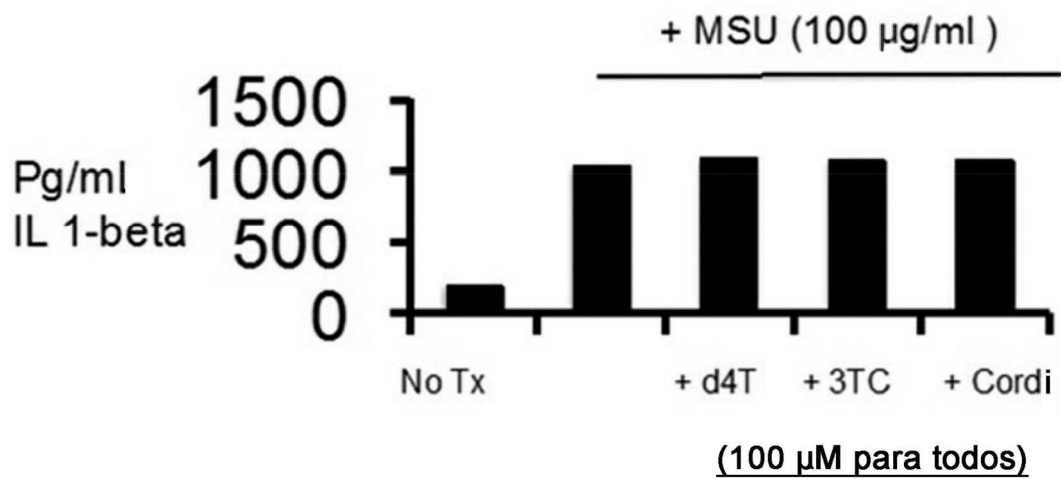


FIG. 12

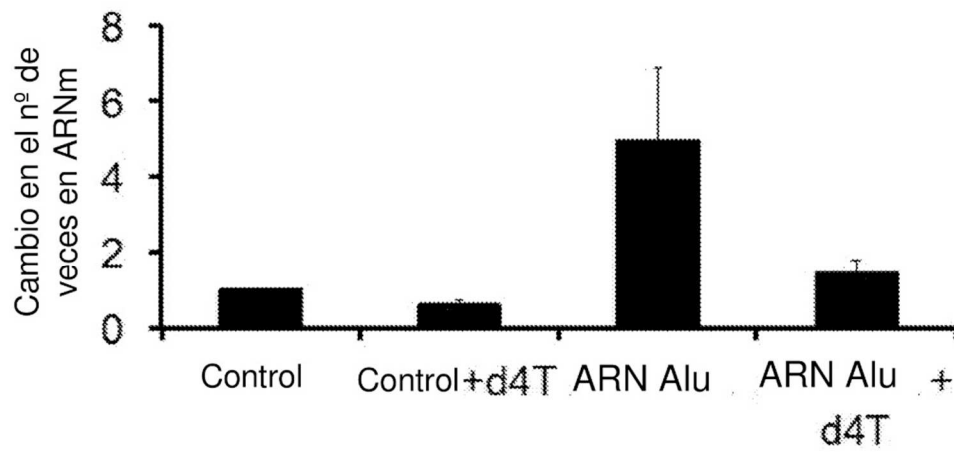


FIG. 13

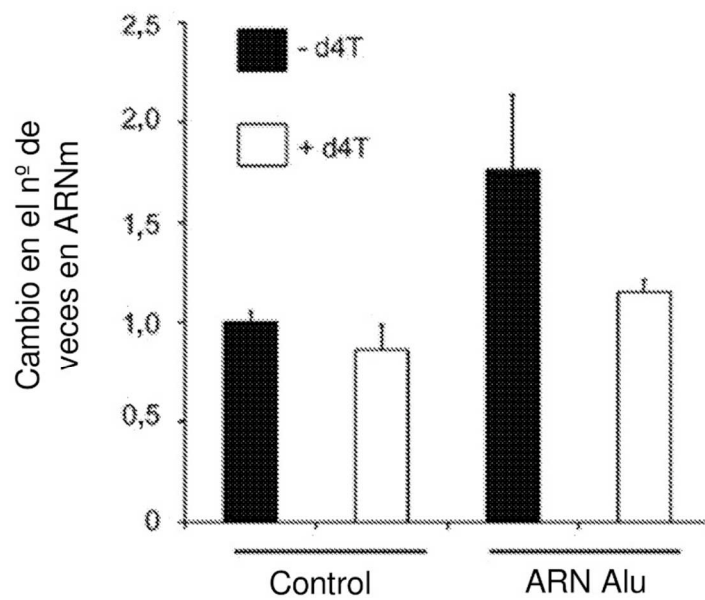


FIG. 14

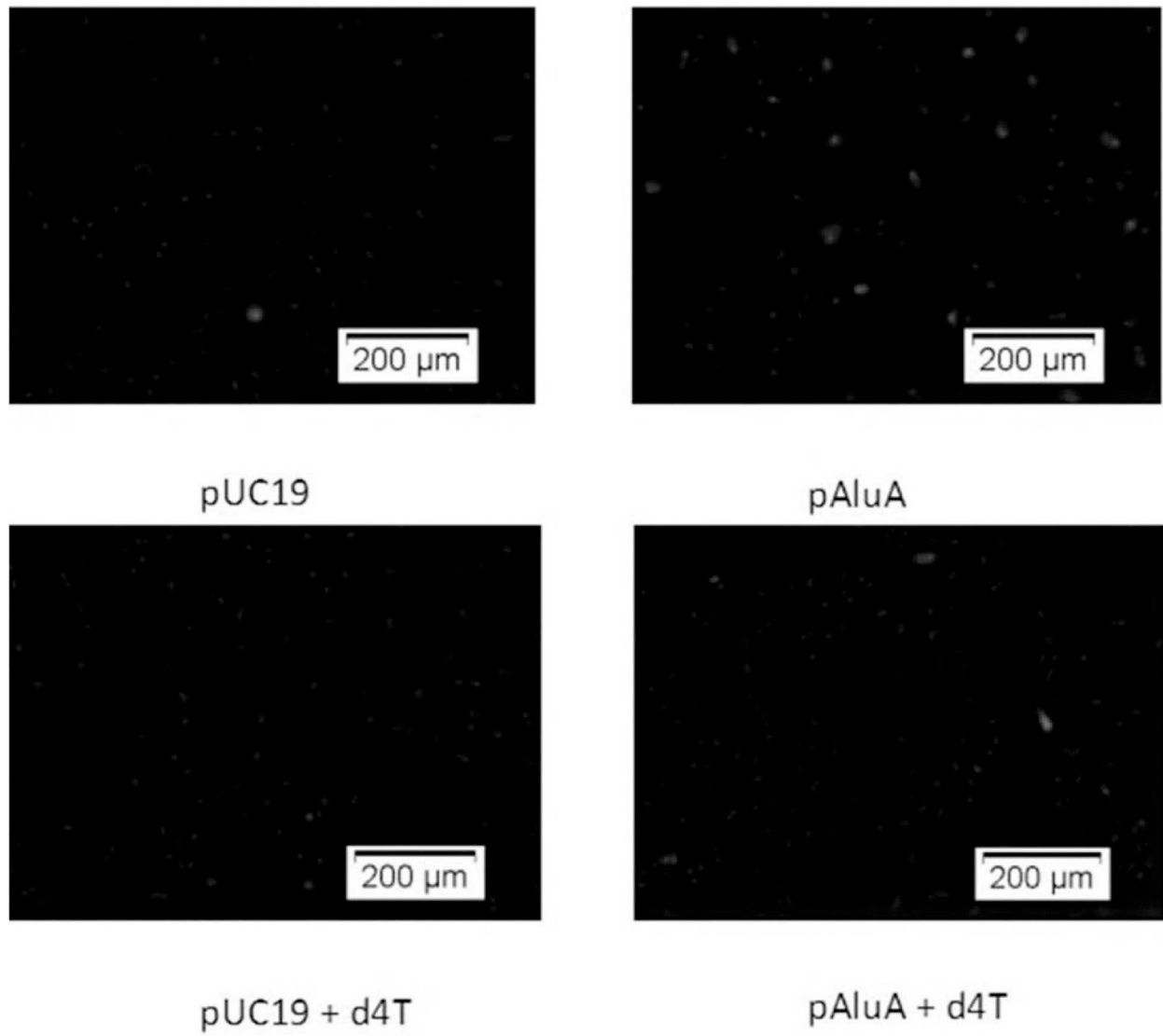


FIG. 15

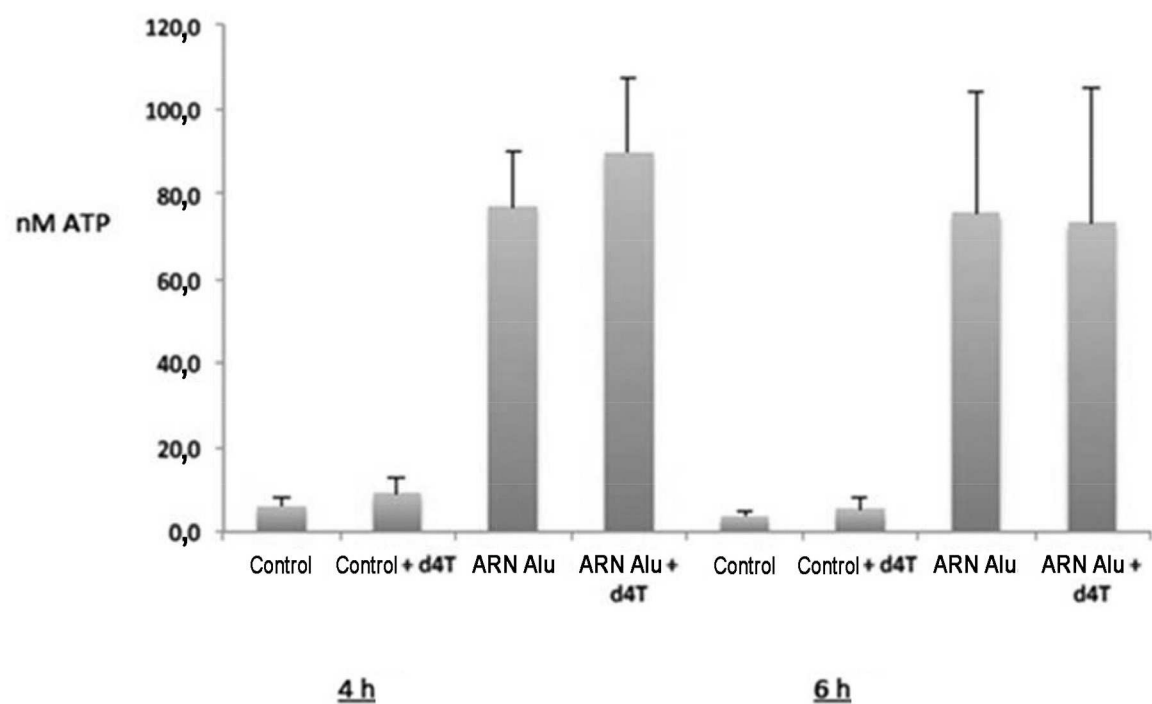


FIG. 16

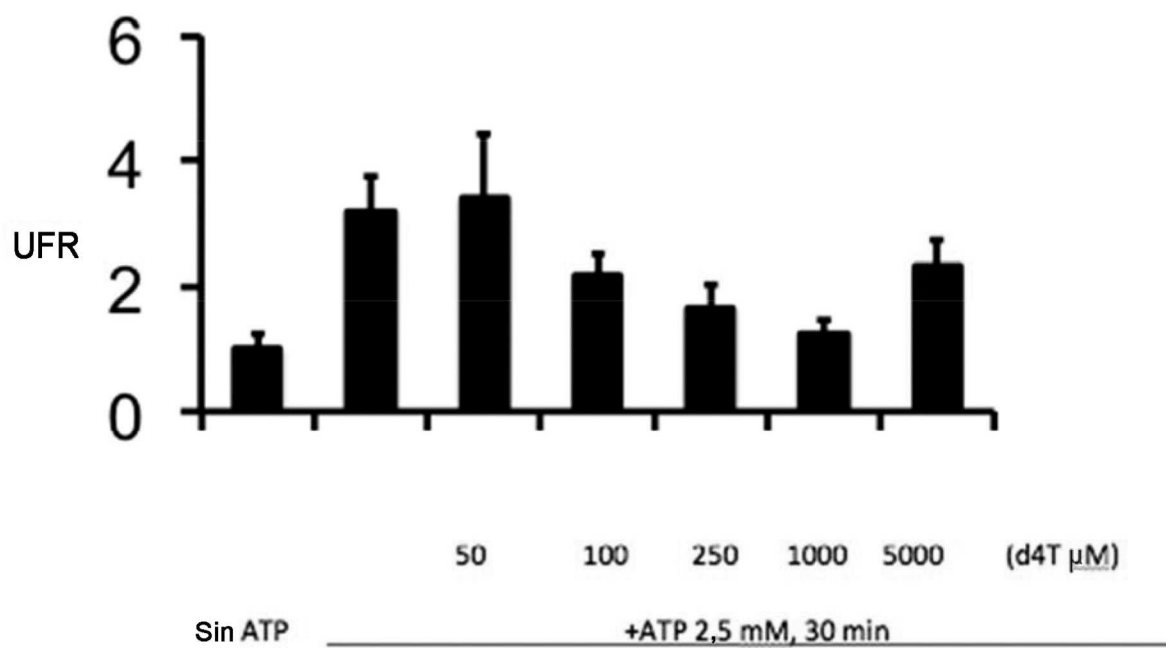


FIG. 17

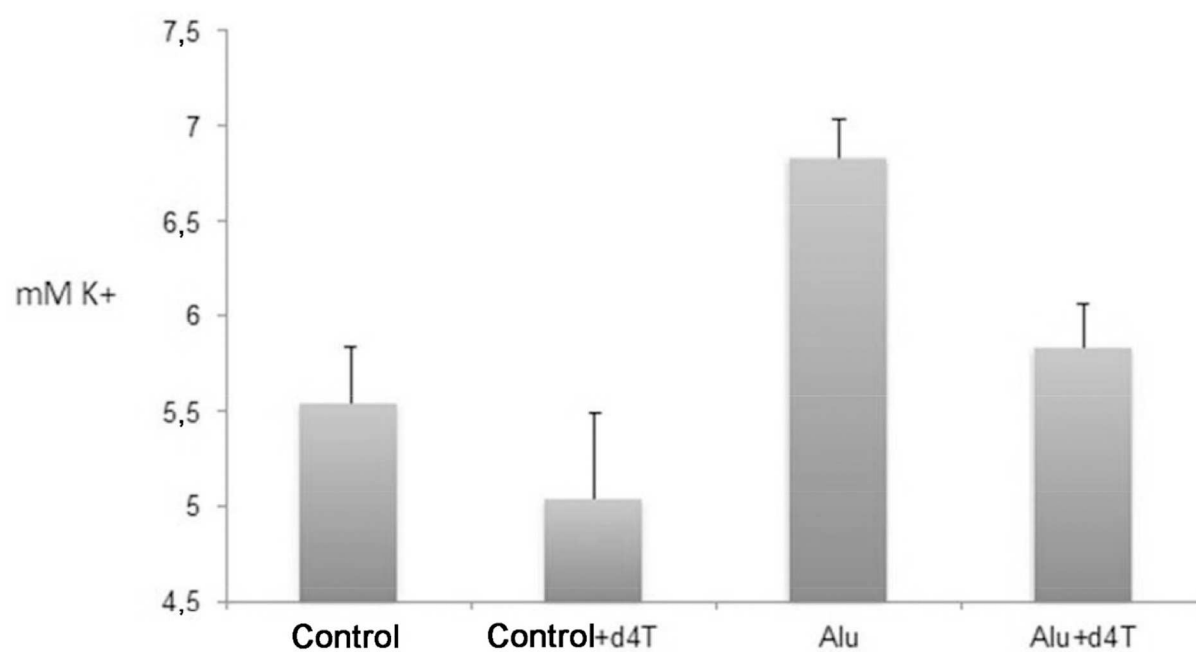


FIG. 18

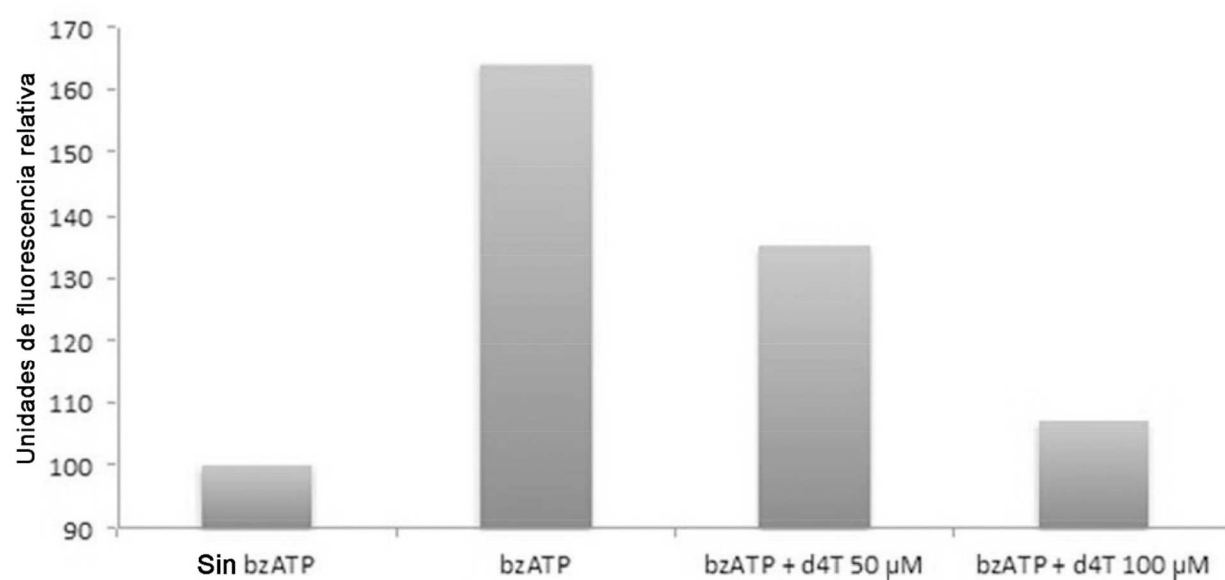


FIG. 19

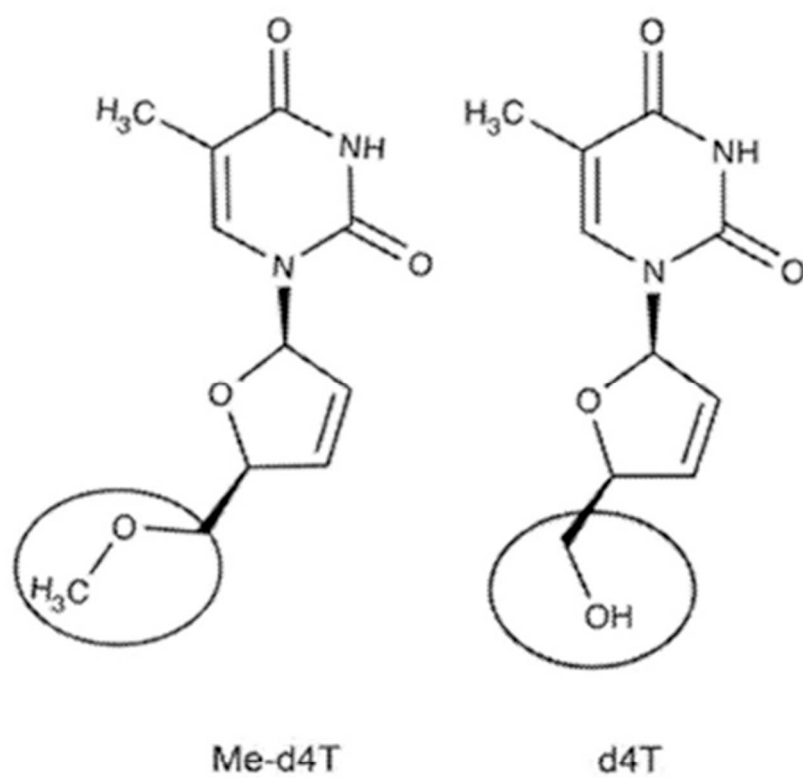


FIG. 20

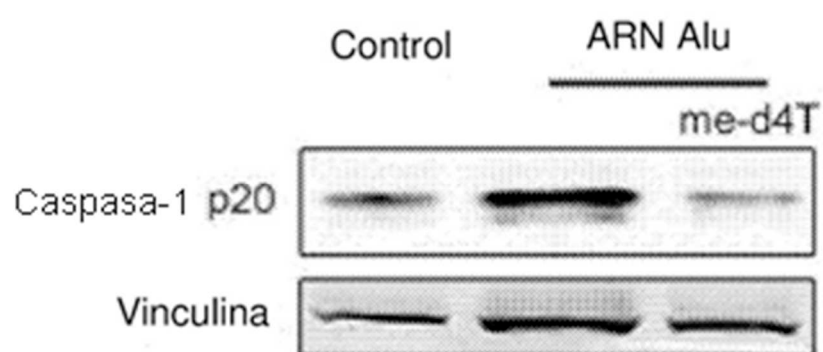


FIG. 21

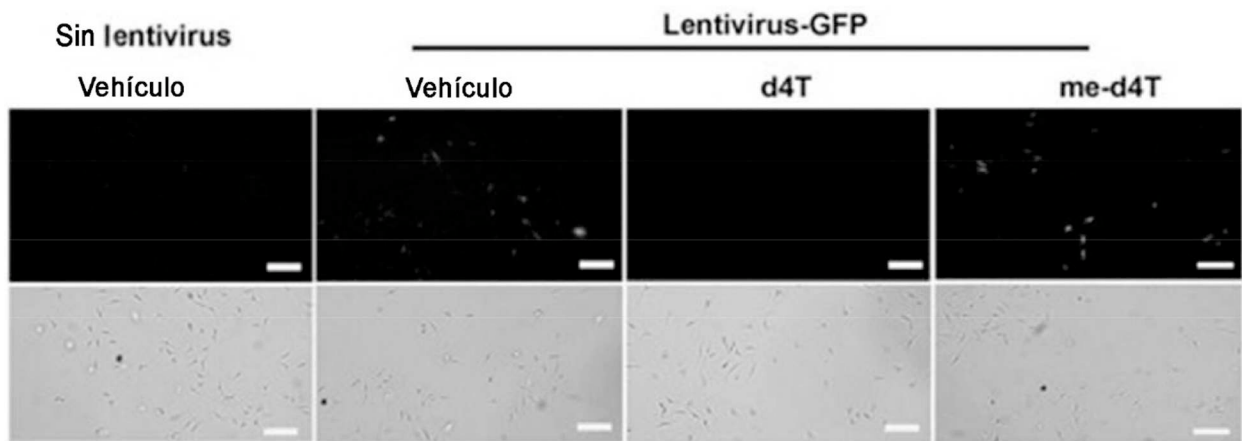


FIG. 22

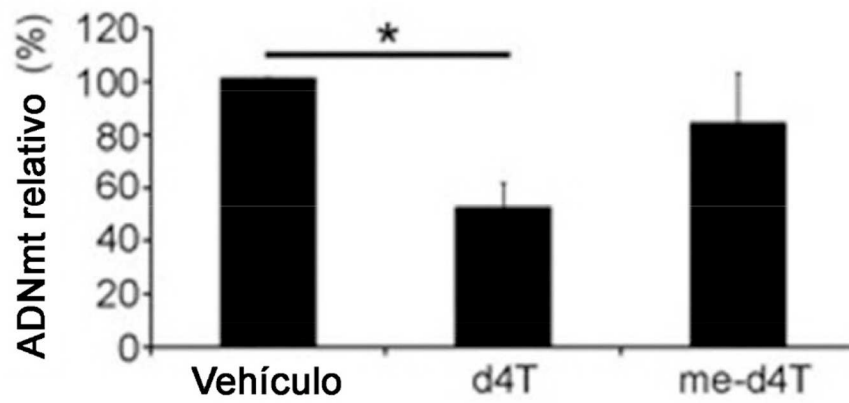


FIG. 23

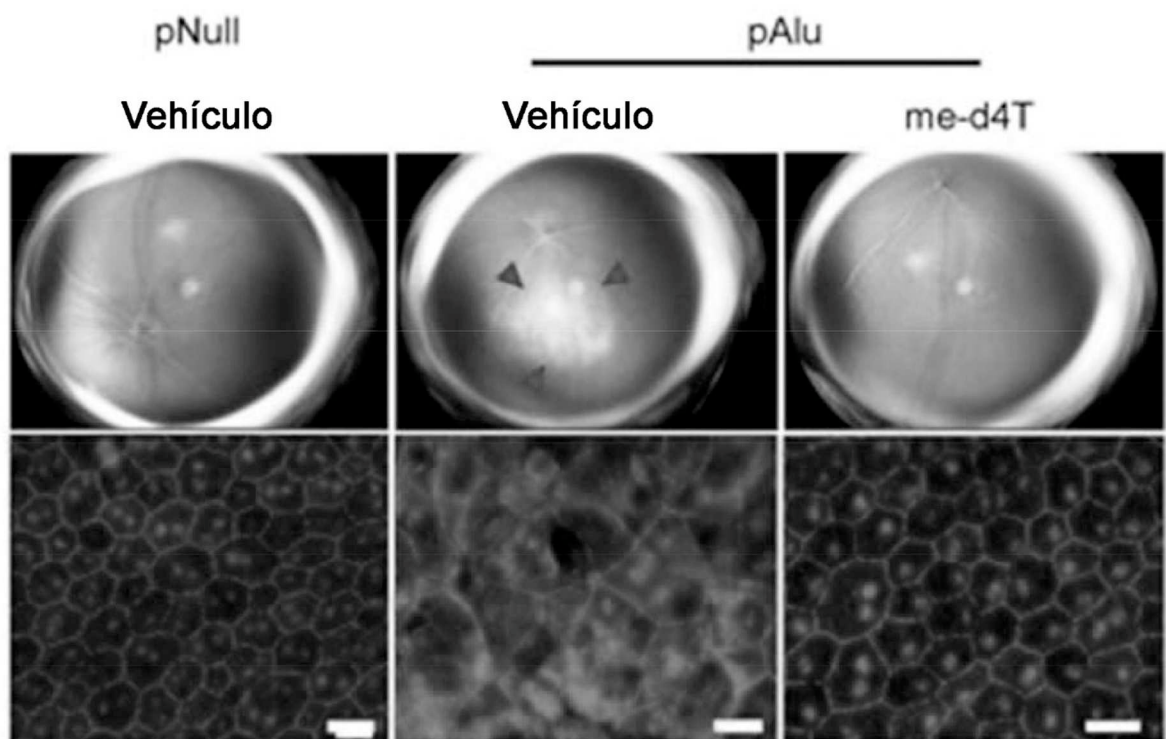


FIG. 24

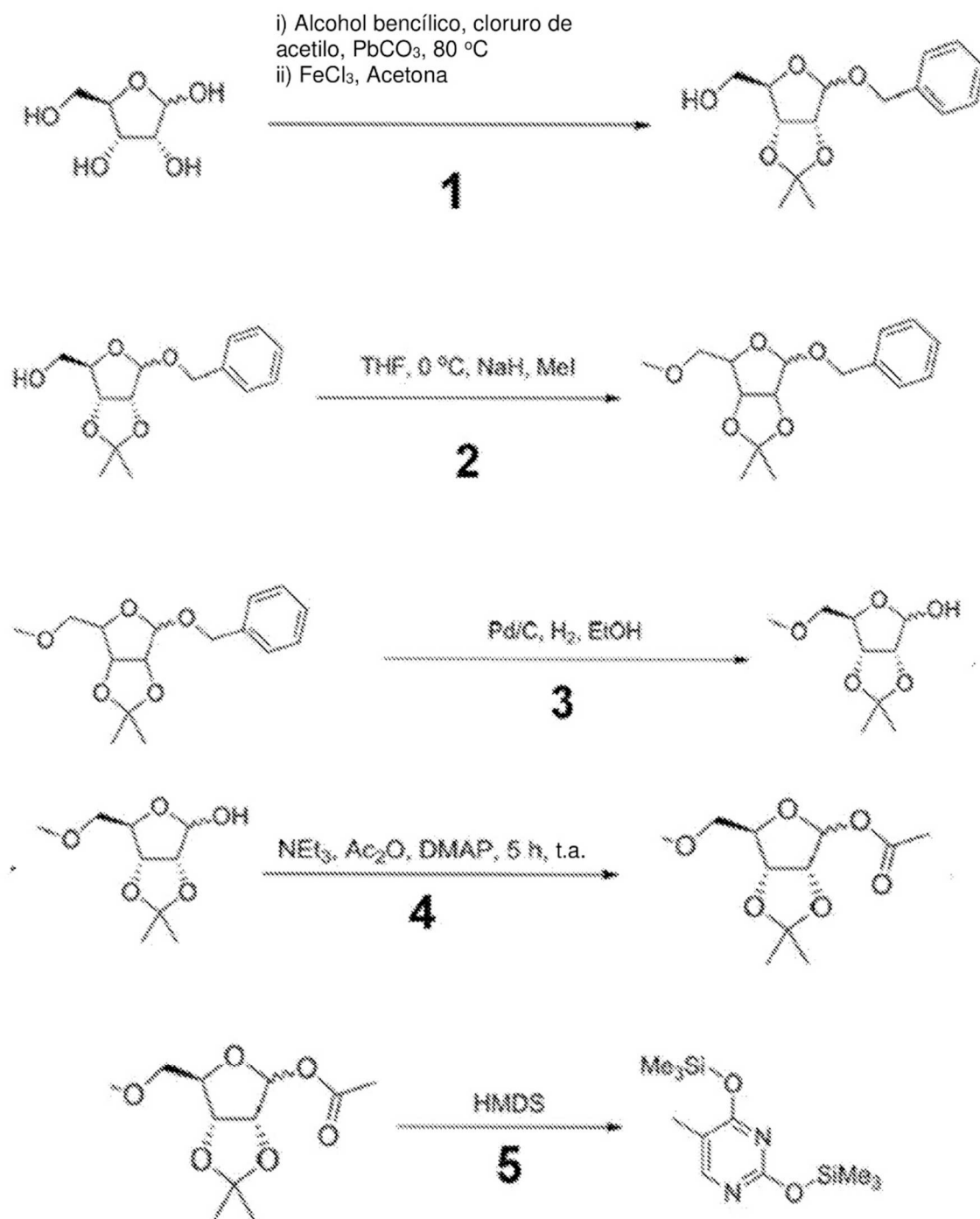


FIG. 25

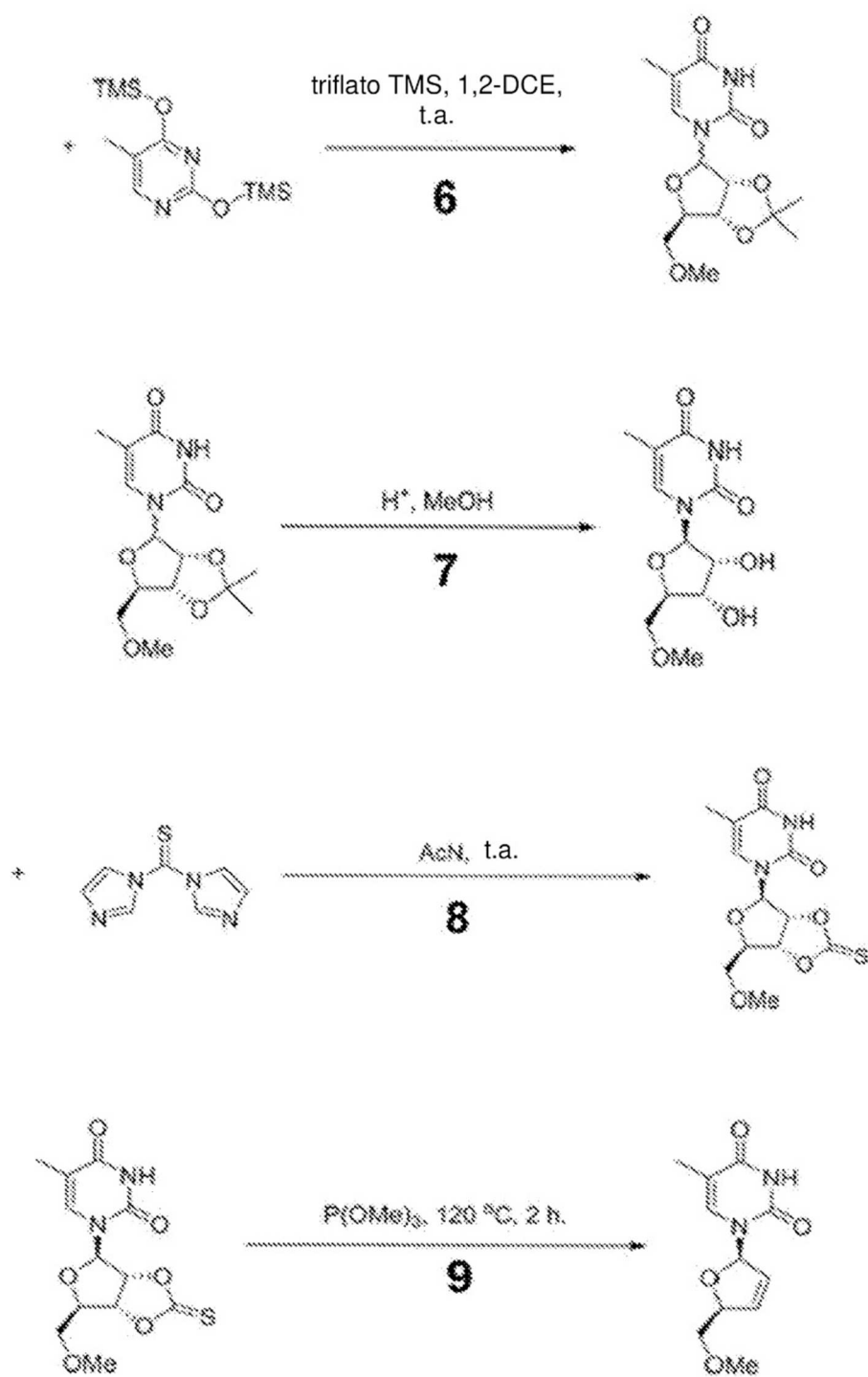


FIG. 25 (continuación)

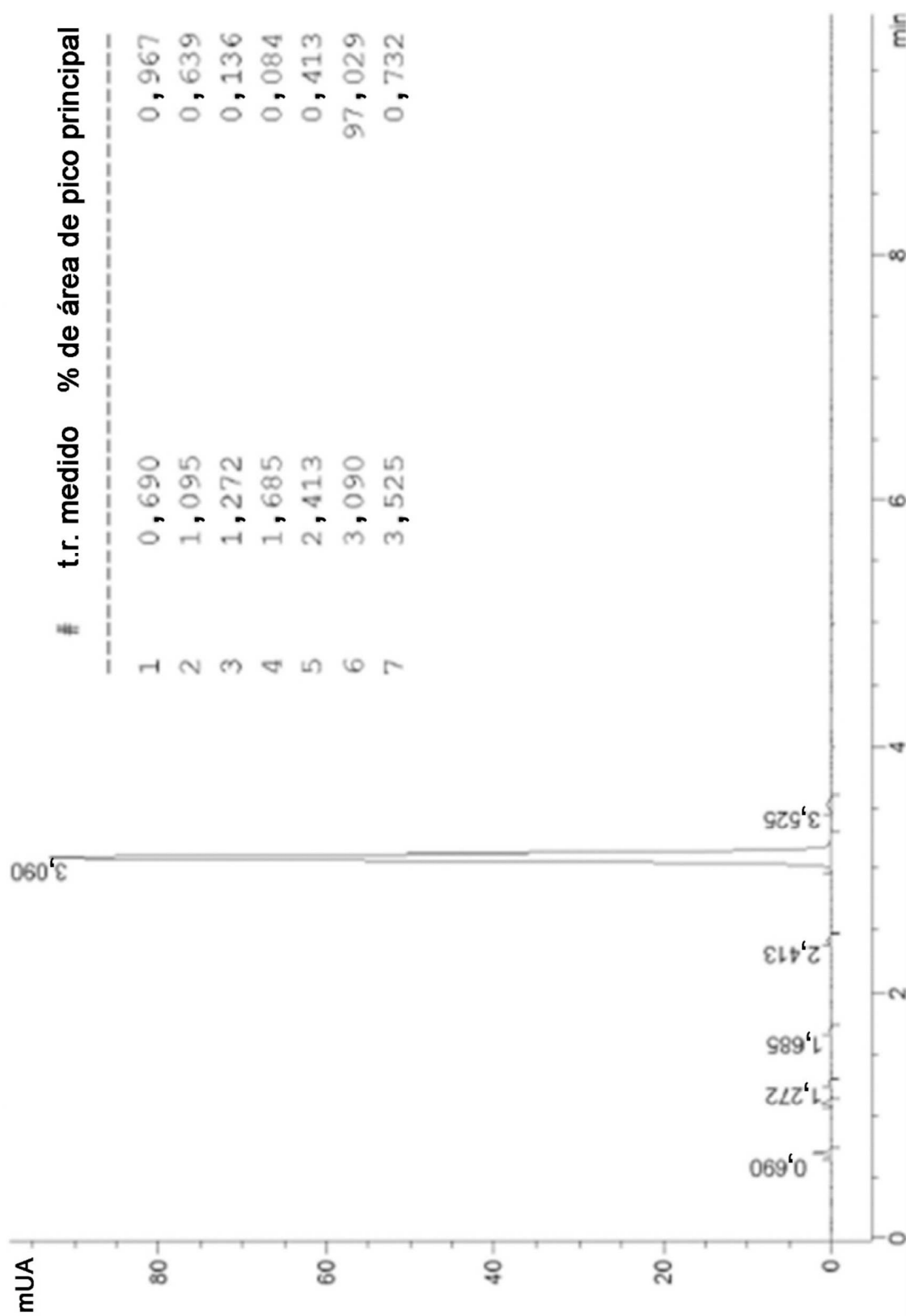


FIG. 26

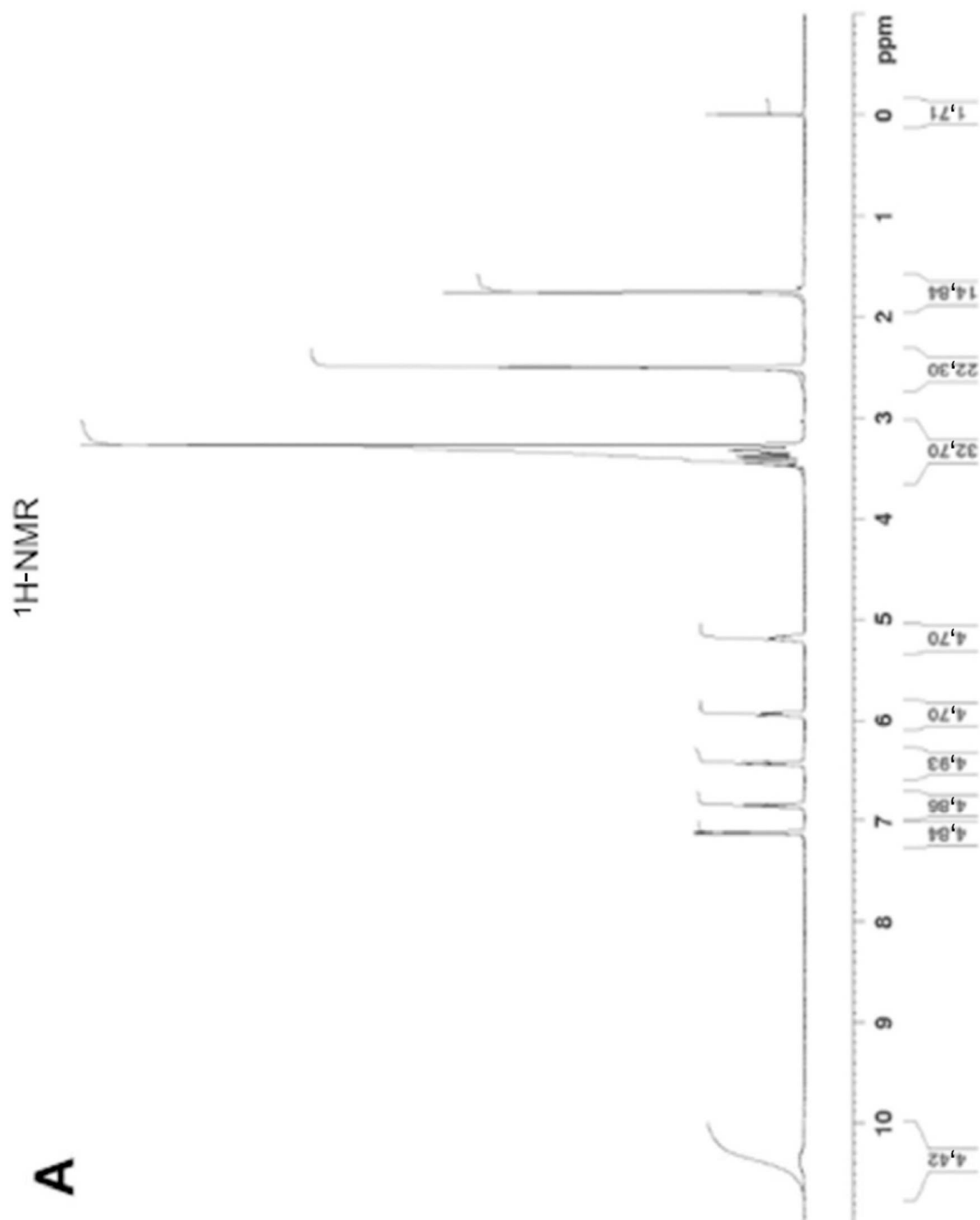


FIG. 27

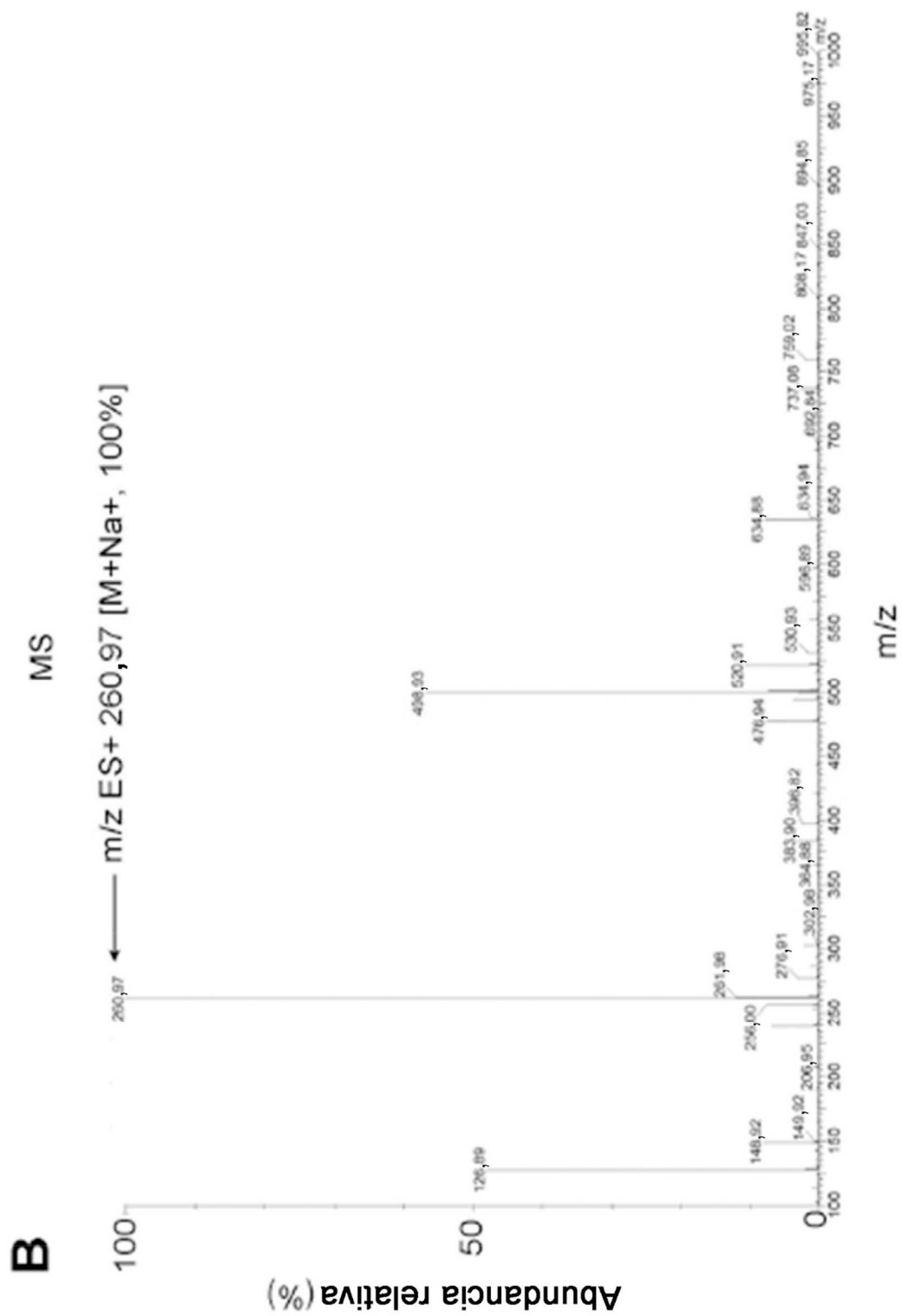


FIG. 28

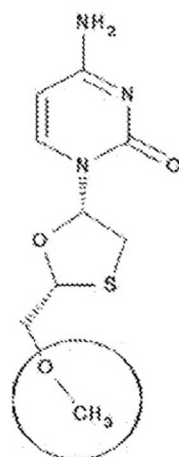


FIG. 29

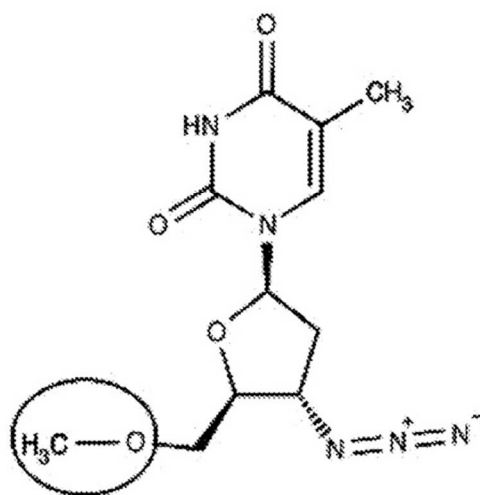


FIG. 30

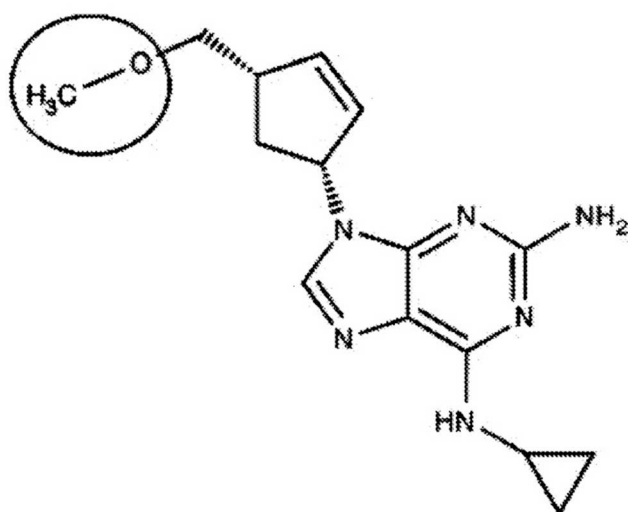


FIG. 31

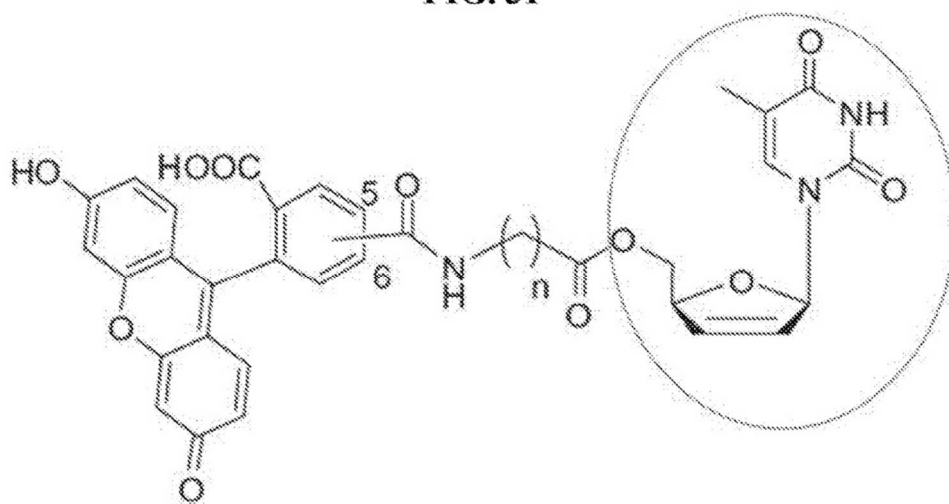


FIG. 32

ñ

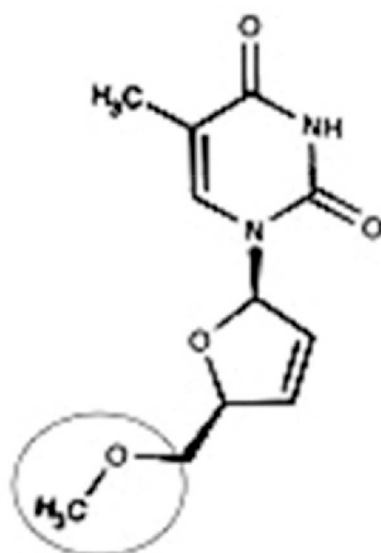


FIG. 33

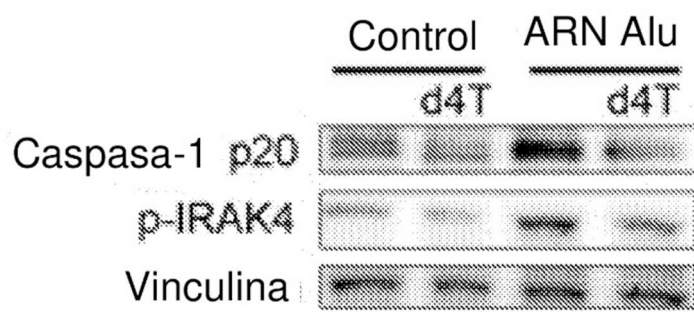


FIG. 34

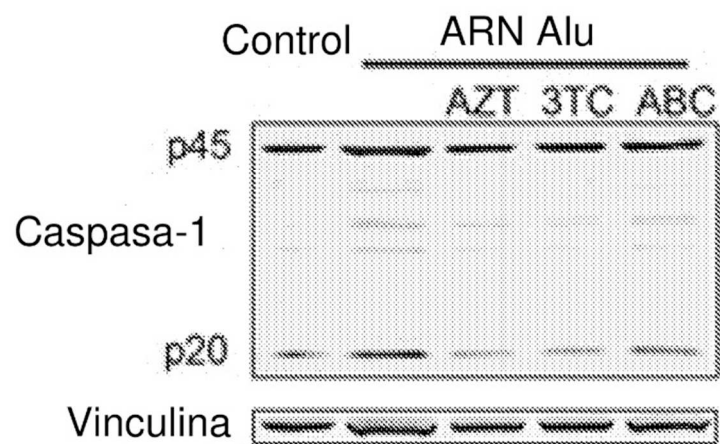


FIG. 35

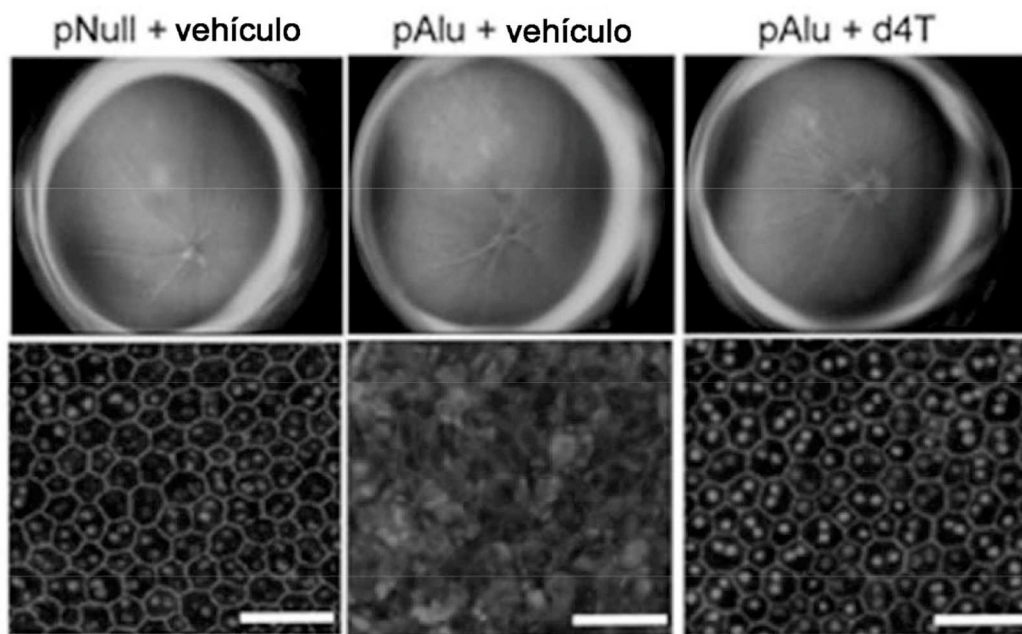


FIG. 36

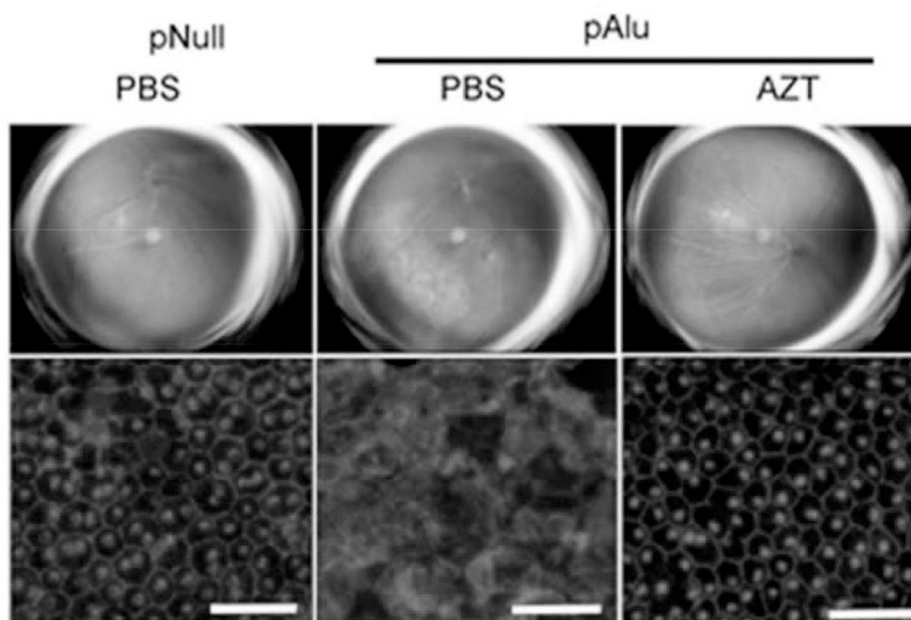


FIG. 37

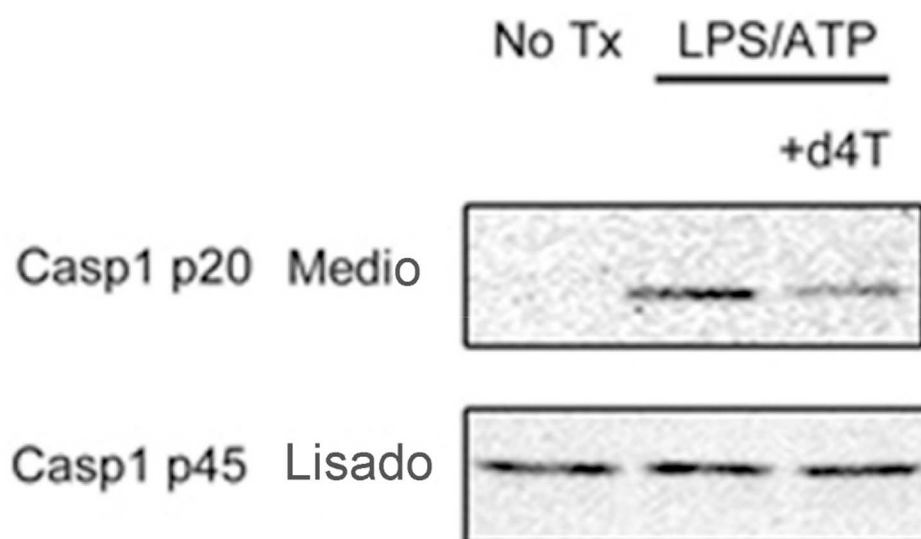


FIG. 38

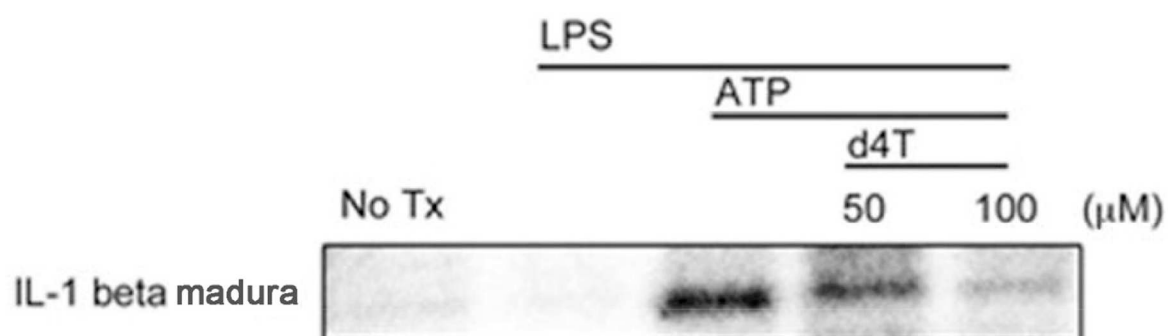


FIG. 39

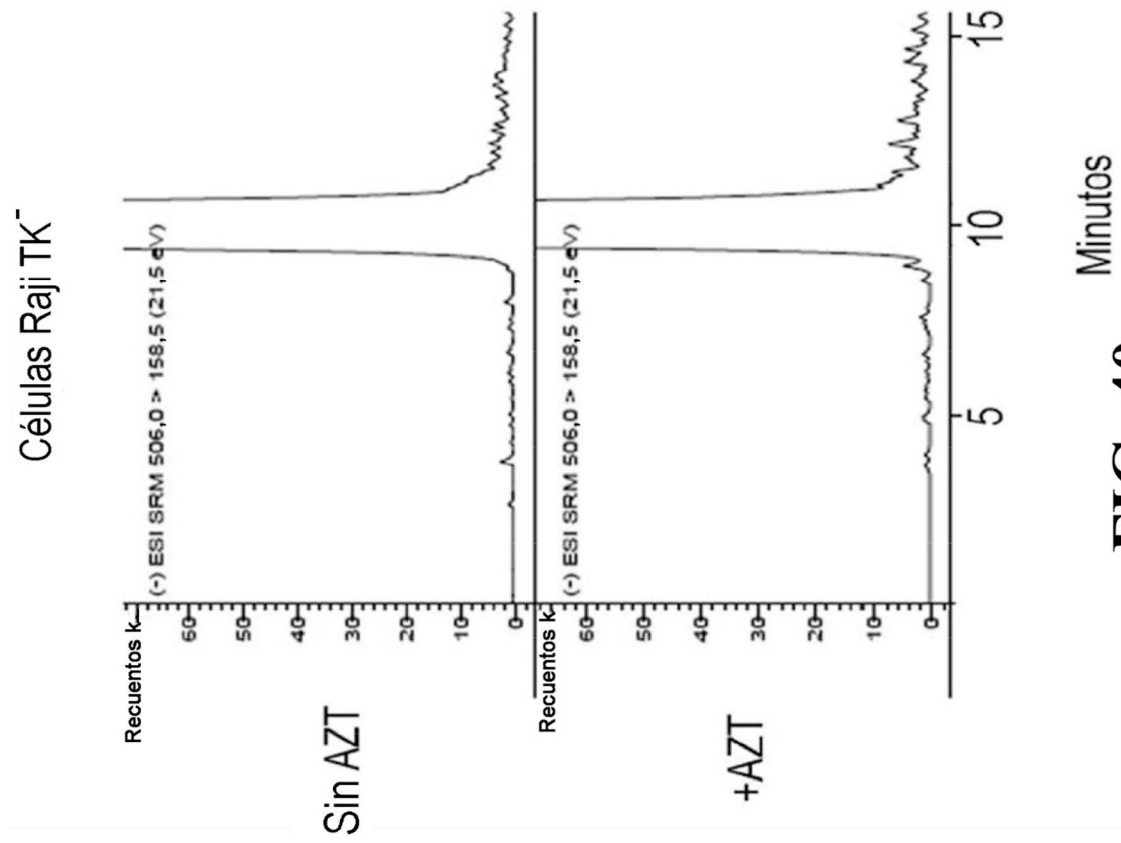


FIG. 40

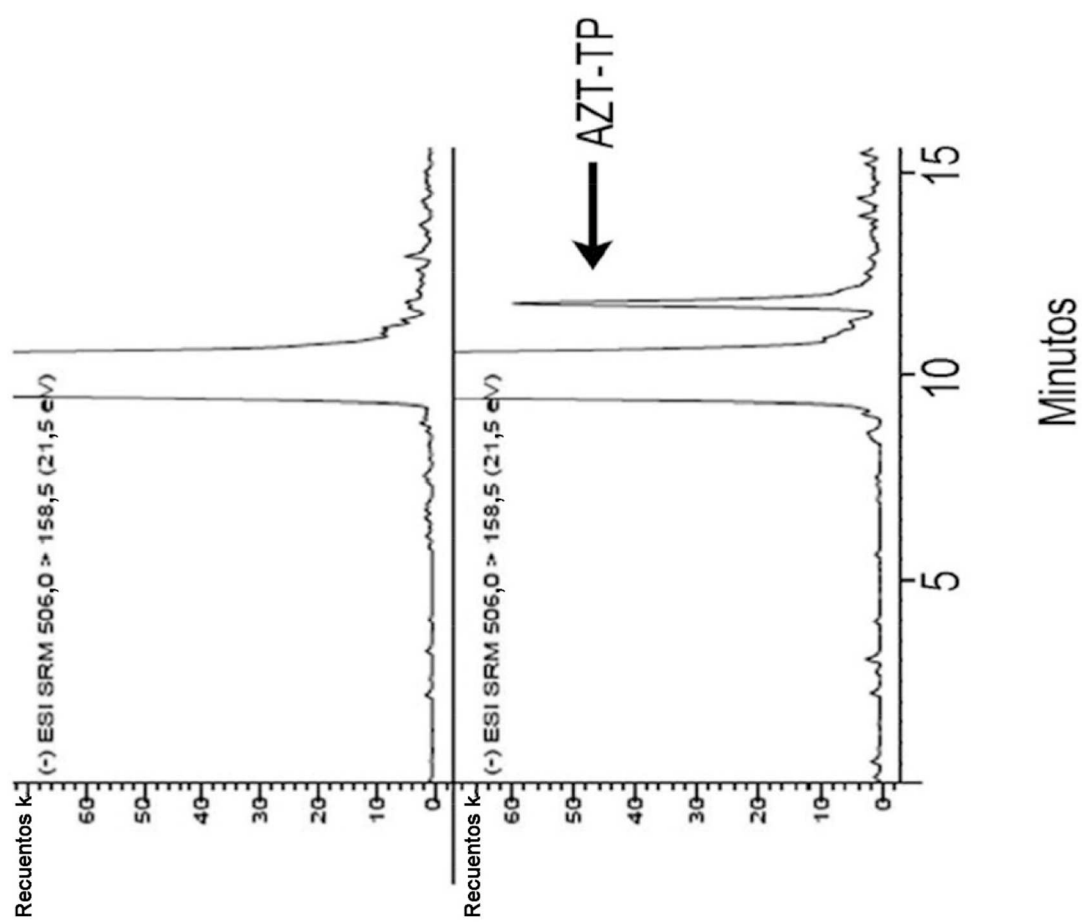


FIG. 40 (Continuación)

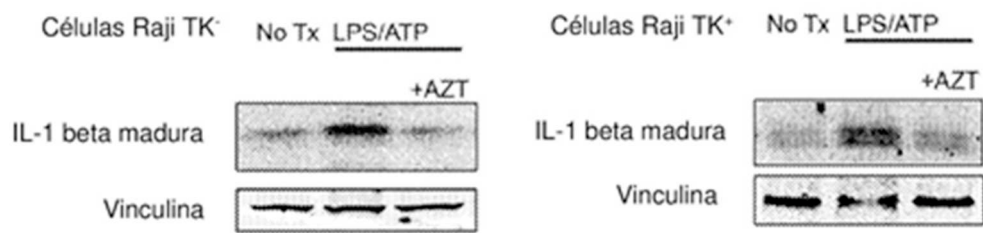


FIG. 41

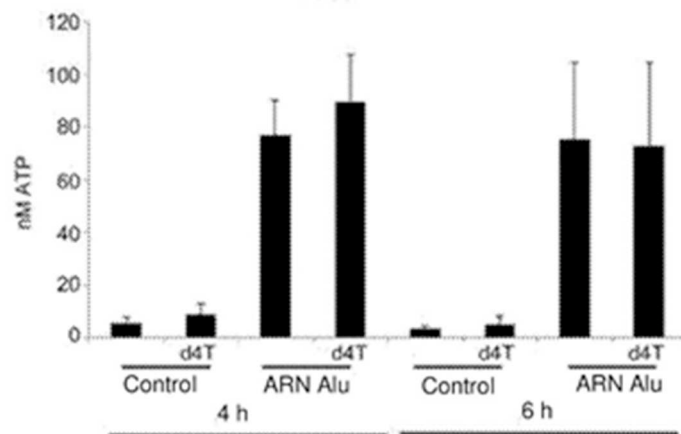


FIG. 42

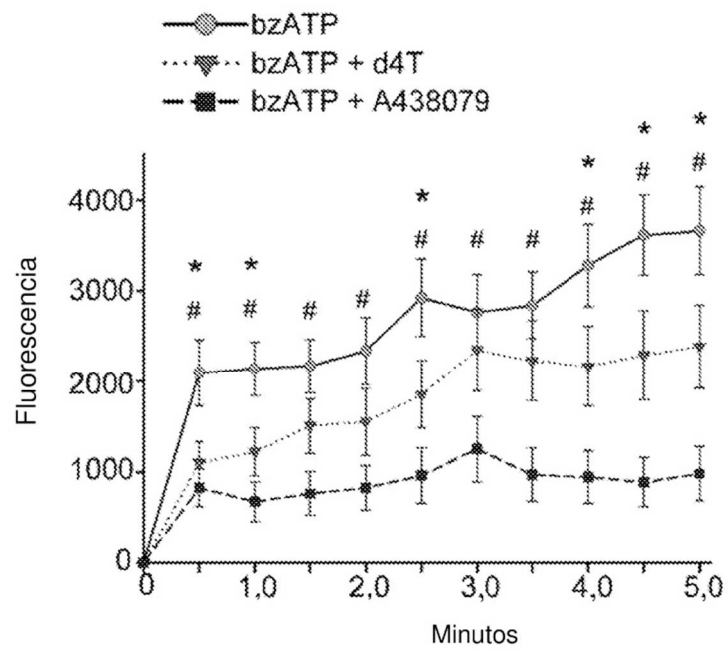


FIG. 43

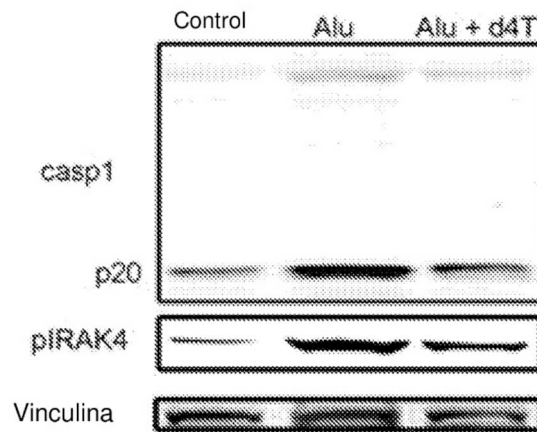


FIG. 44

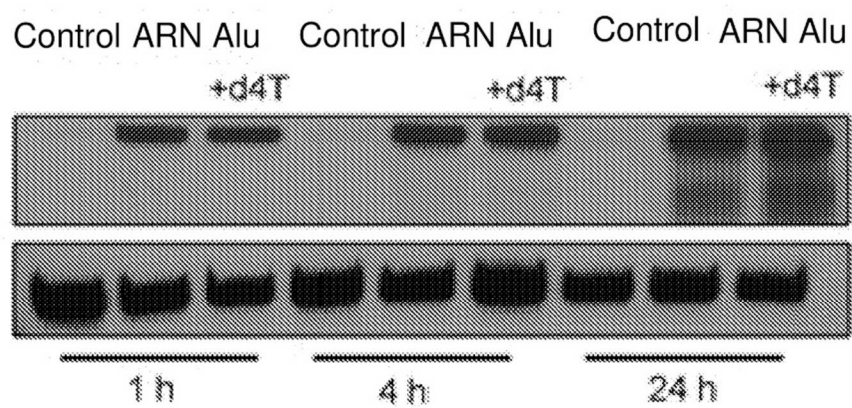


FIG. 45

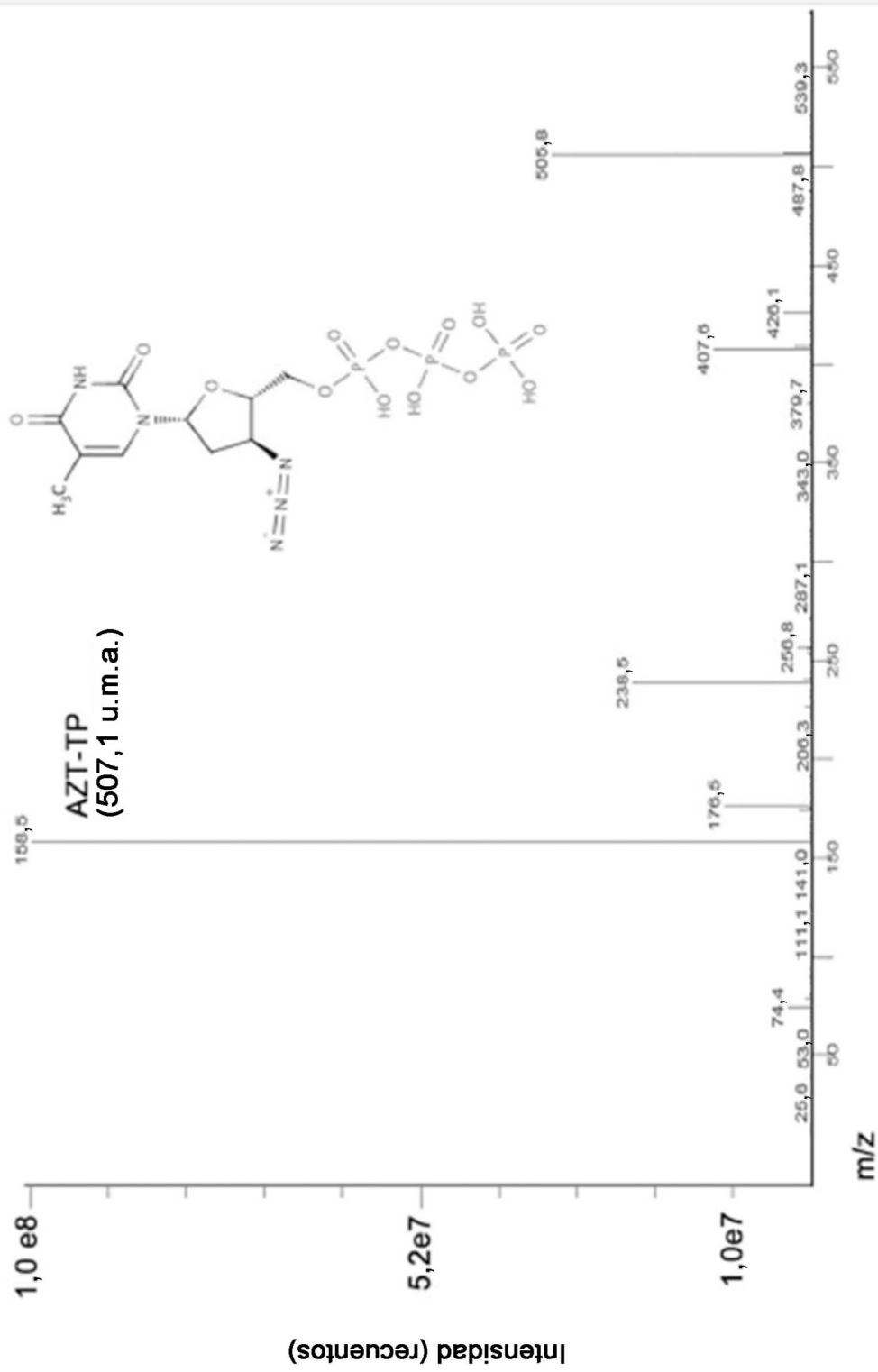


FIG. 46

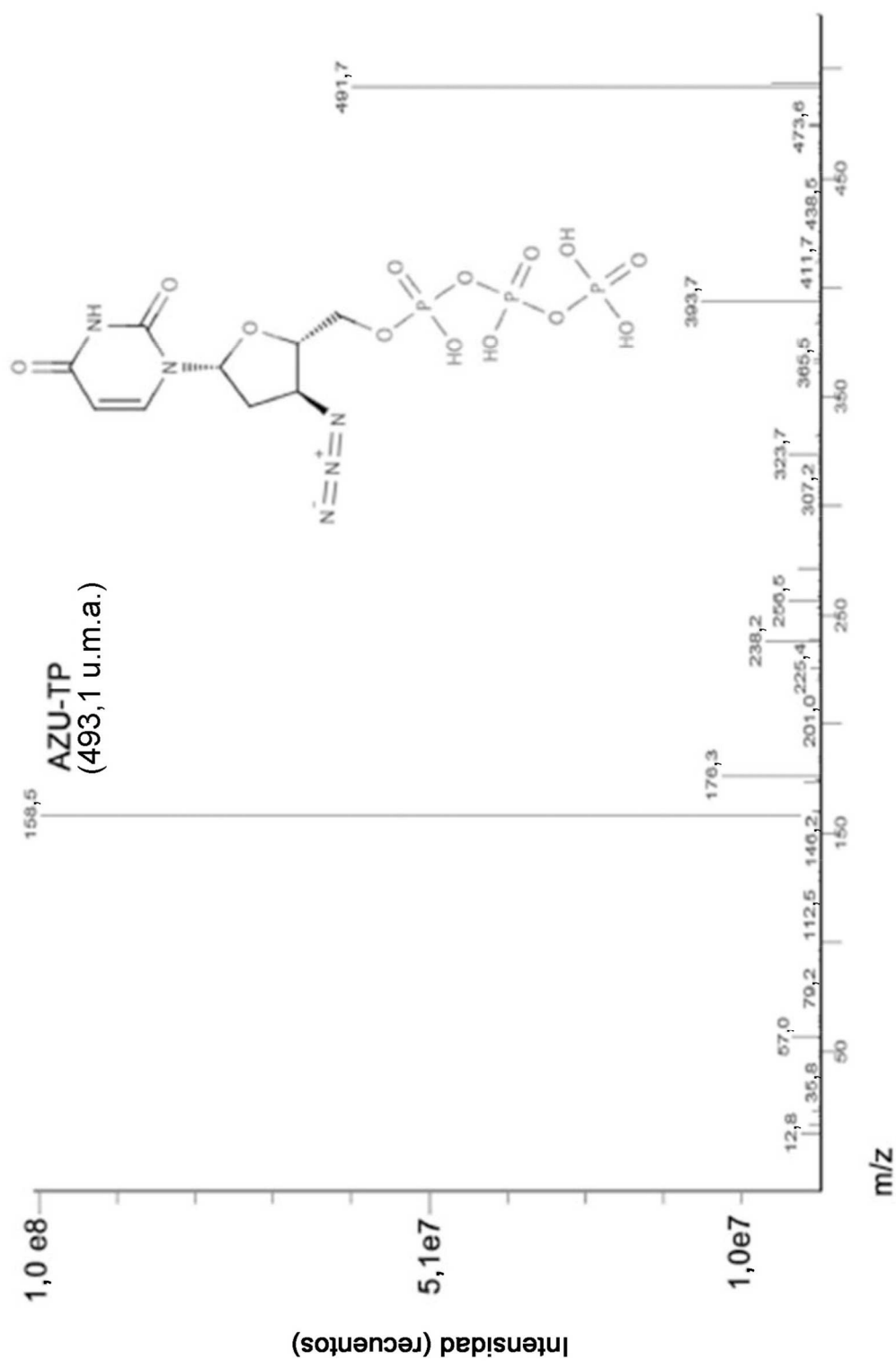


FIG. 47

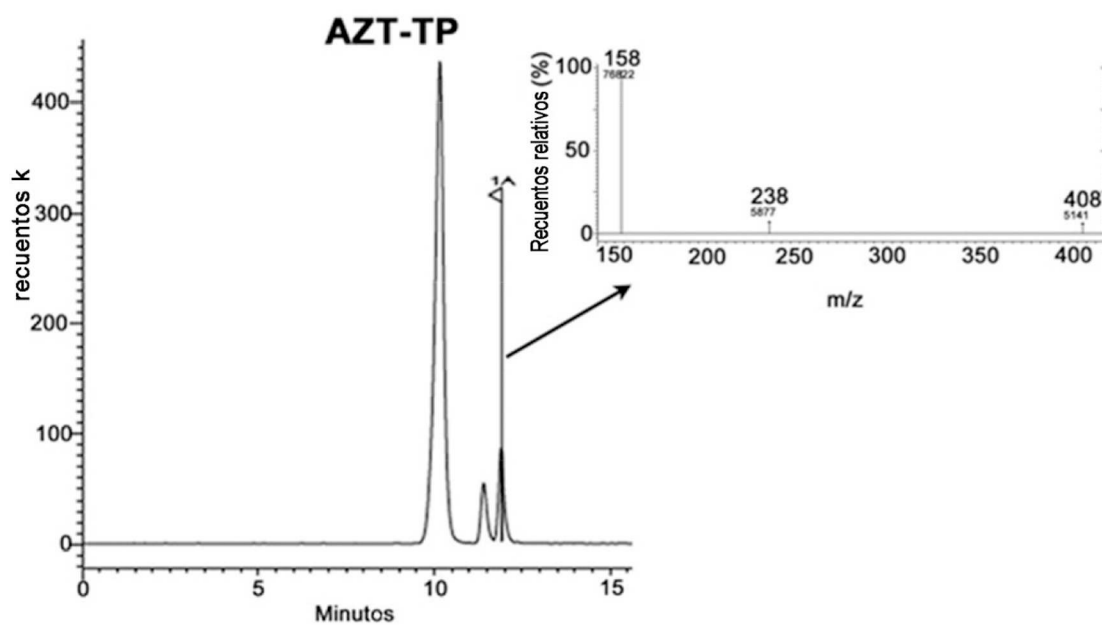


FIG. 48

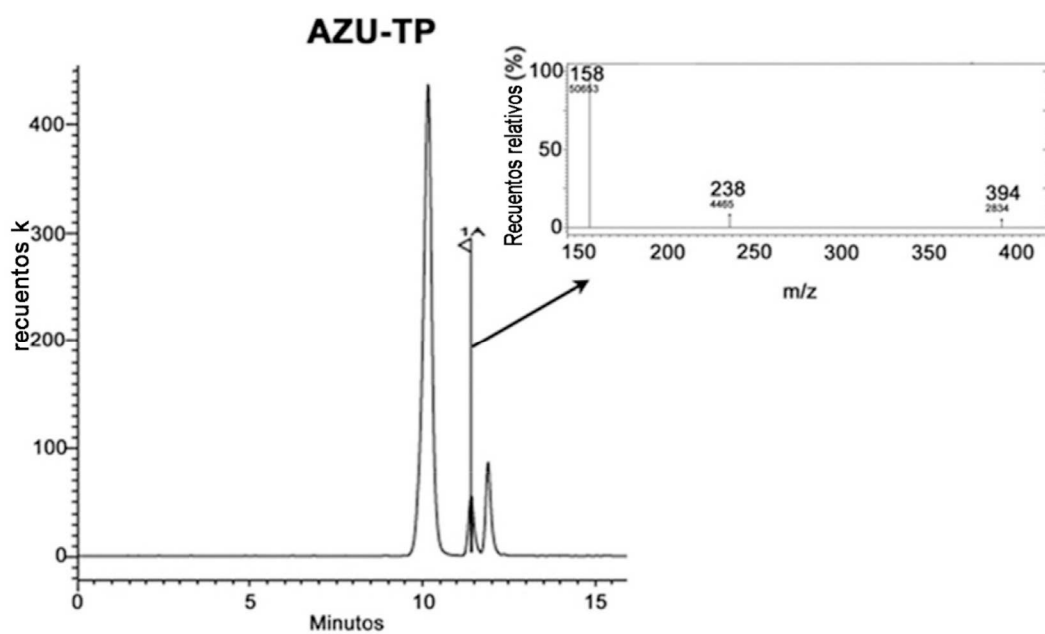


FIG. 49

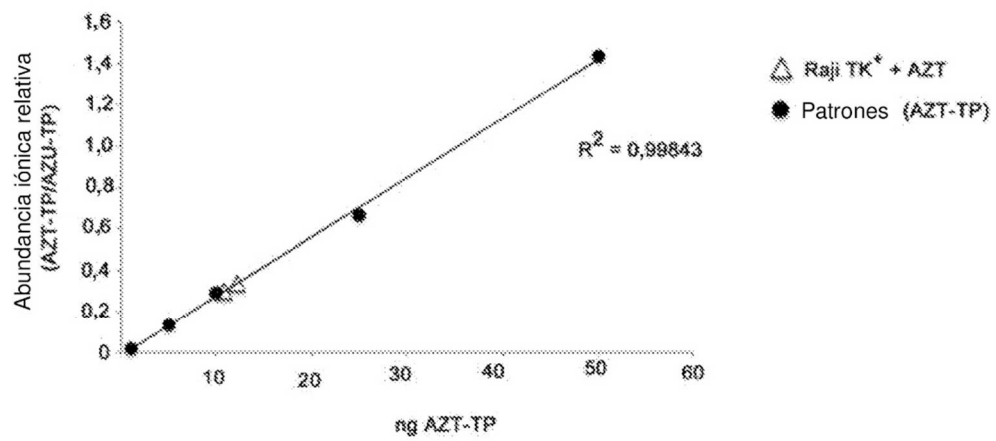


FIG. 50

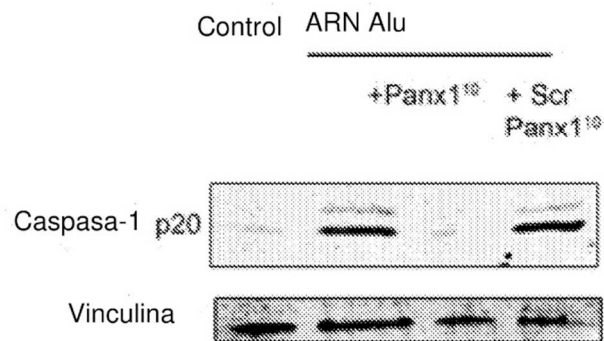


FIG. 51

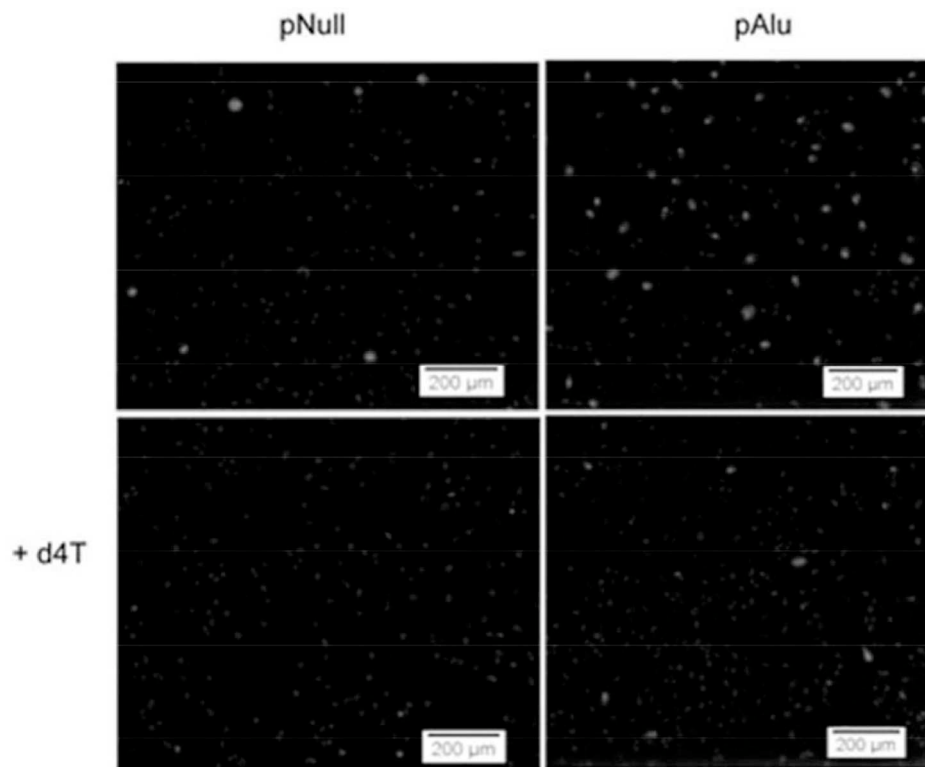


FIG. 54

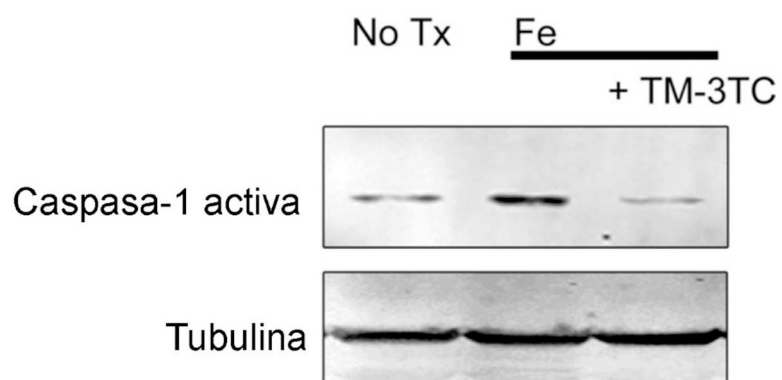


FIG. 55

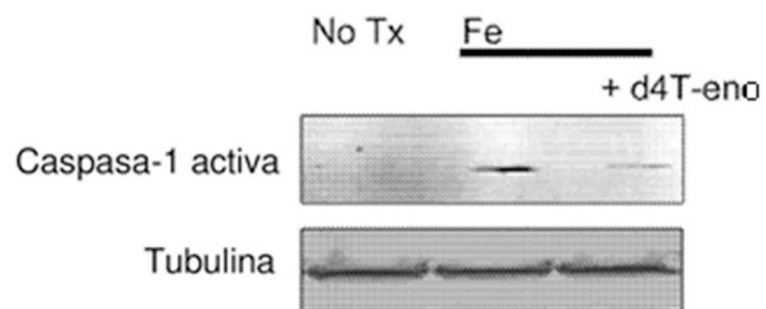


FIG. 56

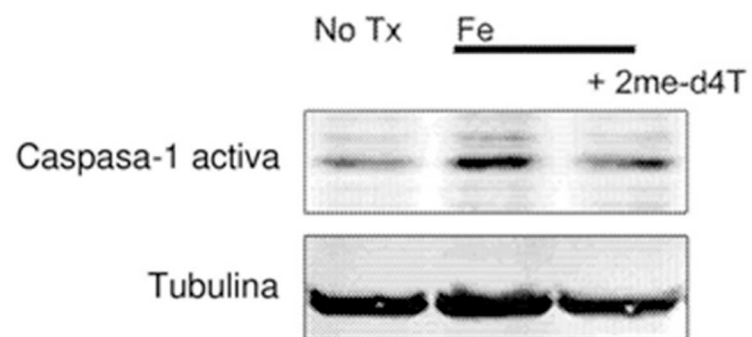


FIG. 57

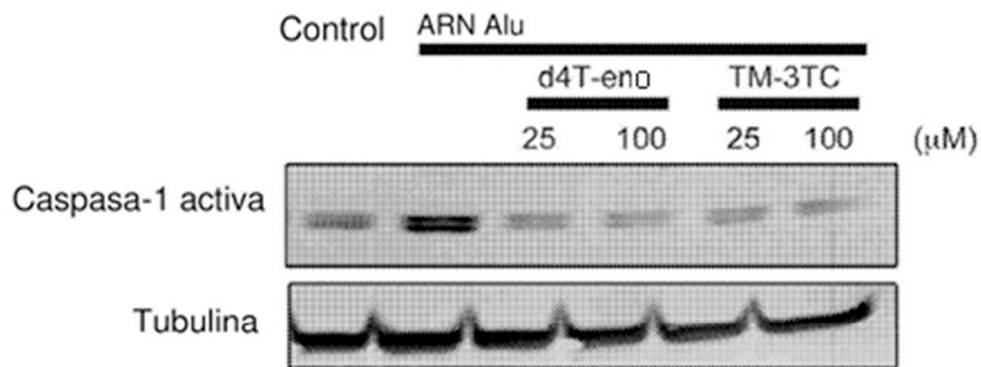


FIG. 58

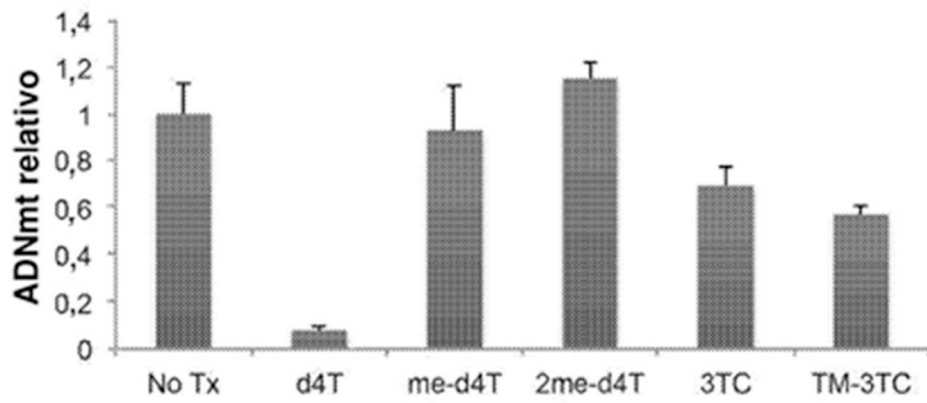


FIG. 59

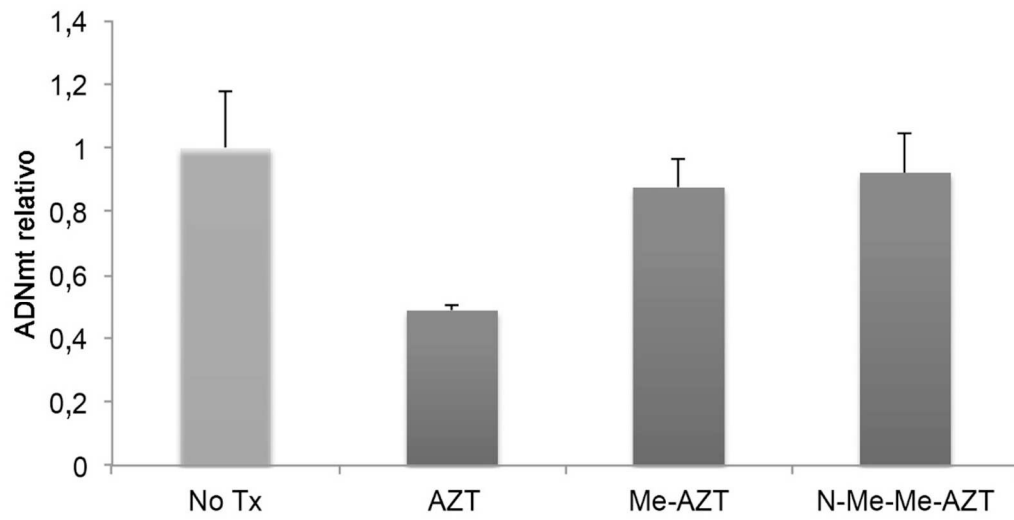


FIG. 60

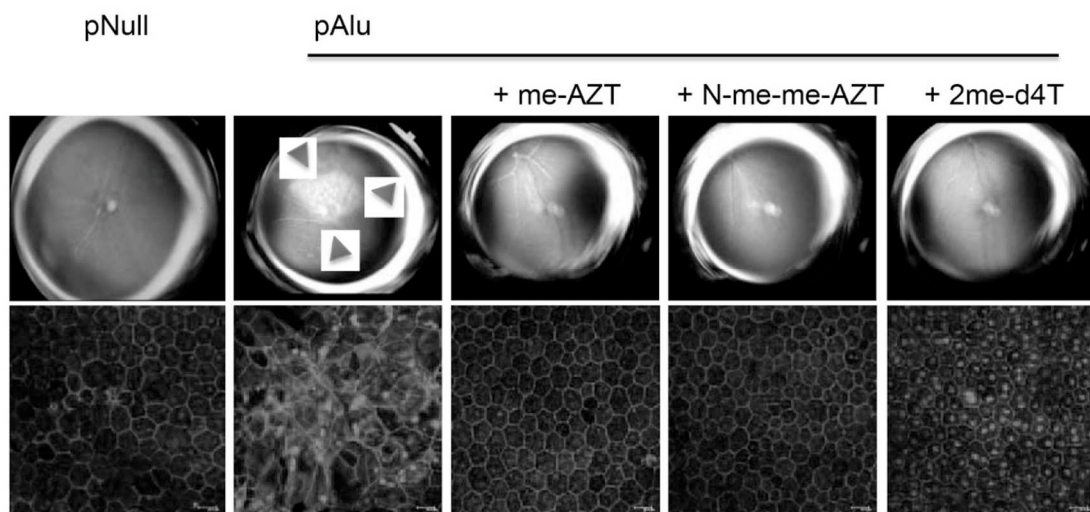


FIG. 61

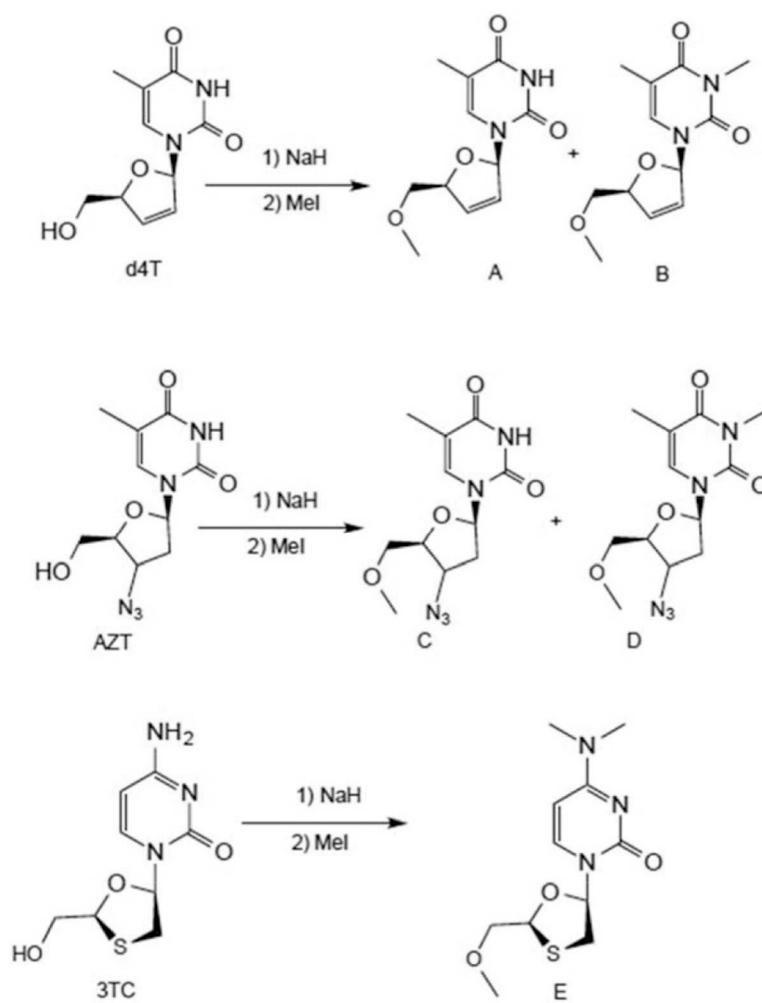


FIG. 62

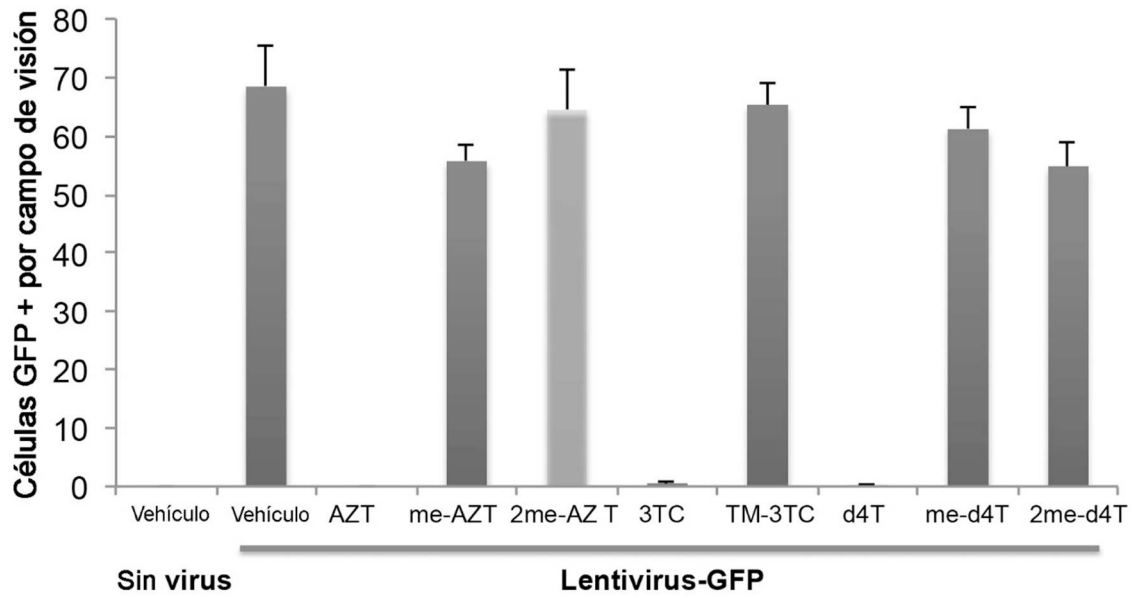


FIG. 63

Ensayo luminiscente de células iGluc

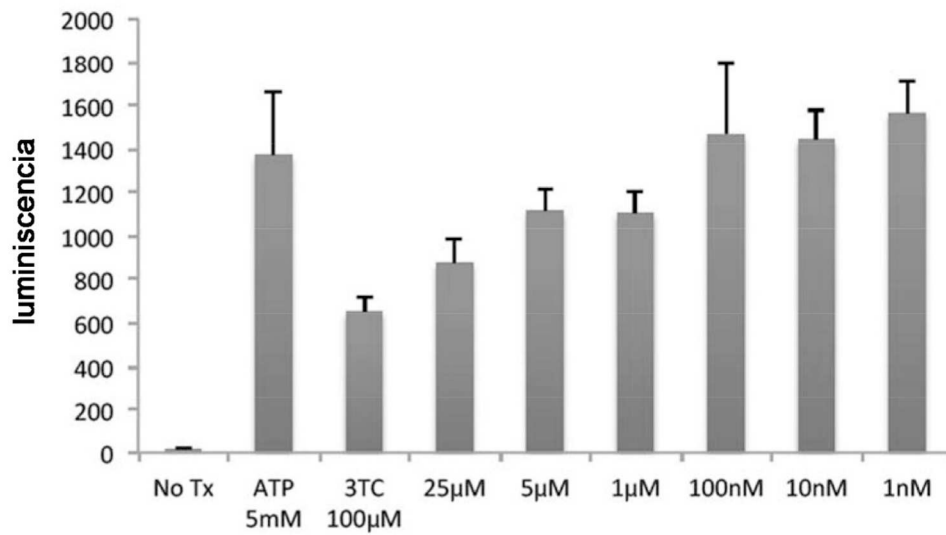


FIG. 64

Ensayo luminiscente de células iGluc

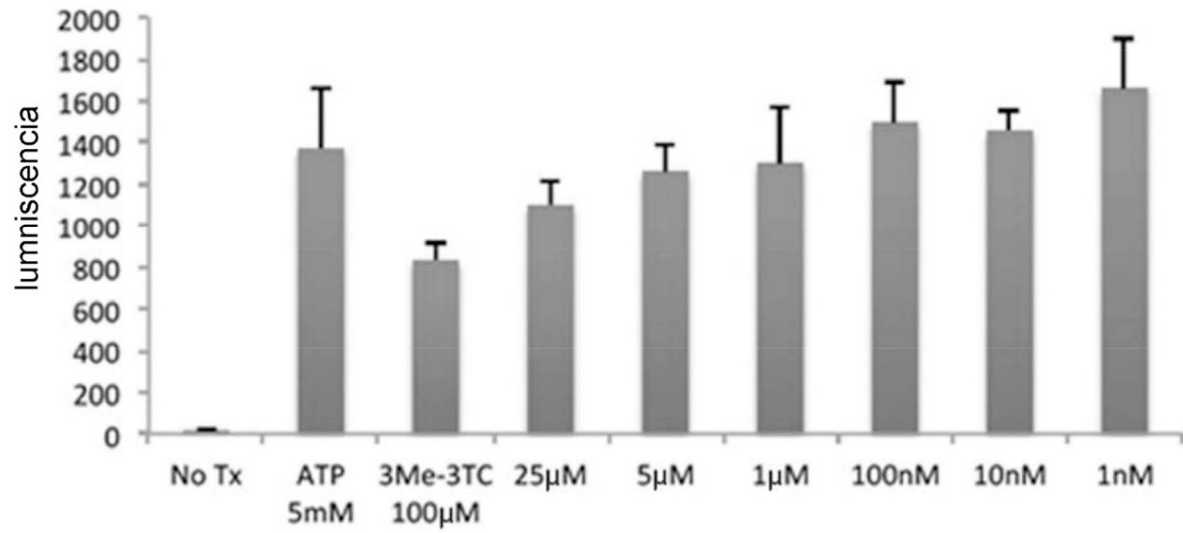


FIG. 65

Ensayo luminiscente de células iGluc

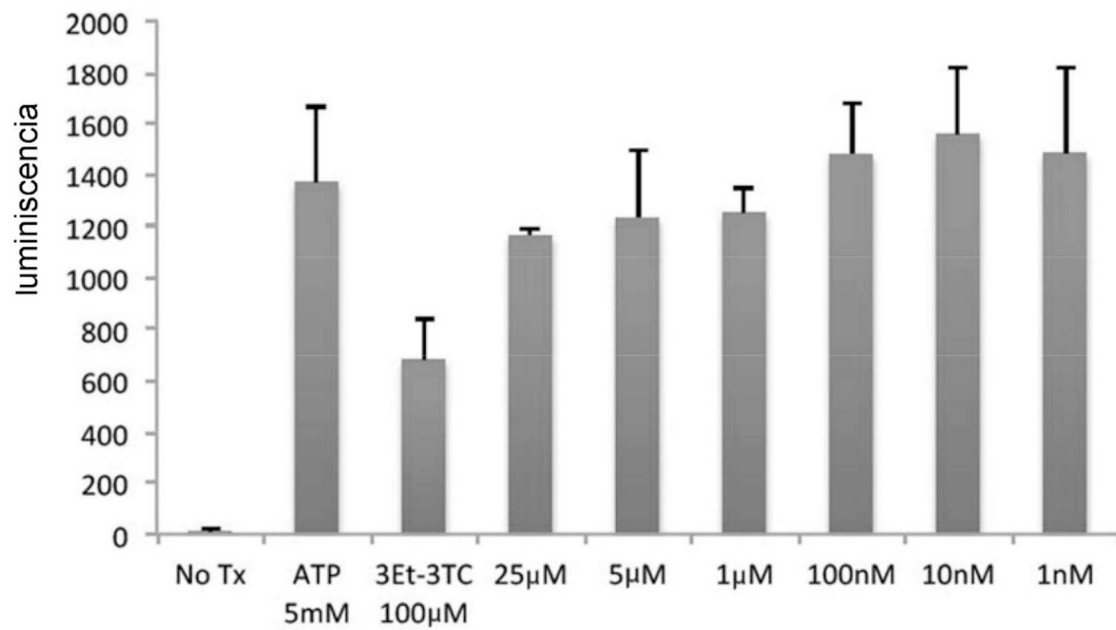


FIG. 66

Ensayo luminiscente de células iGluc

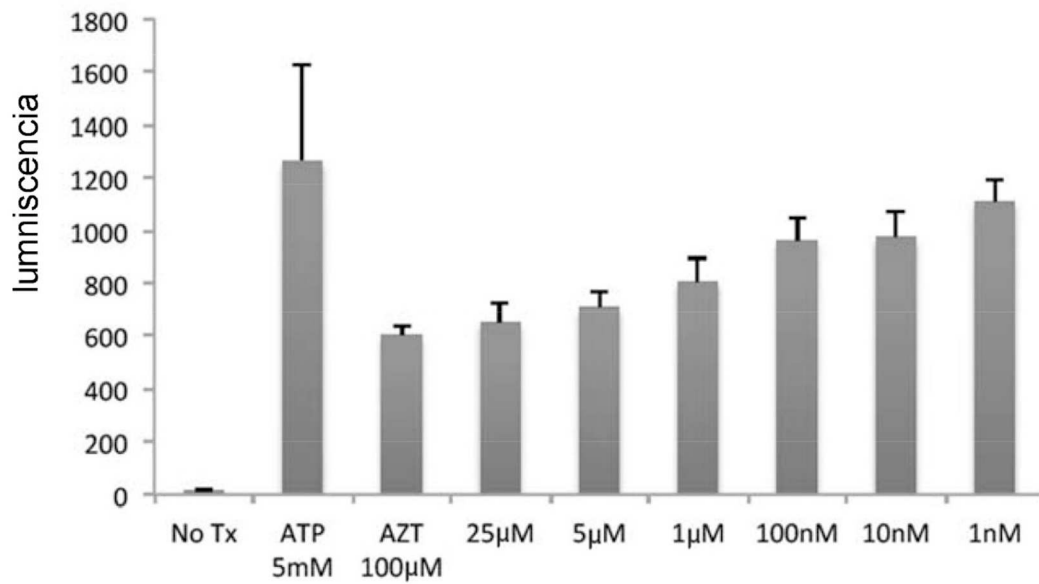


FIG. 67

Ensayo luminiscente de células iGluc

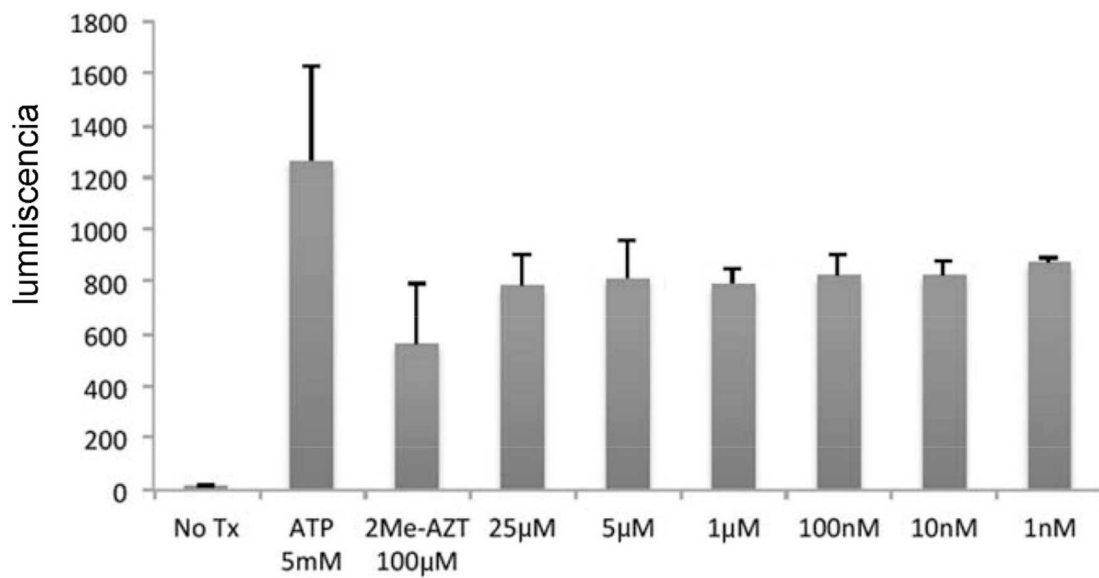


FIG. 68

Ensayo luminiscente de células iGluc

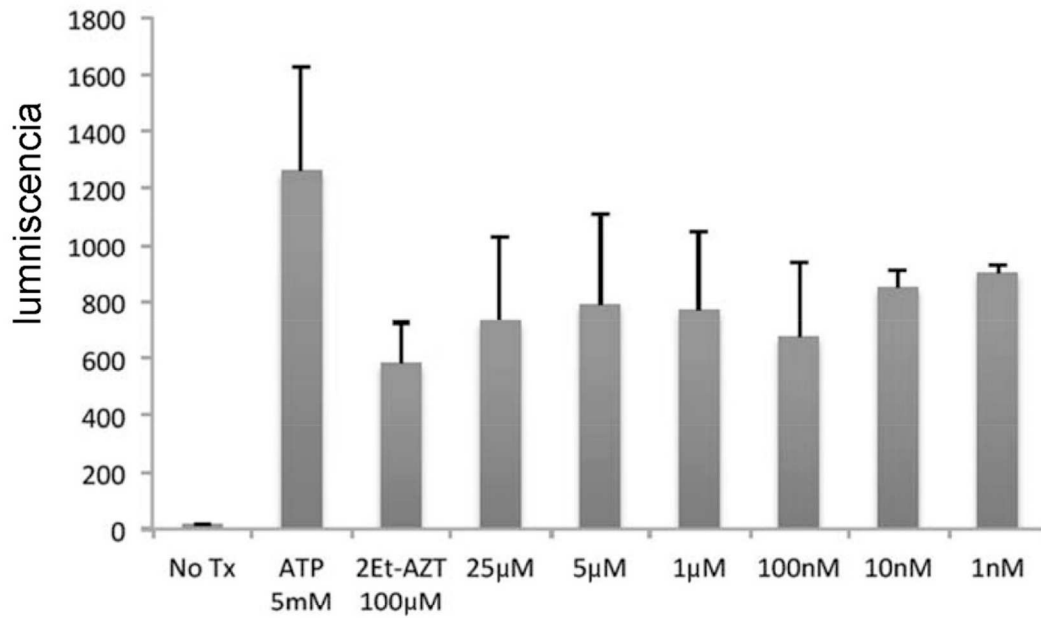


FIG. 69

Ensayo luminiscente de células iGluc

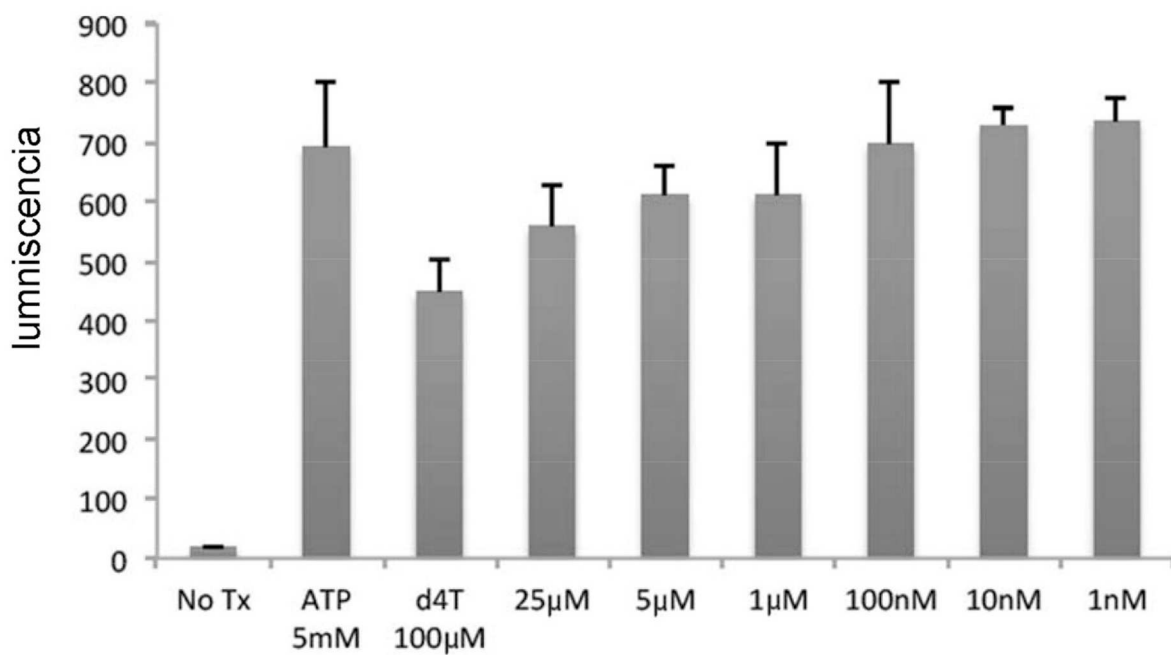


FIG. 70

Ensayo luminiscente de células iGluc

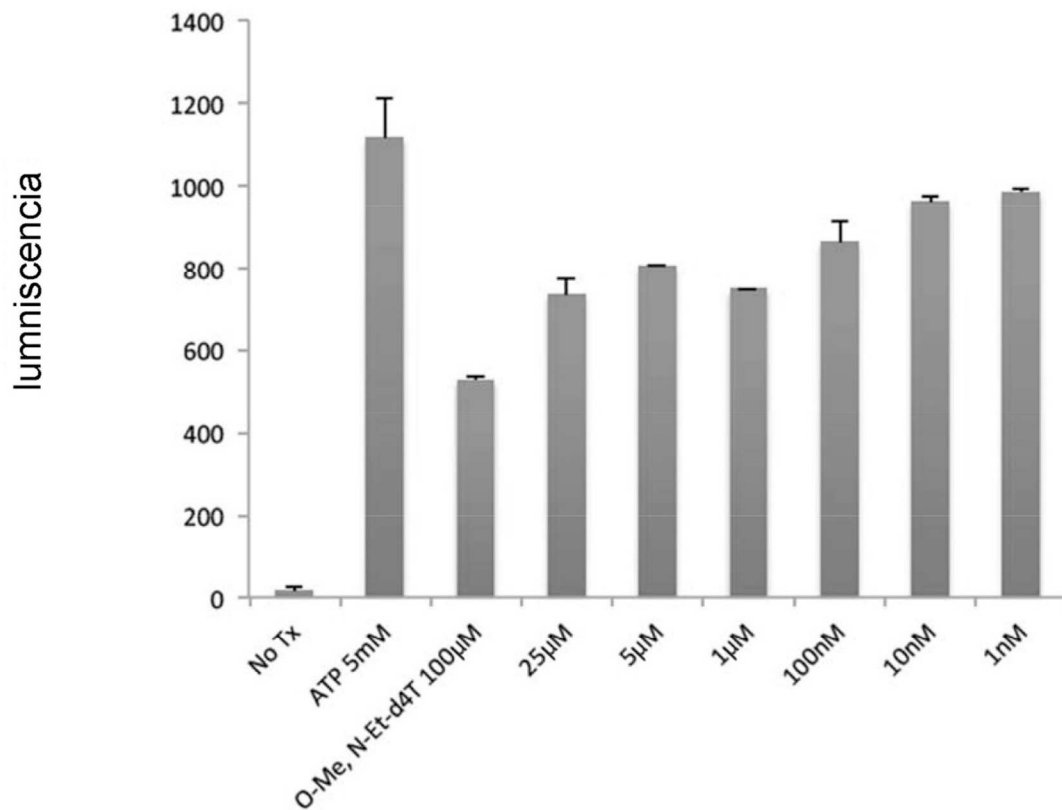


FIG. 71

Ensayo luminiscente de células iGluc

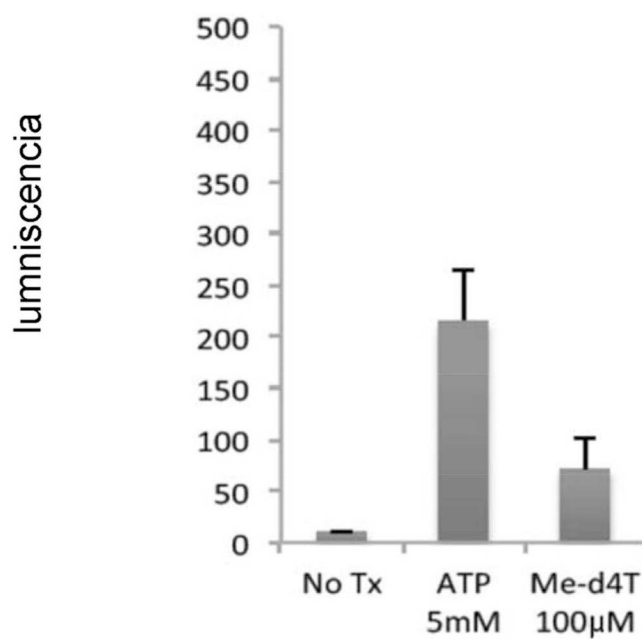
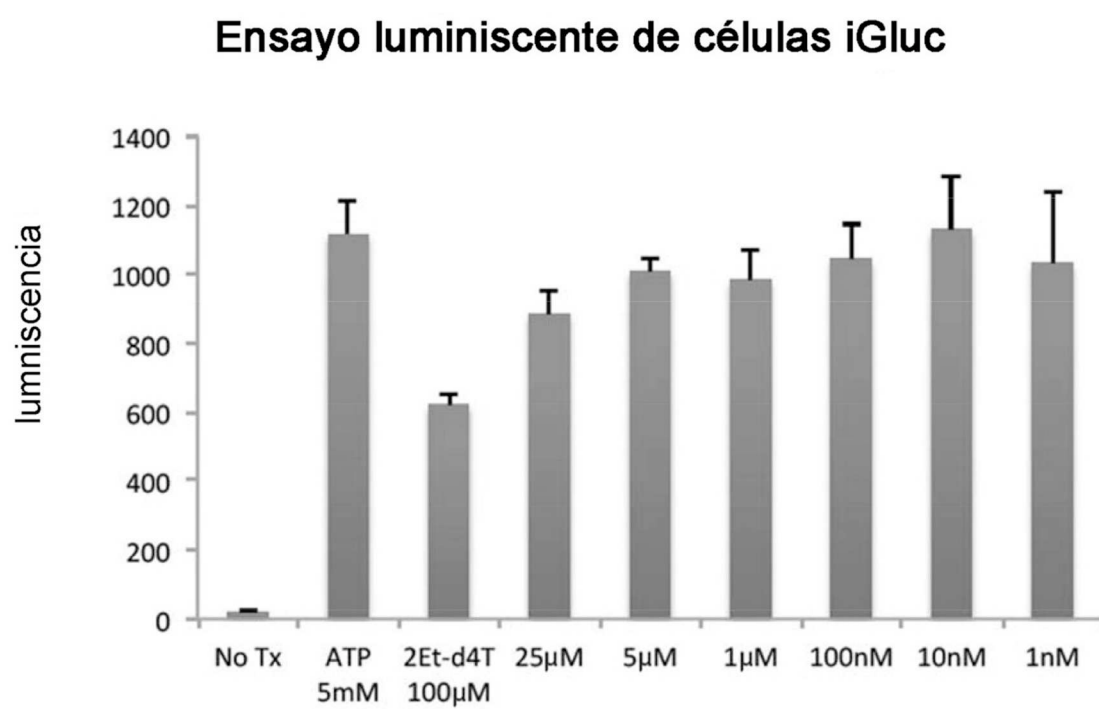


FIG. 72

**FIG. 73**

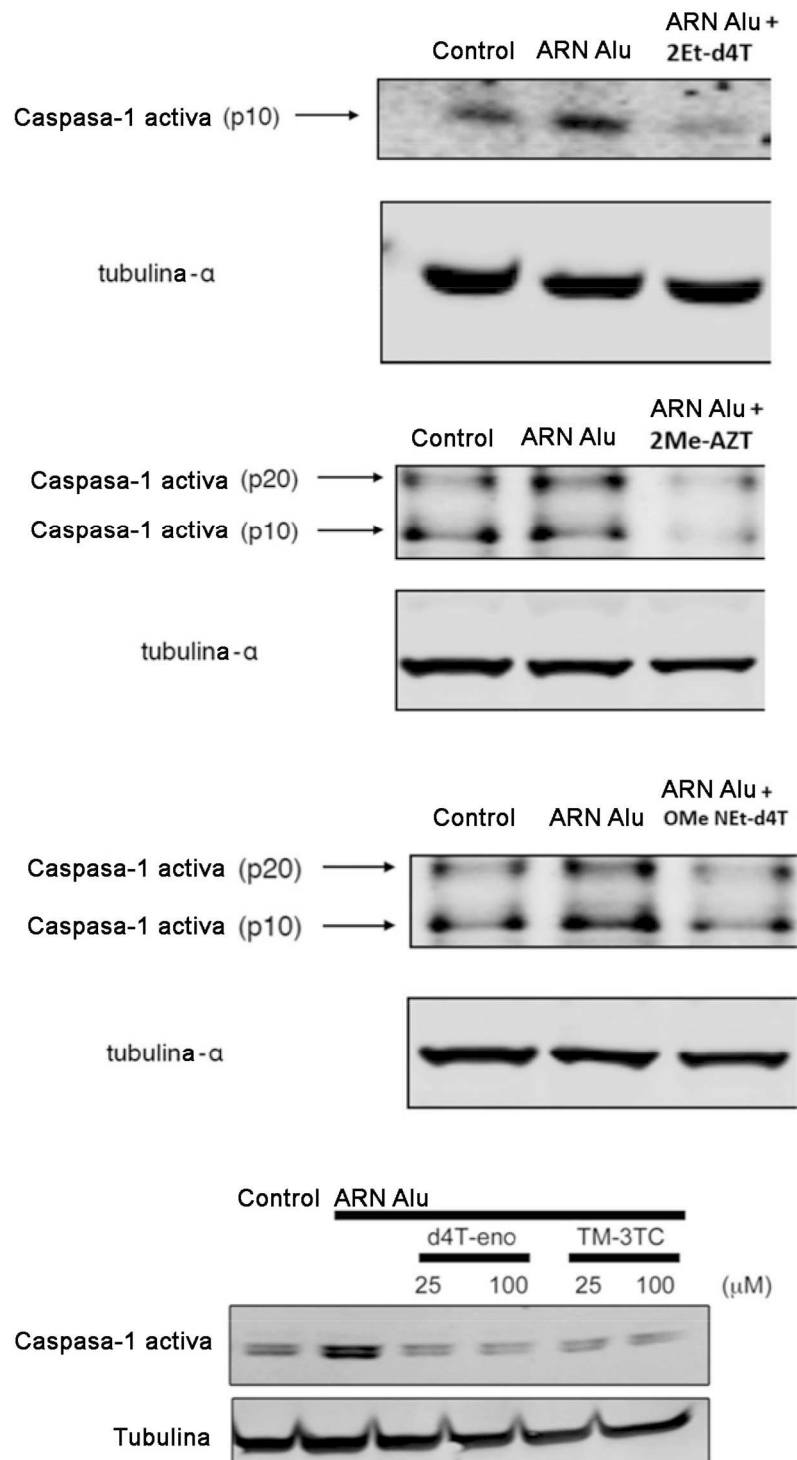


FIG. 74

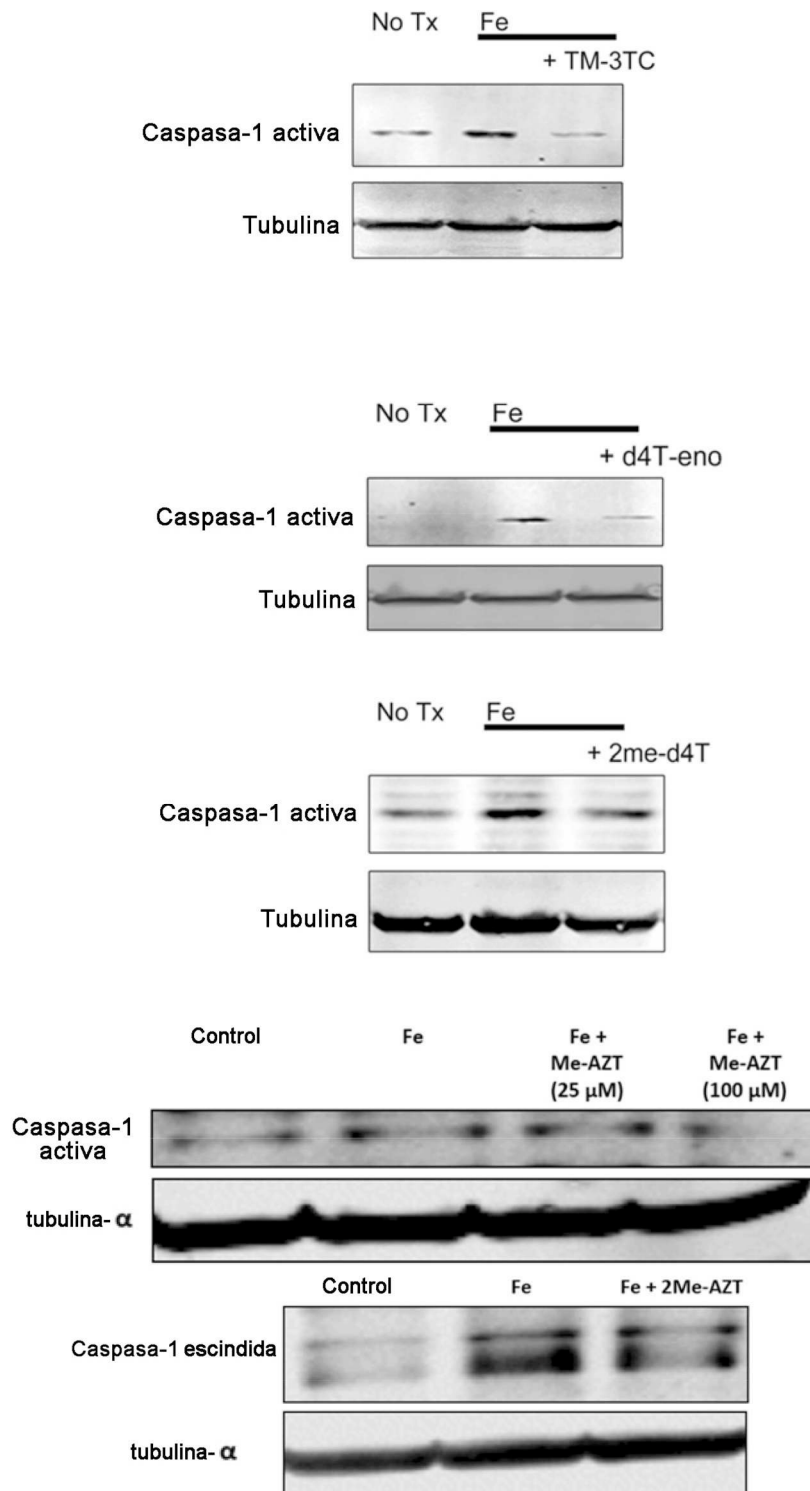


FIG. 75

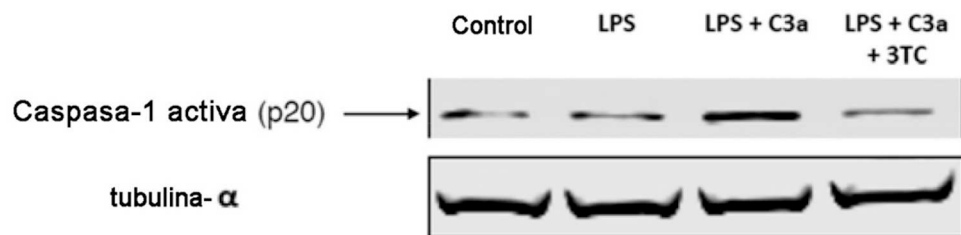


FIG. 76

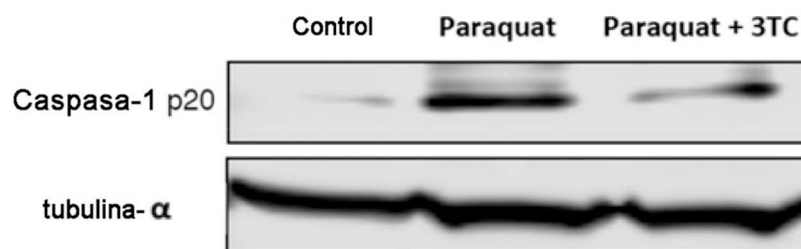


FIG. 77

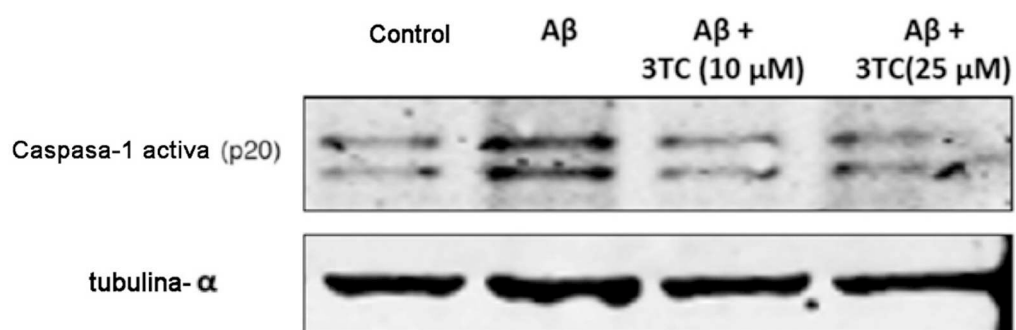


FIG. 78

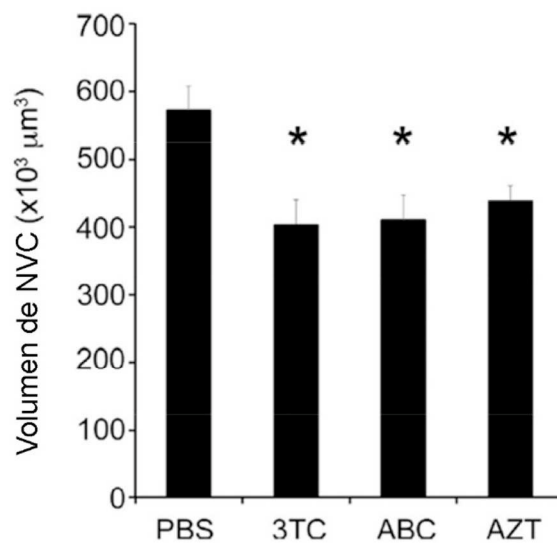


FIG. 79

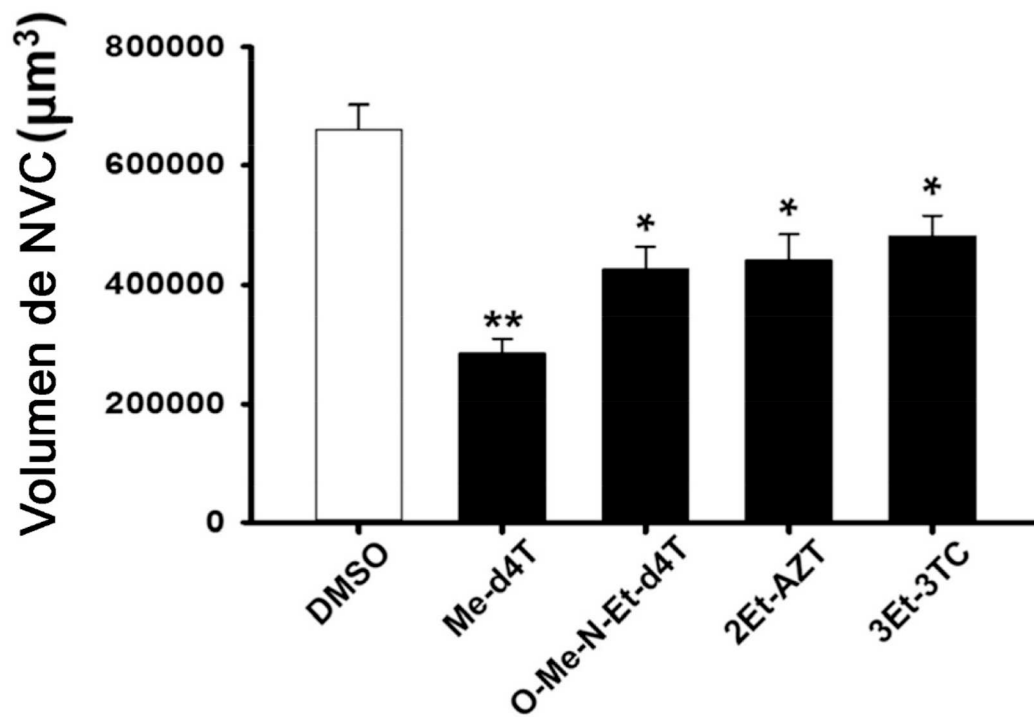


FIG. 80

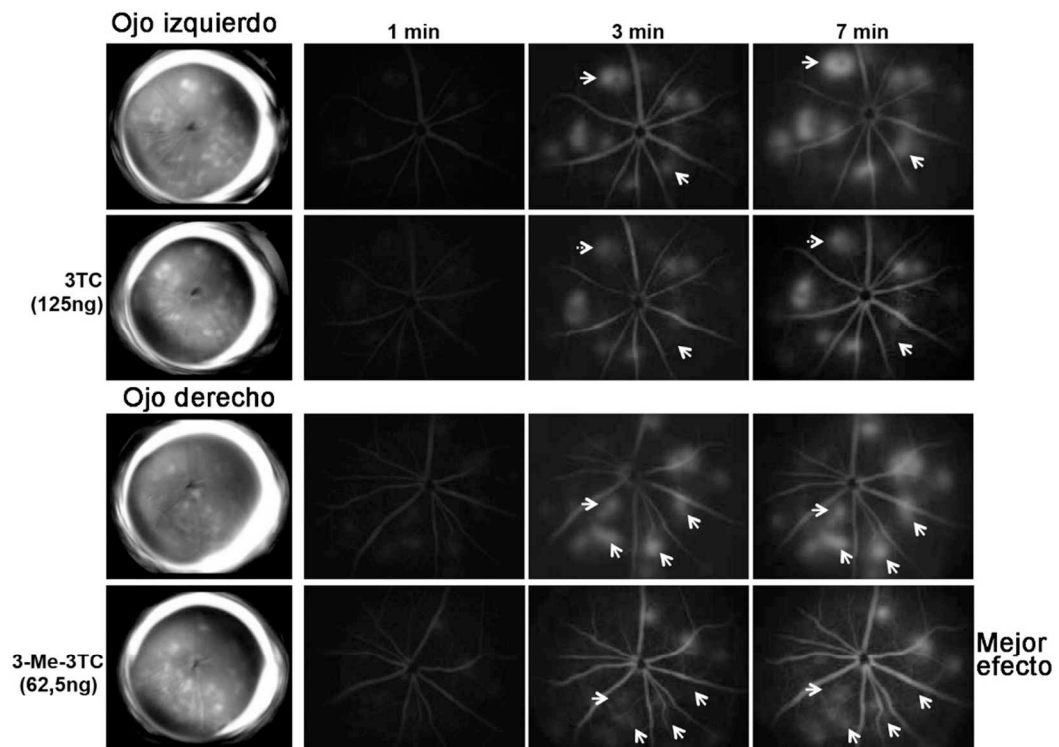


FIG. 81

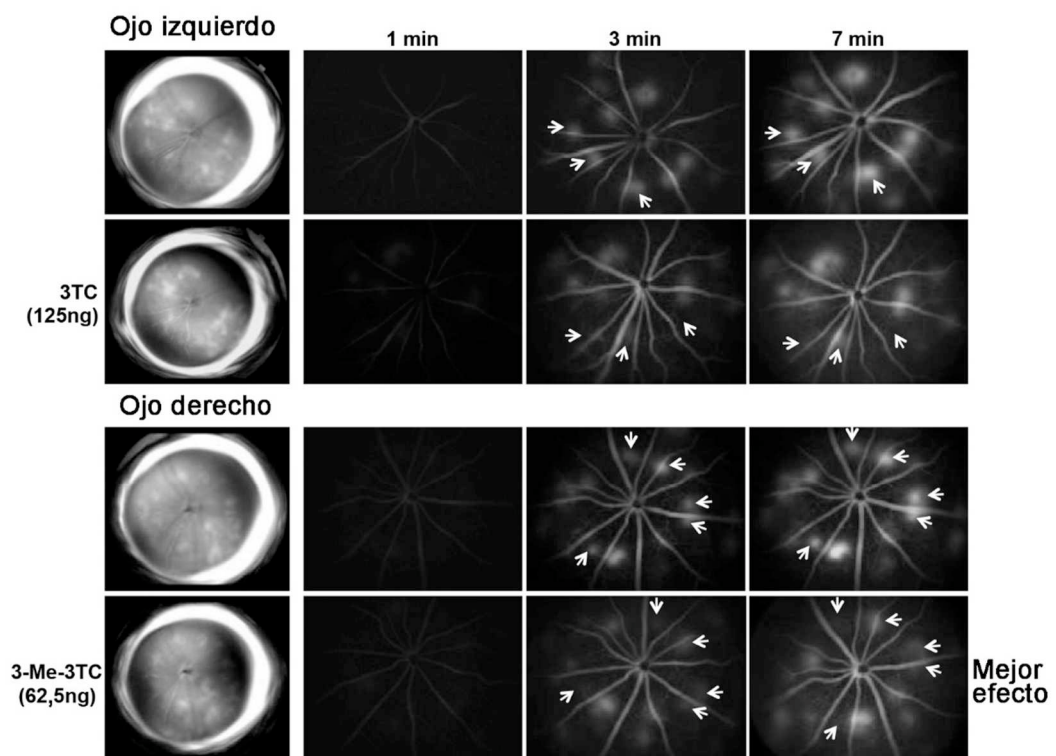


FIG. 82

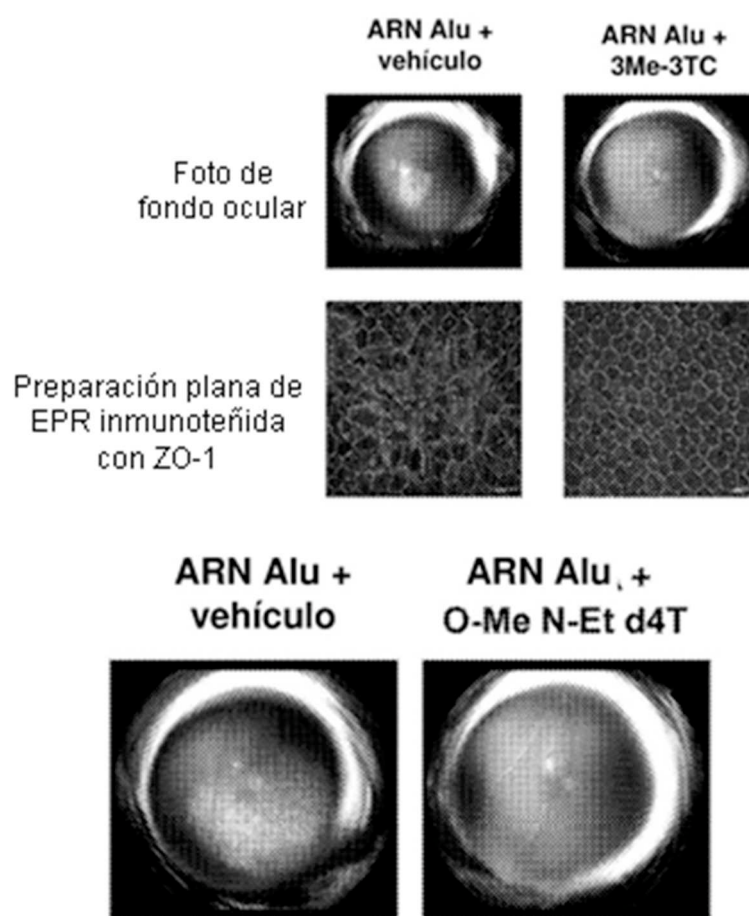


FIG. 83

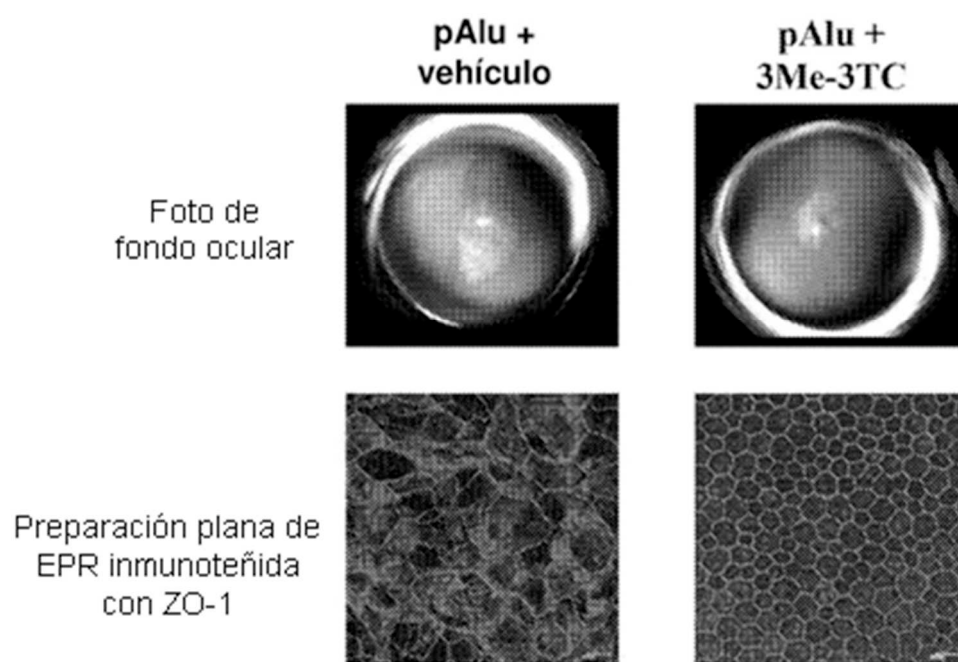


FIG. 84

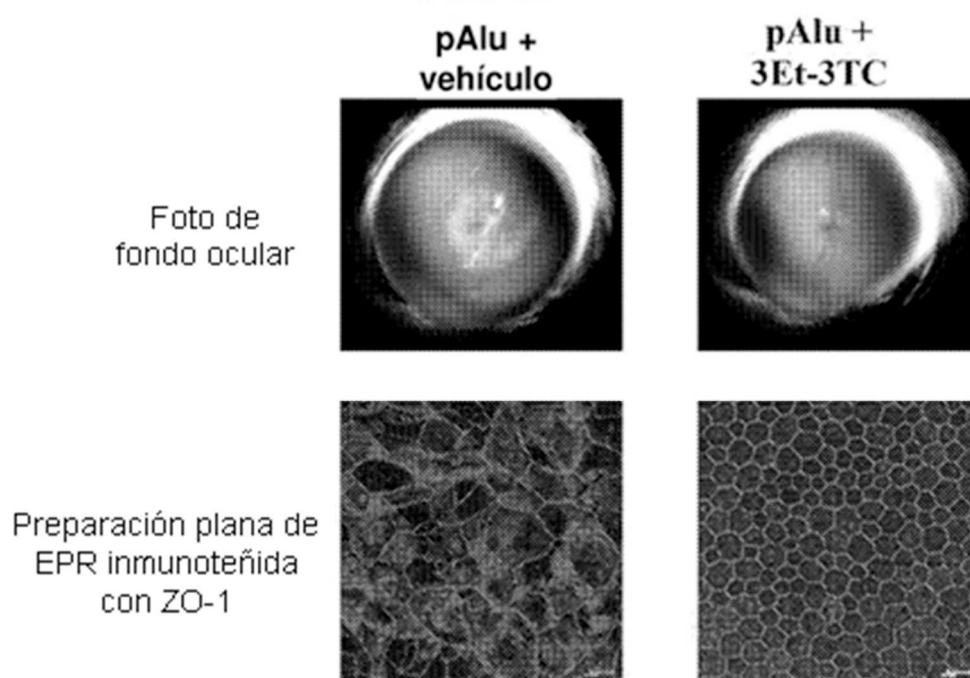


FIG. 85

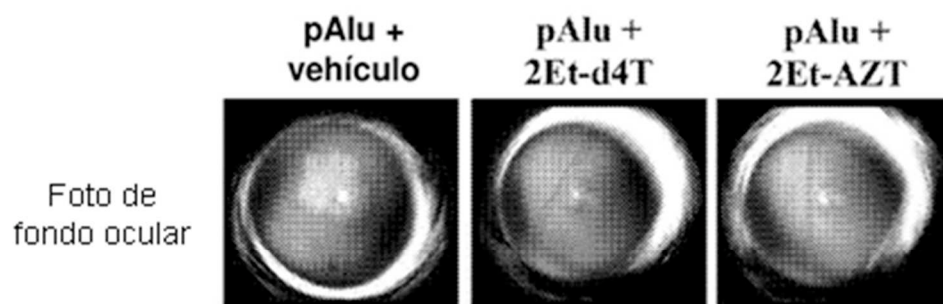


FIG. 86

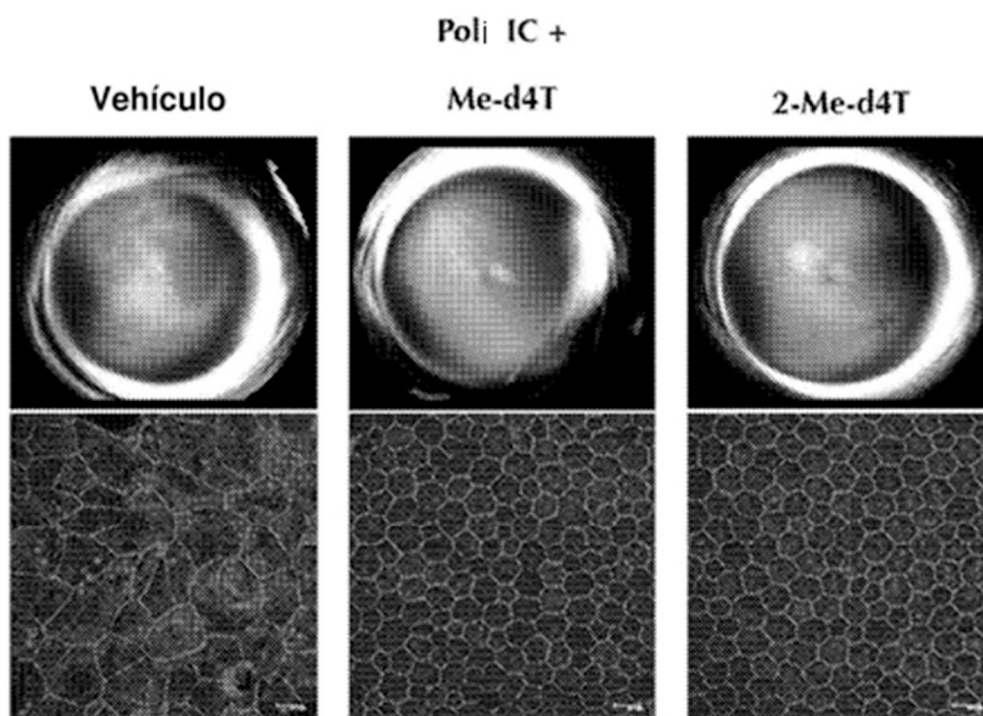


FIG. 87

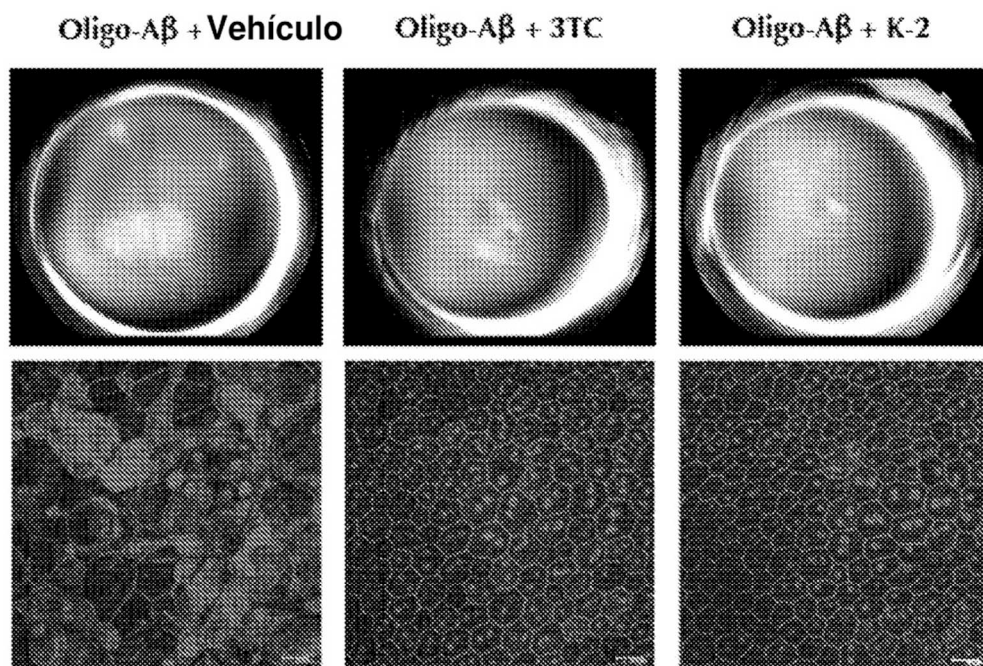


FIG. 88

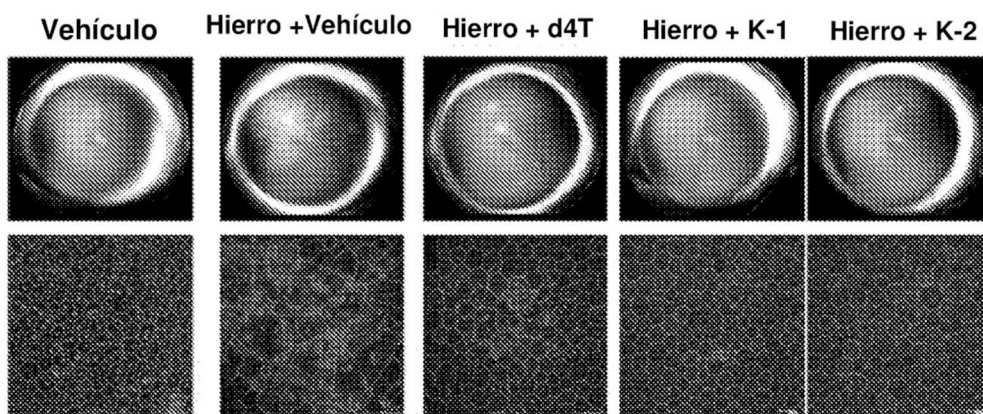


FIG. 89

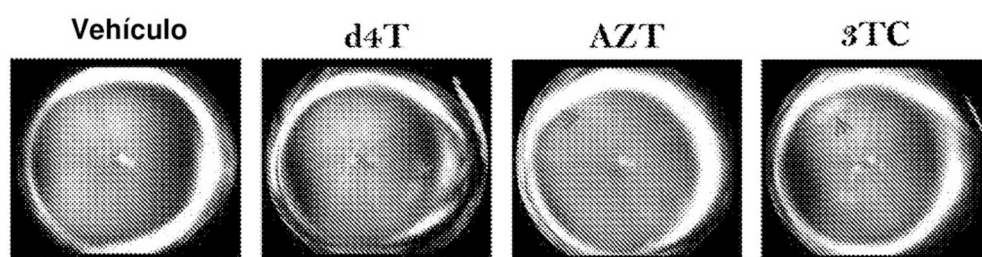


FIG. 90

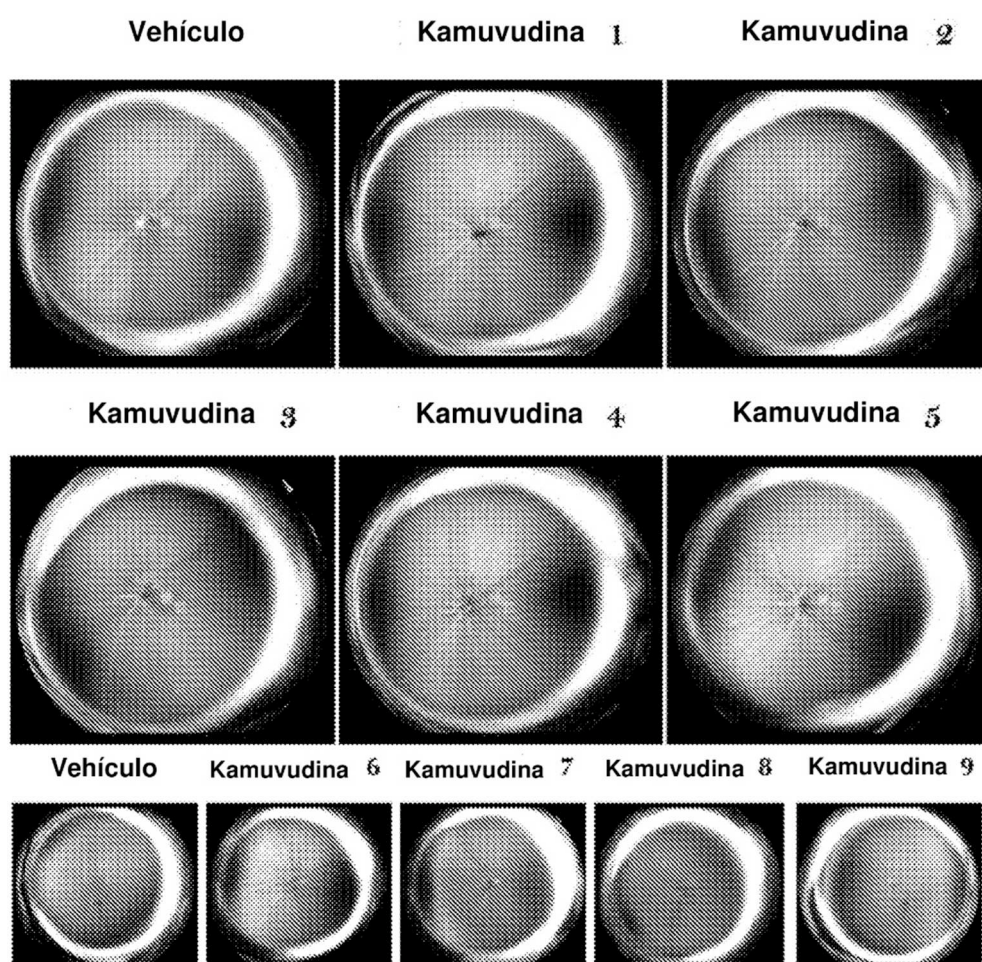


FIG. 91

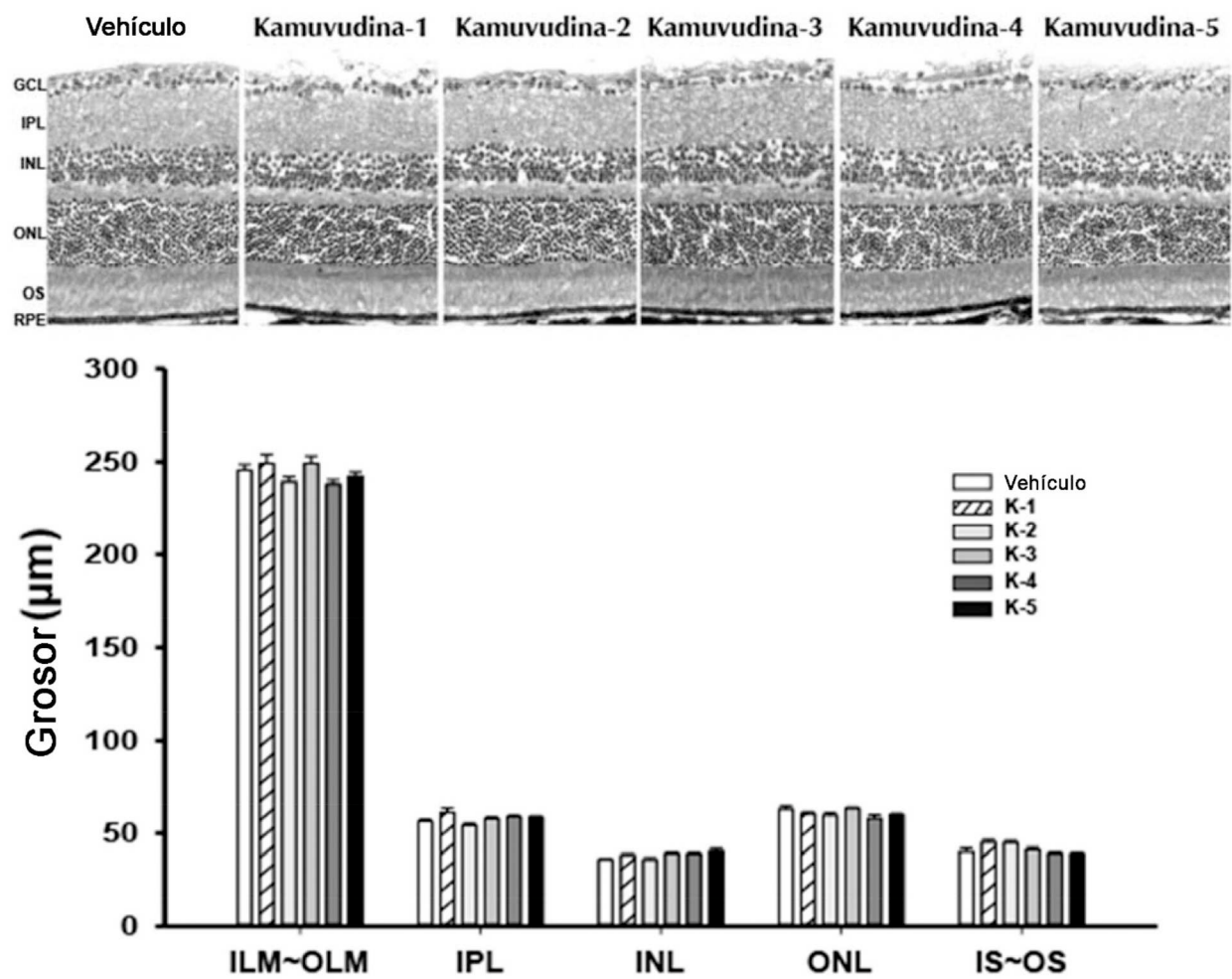


FIG. 92

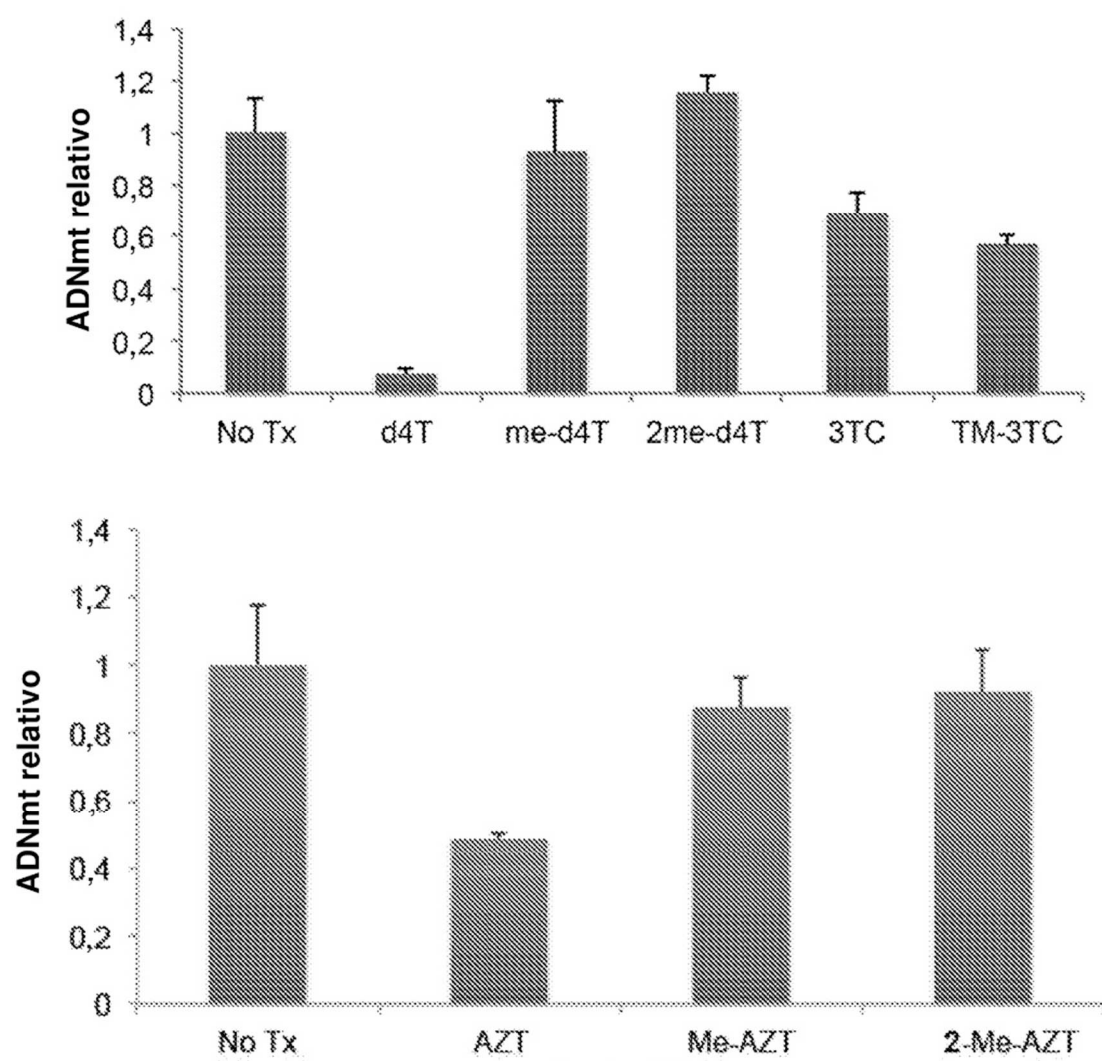


FIG. 93

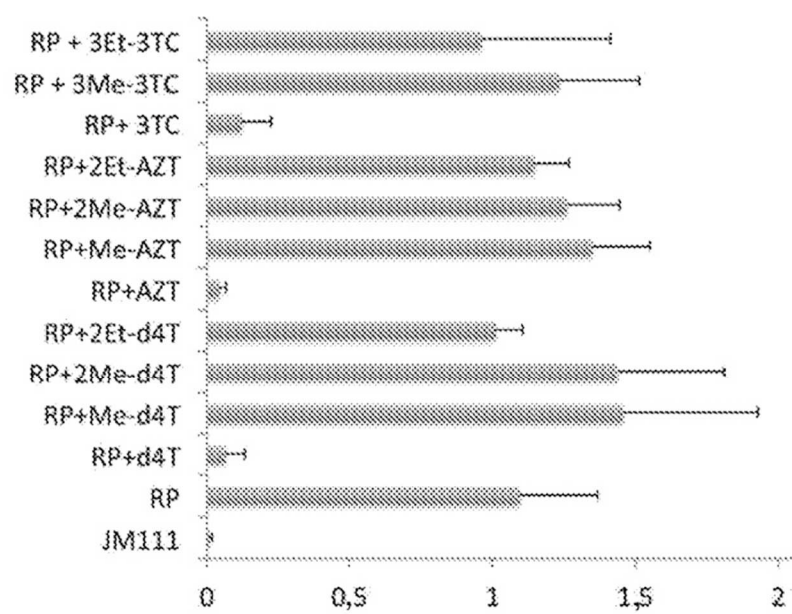


FIG. 94

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 62247099
- US 62246455 B
- US 62121379 B
- US 6514979 B, Heredia
- US 1138753 W
- US 1246928 W
- US 61586427 A
- US 61780105

Literatura no patente citada en la descripción

- *Biochem.*, 1972, vol. 11 (9), 1726-1732
- FOWLER et al. *Science*, 2014
- MIZUTANI et al. *IOVS*, 2015
- BARTOK et al. iGLuc: a luciferase-based inflammatory and protease activity reporter. *Nature Methods*, 2013, vol. 10 (2), 147-54
- GELFAND. *Cell Reports*, 2015
- ADINOLFI, E. ; CALLEGARI, M.G. ; FERRARI, D. ; BOLOGNESI, C. ; MINELLI, M. ; WIECKOWSKI, M.R. ; PINTON, P. ; RIZZUTO, R. ; DI VIRGILIO, F. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell*, 2005, vol. 16, 3260-3272
- AGARWAL, H.K. ; LOETHAN, K. ; MANDAL, D. ; DONCEL, G.F. ; PARANG, K. Synthesis and biological evaluation of fatty acyl ester derivatives of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, vol. 21, 1917-1921
- AHMAD, R. ; SINDHU, S.T. ; TOMA, E. ; MORISSET, R. ; AHMAD, A. Elevated levels of circulating interleukin-18 in human immunodeficiency virus-infected individuals: role of peripheral blood mononuclear cells and implications for AIDS pathogenesis. *J Virol*, 2002, vol. 76, 12448-12456
- AMBATI, J. ; AMBATI, B.K. ; YOO, S.H. ; IANCHULEV, S. ; ADAMIS, A.P. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*, 2003, vol. 48, 257-293
- AMBATI, J. ; FOWLER, B.J. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, 2012, vol. 75, 26-39
- BALZARINI, J. ; HERDEWIJN, P. ; DECLERCQ, E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J Biol Chem*, 1989, vol. 264, 6127-6133
- BATZER, M.A. ; DEININGER, P.L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet*, 2002, vol. 3, 370-379
- CHEEWATRAKOOLPONG, B. ; GILCHREST, H. ; ANTHES, J.C. ; GREENFEDER, S. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, vol. 332, 17-27
- CRUZ, C.M. ; RINNA, A. ; FORMAN, H.J. ; VENTURA, A.L. ; PERSECHINI, P.M. ; OJCIUS, D.M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, 2007, vol. 282, 2871-2879
- DAVID, D. ; CHEVRIER, D. ; TREILHOU, M.P. ; JOUSSEMET, M. ; DUPONT, B. ; THEZE, J. ; GUESDON, J.L. IL-18 underexpression reduces IL-2 levels during HIV infection: a critical step towards the faulty cell-mediated immunity?. *Aids*, 2000, vol. 14, 2212-2214
- DEWANNIEUX, M. ; ESNAULT, C. ; HEIDMANN, T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet*, 2003, vol. 35, 41-48
- DRIDI, S. ; HIRANO, Y. ; TARALLO, V. ; KIM, Y. ; FOWLER, B.J. ; AMBATI, B.K. ; BOGDANOVICH, S. ; CHIODO, V.A. ; HAUSWIRTH, W.W. ; KUGEL, J.F. et al. ERK1/2 activation is a therapeutic target in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, vol. 109, 13781-13786
- FERRARA, J.L. ; LEVINE, J.E. ; REDDY, P. ; HOLLER, E. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 2009, vol. 373, 1550-1561
- GARCIA-MARCOS, M. ; FONTANILS, U. ; AGUIRRE, A. ; POCHET, S. ; DEHAYE, J.P. ; MARINO, A. Role of sodium in mitochondrial membrane depolarization induced by P2X7 receptor activation in submandibular glands. *FEBS Lett*, 2005, vol. 579, 5407-5413

- HAZLETON, J.E. ; BARMAN, J.W. ; EUGENIN, E.A. Purinergic receptors are required for HIV-1 infection of primary human macrophages. *J Immunol*, 2012, vol. 188, 4488-4495
- HENTZE, H. ; LIN, X.Y. ; CHOI, M.S. ; PORTER, A.G. Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ*, 2003, vol. 10, 956-968
- HUMPHREYS, B.D. ; RICE, J. ; KERTESY, S.B. ; DUBYAK, G.R. Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 26792-26798
- IANNELLO, A. ; BOULASSEL, M.R. ; SAMARANI, S. ; TREMBLAY, C. ; TOMA, E. ; ROUTY, J.P. ; AHMAD, A. HIV-1 causes an imbalance in the production of interleukin-18 and its natural antagonist in HIV-infected individuals: implications for enhanced viral replication. *J Infect Dis*, 2010, vol. 201, 608-617
- JANKOVIC, D. ; GANESAN, J. ; BSCHIEDER, M. ; STICKEL, N. ; WEBER, F.C. ; GUARDA, G. ; FOLLO, M. ; PFEIFER, D. ; TARDIVEL, A. ; LUDIGS, K. et al. The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 2013, vol. 210, 1899-1910 [0188]
- KAHLENBERG, J.M. ; DUBYAK, G.R. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, vol. 286, C1100-1108
- KANEKO, H. ; DRIDI, S. ; TARALLO, V. ; GELFAND, B.D. ; FOWLER, B.J. ; CHO, W.G. ; KLEINMAN, M.E. ; PONICSAN, S.L. ; HAUSWIRTH, W.W. ; CHIODO, V.A. et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*, 2011, vol. 471, 325-330
- KCRUR, N. ; HIRANO, Y. ; TARALLO, V. ; FOWLER, B.J. ; BASTOS-CARVALHO, A. ; YASUMA, T. ; YASUMA, R. ; KIM, Y. ; HINTON, D.R. ; KIRSCHNING, C.J. et al. TLR-Independent and P2X7-Dependent Signaling Mediate Alu RNA-Induced NLRP3 Inflammasome Activation in Geographic Atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, vol. 54, 7395-7401
- KUBES, P. ; MEHAL, W.Z. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, 2012, vol. 143, 1158-1172
- LEWIS, W. ; DAY, B.J. ; COPELAND, W.C. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, vol. 2, 812-822
- MARIATHASAN, S. ; NEWTON, K. ; MONACK, D.M. ; VUCIC, D. ; FRENCH, D.M. ; LEE, W.P. ; ROOSE-GINNA, M. ; ERICKSON, S. ; DIXIT, V.M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 2004, vol. 430, 213-218
- MARIATHASAN, S. ; WEISS, D.S. ; NEWTON, K. ; MCBRIDE, J. ; O'ROURKE, K. ; ROOSE-GIRMA, M. ; LEE, W.P. ; WEINRAUCH, Y. ; MONACK, D.M. ; DIXIT, V.M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, vol. 440, 228-232
- MARTINON, F. ; BURNS, K. ; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002, vol. 10, 417-426
- MARTINON, F. ; PETRILLI, V. ; MAYOR, A. ; TARDIVEL, A. ; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006, vol. 440, 237-241
- MCDONALD, B. ; PITTMAN, K. ; MENEZES, G.B. ; HIROTA, S.A. ; SLABA, L. ; WATERHOUSE, C.C. ; BECK, P.L. ; MURUVE, D.A. ; KUBES, P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 2010, vol. 330, 362-366
- NAKAHIRA, K. ; HASPEL, J.A. ; RATHINAM, V.A. ; LEE, S.J. ; DOLINAY, T. ; LAM, H.C. ; ENGLERT, J.A. ; RABINOVITCH, M. ; CERNADAS, M. ; KIM, H.P. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 2011, vol. 12, 222-230
- NYKANEN, A. ; HALEY, B. ; ZAMORE, P.D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 2001, vol. 107, 309-321
- OSTERTAG, W. ; ROESLER, G. ; KRIEG, C.J. ; KIND, J. ; COLE, T. ; CROZIER, T. ; GAEDICKE, G. ; STEINHEIDER, G. ; KLUGE, N. ; DUBE, S. Induction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, vol. 71, 4980-4985
- PELEGRIN, P. ; SURPRENANT, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J*, 2006, vol. 25, 5071-5082
- PETRILLI, V. ; PAPIN, S. ; DOSTERT, C. ; MAYOR, A. ; MARTINON, F. ; TSCHOPP, J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*, 2007, vol. 14, 1583-1589

- QU, Y. ; MISAGHI, S. ; NEWTON, K. ; GILMOUR, L.L. ; LOUIE, S. ; CUPP, J.E. ; DUBYAK, G.R. ; HACKOS, D. ; DIXIT, V.M. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J Immunol*, 2011, vol. 186, 6553-6561
- RITEAU, N. ; BARON, L. ; VILLERET, B. ; GUILLOU, N. ; SAVIGNY, F. ; RYFFEL, B. ; RASSENDREN, F. ; LE BERT, M. ; GOMBAULT, A. ; COUILLIN, I. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis*, 2012, vol. 3, e403
- SORGE, R.E. ; TRANG, T. ; DORFMAN, R. ; SMITH, S.B. ; BEGGS, S. ; RITCHIE, J. ; AUSTIN, J.S. ; ZAYKIN, D.V. ; VANDER MEULEN, H. ; COSTIGAN, M. et al. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med*, 2012, vol. 18, 595-599
- STYLIANOU, E. ; BJERKELI, V. ; YNDESTAD, A. ; HEGGELUND, L. ; WAEHRE, T. ; DAMAS, J.K. ; AUKRUST, P. ; FROLAND, S.S. Raised serum levels of interleukin-18 is associated with disease progression and may contribute to virological treatment failure in HIV-1-infected patients. *Clin Exp Immunol*, 2003, vol. 132, 462-466
- SURPRENANT, A. ; RASSENDREN, F. ; KAWASHIMA, E. ; NORTH, R.A. ; BUELL, G. The cytosolic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 1996, vol. 272, 735-738
- TARALLO, V. ; HIRANO, Y. ; GELFAND, B.D. ; DRIDI, S. ; KERUR, N. ; KIM, Y. ; CHO, W.G. ; KANEKO, H. ; FOWLER, B.J. ; BOGDANOVICH, S. et al. DICER1 Loss and Alu RNA Induce Age-Related Macular Degeneration via the NLRP3 Inflammasome and MyD88. *Cell*, 2012, vol. 149, 847-859
- WILHELM, K. ; GANESAN, J. ; MULLER, T. ; DURR, C. ; GRIMM, M. ; BEILHACK, A. ; KREMPL, C.D. ; SORICHTER, S. ; GERLACH, U.V. ; JUTNER, E. et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*, 2010, vol. 16, 1434-1438
- YAMIN, T.T. ; AYALA, J.M. ; MILLER, D.K. Activation of the native 45-kDa precursor form of interleukin-1-converting enzyme. *J Biol Chem*, 1996, vol. 271, 13273-13282
- FOWLER et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic antiinflammatory activity. *Science*, 2014, vol. 346 (6212), 1000-1003