

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 010**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4418 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2018 PCT/EP2018/060847**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018 WO18233914**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2018 E 18719203 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021 EP 3641765**

54 Título: **Uso de ciclopirox como modulador de la biosíntesis de grupo hemo y en el tratamiento de porfirias y otras enfermedades**

30 Prioridad:

19.06.2017 EP 17382371

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

18.11.2021

73 Titular/es:

**ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN
COOPERATIVA EN BIOCIEIENCIAS-CIC BIOGUNE
(100.0%)**

**Parque Tecnológico de Bizkaia Edificio 801 A,
planta 1ª
48160 Derio, Vizcaya, ES**

72 Inventor/es:

**MILLET AGUILAR-GALINDO, OSCAR;
FALCÓN PÉREZ, JUAN MANUEL;
CASTILLA CASTRILLÓN, JOAQUÍN;
SANZ PARRA, ARANTZA;
LAÍN TORRE, ANA;
URQUIZA ORTIZ, PEDRO DAVID;
SAN JUAN QUINTANA, ITXASO y
BERNARDO-SEISDEDOS, GANEKO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 878 010 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

Uso de ciclopirox como modulador de la biosíntesis de grupo hemo y en el tratamiento de porfirias y otras enfermedades

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a cómo ciclopirox es capaz de modular la biosíntesis de grupo hemo y cómo esta propiedad puede usarse para el tratamiento y/o la prevención de varias enfermedades, incluida la porfiria aguda intermitente (AIP), porfiria cutánea tardía (PCT), coproporfiria hereditaria (HC), harderoporfiria (HP), porfiria variegata (VP) y anemia sideroblástica (SA) y síndromes de hiperbilirrubinemia hereditaria, entre otras.

10

Antecedentes de la invención

El grupo de patologías producidas por una falta de actividad en algunas de las enzimas de la biosíntesis de grupo hemo se conoce genéricamente como porfiria. Normalmente, la pérdida de actividad se produce por mutaciones en la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas y el tipo de porfiria depende de la enzima específica que provoca la mutación. La biosíntesis de grupo hemo se muestra en el esquema 1, que indica las enzimas implicadas en cada etapa de la vía (por encima de la flecha de reacción, que incluye el acrónimo de cuatro letras) y que detalla los nombres de las patologías específicas provocadas por deficiencias funcionales en cada una de estas enzimas (en cursiva).

15

20

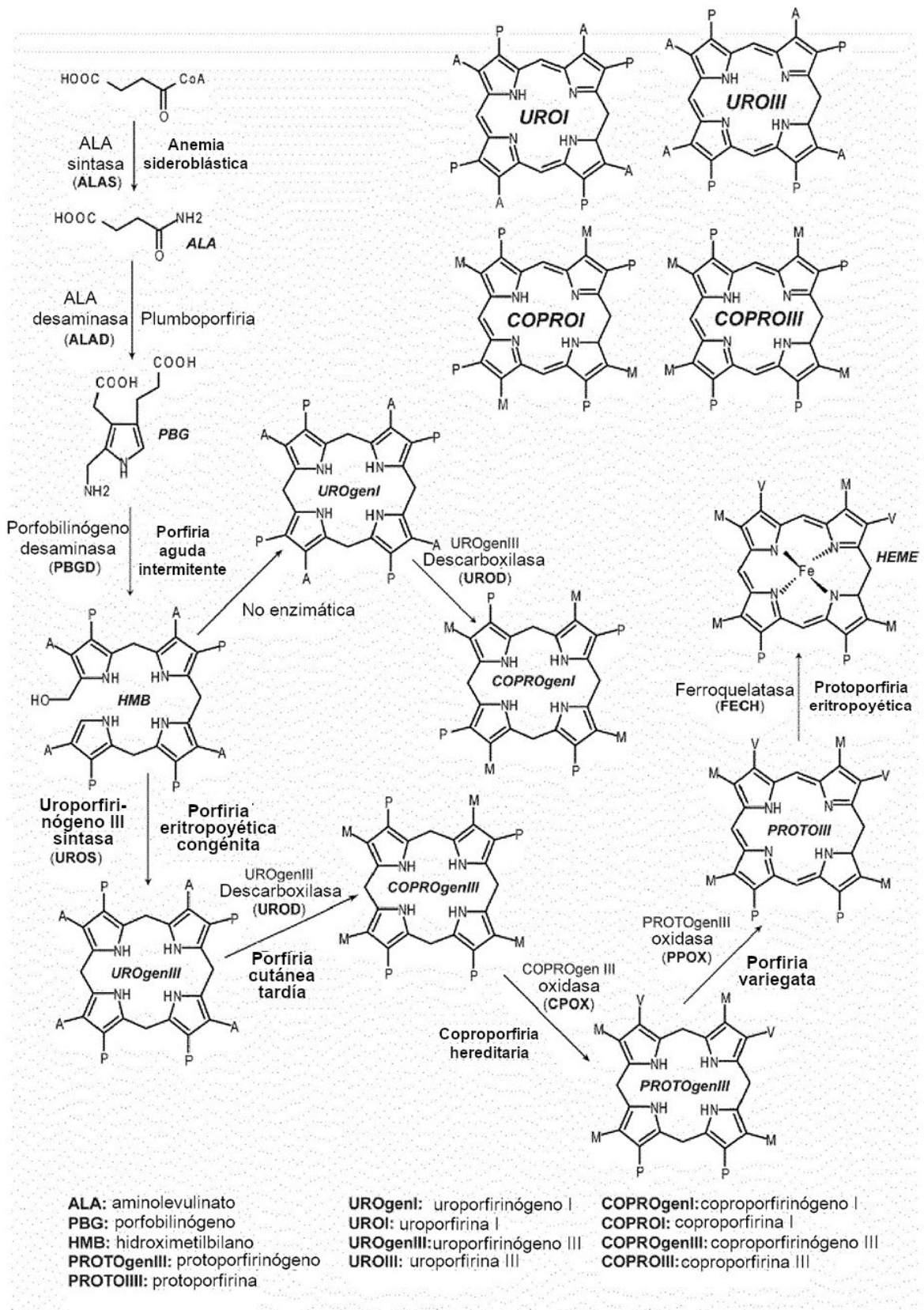
Los pacientes con porfiria pueden padecer muchos síntomas dependiendo de la patología específica y la enzima dañada implicada. Las porfirias pueden dividirse en tipos eritropoyético y hepático, dependiendo de dónde se acumulen primero compuestos dañinos denominados porfirinas y precursores de porfirina en el cuerpo (tabla 1). En las porfirias eritropoyéticas, estos compuestos se originan en la médula ósea. Las porfirias eritropoyéticas incluyen protoporfiria eritropoyética y porfiria eritropoyética congénita (CEP). Los problemas de salud asociados con las porfirias eritropoyéticas incluyen un bajo número de glóbulos rojos (anemia) y agrandamiento del bazo (esplenomegalia). Los otros tipos de porfirias se consideran porfirias hepáticas. En estos trastornos, las porfirinas y los precursores de porfirina se originan principalmente en el hígado, lo que conduce a una función hepática anómala y a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de hígado (tabla 1).

25

30

Una característica común es la acumulación de los subproductos: uroporfirinógeno I; UROgenI y coproporfirinógeno I; COPROgenI (esquema I). Tales productos se oxidan fácilmente a las porfirinas respectivas (UROI y COPROI) y son subproductos difíciles de catabolizar que tienden a acumularse en el cuerpo. Por lo tanto, se producen grandes cantidades de UROgenI que se acumulan en bolsas debajo de los ojos y deforman las extremidades en pacientes con CEP (aquellos que tienen una deficiencia de UROS). La acumulación de subproductos también da como resultado una sensibilidad extrema a la luz solar desde la infancia que se manifiesta como lesiones dérmicas intensas en las áreas expuestas. Esta es una característica común observada en varias porfirias, como se describe en la tabla 1.

35



Esquema 1: La vía de biosíntesis de hemo y su relación con las porfirias. [P=propionato, A=acetato, V=vinilo, M=metilo].

La biosíntesis de grupo hemo está regulada en tres puntos: i) Fe^{2+} y ALA regulan por incremento la ruta, mientras que la acumulación de hemo da como resultado el efecto opuesto debido a la regulación por disminución por retroalimentación. En este contexto, una síntesis reducida del grupo hemo debido al mal funcionamiento en una de las enzimas en la ruta da como resultado la activación de la ruta, poniendo fin a la acumulación de subproductos en el cuerpo y la fotosensibilidad de la piel.

5

Tabla 1: la familia de las porfirias y los principales síntomas observados por los pacientes.

Tipo de porfiria	Enzima deficiente	Tipo	Síntomas principales
Anemia sideroblástica (protoporfiria dominante ligada al cromosoma X)	ALAS	Eritro.	Cirrosis, fotosensibilidad
Porfiria por deficiencia de aminolevulinato deshidratasa	ALAD	Hep.	Dolor abdominal, neuropatía
Porfiria aguda intermitente	PBGD	Hep.	Dolor abdominal, neuropatía, trastornos psiquiátricos, taquicardia
Porfiria eritropoyética congénita	UROS	Eritro.	Fotosensibilidad grave, anemia hemolítica, formación de ampollas, esplenomegalia
Porfiria cutánea tardía	UROD	Hep.	Fotosensibilidad con vesículas y ampollas
Coproporfiria hereditaria	CPOX	Hep.	Fotosensibilidad, dolor neurológico, cólico.
Harderoporfiria	CPOX	Eritro.	Ictericia, anemia, hígado y bazo agrandados, fotosensibilidad tardía.
Porfiria variegata	PPOX	Hep.	Fotosensibilidad, síntomas neurológicos, retraso del desarrollo
Protoporfiria eritropoyética	FECH	Eritro.	Fotosensibilidad con lesiones cutáneas. Colelitiasis, disfunción hepática leve

10 Las enzimas de biosíntesis de hemo se han estudiado intensamente en los últimos años. Todos los genes implicados se han clonado y se han determinado las estructuras cristalinas de todas las enzimas. En este contexto, la regulación de la expresión génica de la vía se ha propuesto como un enfoque prometedor para el tratamiento de trastornos porfíricos. Sin embargo, actualmente no hay cura para ninguna de las porfirias y todos los tratamientos son paliativos o preventivos. En porfirias agudas, los brotes de síntomas a menudo requieren hospitalización y a los pacientes se les puede dar un medicamento para el dolor, las náuseas y los vómitos. La hemina es la única terapia de hemo aprobada para su uso. El tratamiento de la porfiria cutánea depende del tipo específico y la gravedad de los síntomas e incluye la extracción regular de sangre (flebotomías) para reducir la cantidad de hierro en el hígado, y dosis bajas del fármaco antipalúdico cloroquina. Las técnicas experimentales curativas se limitan al trasplante de médula ósea (para porfirias eritropoyéticas) con el consiguiente peligro de infección. La terapia génica se ha explorado para la porfiria eritropoyética congénita (en modelos animales) y la porfiria aguda intermitente (en seres humanos) sin mejora significativa.

15 También se ha encontrado que la desregulación de la biosíntesis de grupo hemo desempeña un papel en otras enfermedades tales como los síndromes de hiperbilirrubinemia hereditaria, incluido el síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Lucey-Driscoll, síndrome de Gilbert, síndrome de Rotor and síndrome de Dubin-Johnson. En todos estos casos se encuentran altos niveles de bilirrubina y/o biliverdina. Dado que la bilirrubina y la biliverdina son metabolitos obtenidos de la catabólisis del grupo hemo, una regulación de este último también debería reducir los niveles de los primeros.

20 Por lo tanto, todavía existe una gran necesidad de proporcionar agentes terapéuticos adecuados para el tratamiento y/o la prevención de porfirias y otras enfermedades asociadas con la biosíntesis de grupo hemo desregulada.

Sumario de la invención

35 En el presente documento se describe un nuevo tratamiento para la porfiria, hiperbilirrubinemia y otras enfermedades en las que está implicada una desregulación de la biosíntesis de grupo hemo. En particular, se ha demostrado que el compuesto ciclopirox es capaz de regular la biosíntesis de grupo hemo no por mecanismos bien conocidos como la regulación de la expresión génica de la vía, sino en su lugar por su asociación y estabilización del grupo hemo, que reduce la regulación por incremento de la vía de biosíntesis y, en última instancia, reduce los niveles de concentración intracelular de los subproductos tóxicos, así como de los productos catabólicos de hemo, poniendo de relieve una

40

nueva forma inesperada de regulación de hemo.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por biosíntesis de grupo hemo desregulada y caracterizada por la acumulación de UROI, COPROI, bilirrubina y/o biliverdina, con la condición de que dicha enfermedad no sea porfiria eritropoyética congénita.

Un aspecto adicional es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por biosíntesis de grupo hemo desregulada y caracterizada por la acumulación de UROI, COPROI, bilirrubina y/o biliverdina, con la condición de que dicha enfermedad no sea porfiria eritropoyética congénita, comprendiendo dicha composición ciclopirox, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Según una realización particular, dicha composición es para administración oral o tópica.

También se da a conocer un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por biosíntesis de grupo hemo desregulada en un sujeto y caracterizada por la acumulación de UROI, COPROI, bilirrubina y/o biliverdina, con la condición de que dicha enfermedad no sea porfiria eritropoyética congénita, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de ciclopirox, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo a dicho sujeto. En una realización preferida, dicho sujeto es un ser humano.

Las enfermedades que surgen de la síntesis de hemo desregulada se conocen por el experto en la materia, incluyendo las patologías contempladas por la presente invención, es decir, aquellas que se caracterizan por (o dan como resultado) la acumulación de subproductos de la vía de biosíntesis de hemo o productos catabólicos de hemo, seleccionándose dichos productos de UROI, COPROI, bilirrubina y/o biliverdina,

En una realización particular de la presente invención, la enfermedad provocada por la biosíntesis de grupo hemo desregulada se caracteriza por la acumulación de UROI y/o COPROI. Más particularmente, dicha enfermedad caracterizada por la acumulación de UROI y/o COPROI es una porfiria seleccionada del grupo que consiste en anemia sideroblástica, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria, harderoporfiria, porfiria variegata y protoporfiria eritropoyética.

En otra realización, la enfermedad provocada por la biosíntesis de grupo hemo desregulada se caracteriza por la acumulación de bilirrubina y/o biliverdina. Más particularmente, dicha enfermedad caracterizada por la acumulación de bilirrubina y/o biliverdina se selecciona del grupo que consiste en el síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Lucey-Driscoll, síndrome de Gilbert, síndrome de Rotor, síndrome de Dubin-Johnson y otras hiperbilirrubinemias hereditarias.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La asociación de ciclopirox (CPX) al grupo hemo cambia la frecuencia de absorción y el color debido a las diferentes propiedades de coordinación del complejo no covalente (A). El color de una disolución de hemo cambia progresivamente tras la adición de CPX (B).

Figura 2. El efecto de la asociación puede observarse por RMN. En la figura se muestra la región aromática del espectro de ^1H -RMN 1D de CPX (línea de puntos). Cuando se añade un equivalente de hemo a la muestra, se observa una reducción en la intensidad de la señal debido a la asociación al hemo y la relajación paramagnética con el ion Fe^{2+} (línea continua).

Figura 3. El cambio de intensidad de señal en la ^1H -RMN 1D puede usarse para determinar la constante de afinidad del complejo. El mejor ajuste a los datos experimentales proporciona un valor de $380 \mu\text{M}$.

Figura 4. Evaluación de los niveles de uroporfirina I (UROI) en diferentes líneas celulares HEK sin fenotipo de porfiria (WT) o con una inestabilidad genómica introducida usando la técnica de CRISPR-cas9 (mutaciones P248Q y C73R). [Izquierda] Para las líneas celulares mencionadas, la acumulación de porfirinas en función de [CPX] se mide mediante espectroscopía de fluorescencia (fluorocitos) y se representa como el desplazamiento a la derecha de la población en comparación con las células normales (que se concentran en la izquierda debido a la ausencia de fluorescencia intrínseca). Las intensidades de dispersión lateral (SSC) y PE-Cy5 se expresan en unidades arbitrarias. [Derecha] La concentración de UROI determinada por análisis de HPLC, en función de las líneas celulares [CPX] para HEK P248Q [Superior] y HEK C73R [Inferior].

Figura 5. Niveles de reducción de uroporfirina I (UROI) en un conjunto de líneas celulares que incluyen: A) fibroblastos de un paciente con HC, B) fibroblastos de un paciente con AIP y C) fibroblastos de un individuo sano. En todos los casos, se observa una reducción de los niveles de UROI en presencia de una concentración extracelular de CPX ($15 \mu\text{M}$).

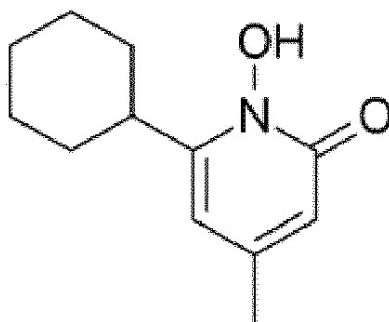
Figura 6. Niveles de reducción de otras porfirinas y derivados. Separación por HPLC de penta I, hexa I y copro I como se indica para células HEK-P248Q (línea continua) y las mismas células tratadas con $120 \mu\text{M}$ de CPX (línea

discontinua).

Figura 7. Análisis transcriptómico de células HEK (WT, UROIIS-C73R y UROIIS-P248Q como se indica) para los diferentes genes de la vía de biosíntesis de hemo en ausencia (blanco) y en presencia (negro) de CPX 120 μ M. Se han usado tubulina, actina y la proteína ribosómica S14 como genes constitutivos para la cuantificación.

Descripción detallada de la invención

El compuesto ciclopirox se dio a conocer por primera vez en la década de 1970, en el documento US 3883545, donde se describió que presentaba propiedades antimicóticas. El nombre químico de ciclopirox es 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona, con la fórmula molecular $C_{12}H_{17}NO_2$ y un peso molecular de 207,27. El número de registro CAS es [29342-05-0]. La estructura química se representa a continuación en el esquema 2:



Esquema 2: ciclopirox

La presente invención también contempla todas las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de ciclopirox. Por ejemplo, ciclopirox puede ser, por ejemplo, ciclopirox olamina (número de registro CAS [41621-49-2]), que comprende 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona con 2-aminoetanol en una proporción 1:1.

El ciclopirox (y la sal ciclopirox olamina) se han descrito/usado/aprobado previamente como tratamientos antifúngicos. Actualmente, una variedad de formulaciones tópicas indicadas para el tratamiento de infecciones fúngicas están disponibles comercialmente (por ejemplo, como una laca, como un champú, como una disolución, como una suspensión, como una crema, como una loción y como un gel).

En el presente documento se describe una nueva y sorprendente utilidad del fármaco ciclopirox aprobado y disponible comercialmente. Específicamente, en esta invención se demuestra que ciclopirox es capaz de modular la concentración de porfirina en varios modelos celulares que acumulan porfirinas, dando como resultado finalmente una reducción de los subproductos tóxicos generados. Esto es posible debido al hecho de que ciclopirox se asocia de manera no covalente con el grupo hemo (véase el ejemplo 1), estabilizando así su concentración y activando el mecanismo de regulación por retroalimentación. Esta actividad se notifica a concentraciones extracelulares que son comparables a la dosificación administrada para los usos médicos ya aprobados, lo que indica que el compuesto puede ser activo a una concentración por debajo del umbral de toxicidad. Además, la regulación de la vía de biosíntesis de hemo también es útil para disminuir los niveles de metabolitos obtenidos de la catálisis del grupo hemo y, por lo tanto, ciclopirox también puede ser beneficioso en patologías asociadas con la acumulación de productos catabólicos de hemo.

El inventor no conoce ninguna divulgación de la utilidad de ciclopirox (o sales) en el tratamiento de cualquier enfermedad por su capacidad para modular la biosíntesis de grupo hemo como se muestra en el presente documento. Ventajosamente, la capacidad de ciclopirox para asociarse de manera no covalente con el grupo hemo y estabilizarlo representa un mecanismo novedoso y eficaz para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades relacionadas con la desregulación de la síntesis del hemo. La utilidad de ciclopirox en el tratamiento y/o la prevención de la porfiria eritropoyética congénita (CEP) debido a su capacidad para actuar como chaperona farmacológica para uroporfirinógeno III sintasa es el sujeto de la solicitud de patente en tramitación junto con la presente PCT/EP2017/077570, presentada el 27 de octubre de 2017 y no publicada.

La presente invención se refiere al uso de ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades provocadas por biosíntesis de grupo hemo desregulada, distintas de la porfiria eritropoyética congénita. En una realización particular, la enfermedad surge de la acumulación de UROI y/o COPROI y más particularmente es una porfiria seleccionada del grupo que consiste en anemia sideroblástica, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria, harderporfiria, porfiria variegata y protoporfiria eritropoyética. En otra realización, la enfermedad está asociada con la acumulación de

bilirrubina y/o biliverdina (catabolitos del grupo hemo) tal como el síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Lucey-Driscoll, síndrome de Gilbert, síndrome de Rotor, síndrome de Dubin-Johnson y otras hiperbilirrubinemias hereditarias.

5 Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende en el presente documento un material que no es biológicamente o de otro modo no deseable, es decir, el material puede incorporarse en una composición farmacéutica administrada a un paciente sin provocar ningún efecto biológico no deseable ni interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está contenido. Preferiblemente, como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término "sal" debe entenderse como cualquier forma de ciclopirox usada según esta invención en la que dicho compuesto está en forma iónica o está cargado y acoplado a un contraión (un catión o anión).

15 Las sales de ciclopirox pueden ser preferiblemente sales de adición de base o sales metálicas, y pueden sintetizarse a partir del compuesto original por métodos químicos convencionales. Los ejemplos de las sales de adición de álcali incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, amonio, y sales de álcalis orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, trietanolamina, glucamina y sales de aminoácidos básicos. Los ejemplos de las sales metálicas incluyen, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio y litio. Según una realización particular, la sal de ciclopirox es una sal de metales alcalinos (por ejemplo, de sodio o potasio); una sal de amonio; una sal de amina primaria (como por ejemplo alquilamina C₁-C₈); una sal de amina secundaria (como por ejemplo dialquilamina C₁-C₈); una sal de aminas terciarias (como por ejemplo trialquilamina C₁-C₈); una sal de diamina; una sal de alcanolamina (como por ejemplo, alcanolamina C₁-C₈ o dialcanolamina C₁-C₈ o trialcanolamina C₁-C₈); una dialquil C₁-C₈-alcanolamina C₁-C₈; o una alquil C₁-C₈-dialcanolamina C₁-C₈. Una sal de ciclopirox preferida es ciclopirox olamina.

30 Debe entenderse que el término "solvato" según esta invención significa cualquier forma del compuesto según la invención en la que este compuesto se ha unido mediante unión no covalente a otra molécula (lo más probablemente un disolvente polar) incluyendo especialmente hidratos y alcoholatos, por ejemplo, metanolato. Los métodos de solvatación se conocen generalmente en la técnica.

Según una realización de la presente invención, el compuesto ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo está destinado a modular la vía de biosíntesis de hemo.

35 Según una realización de la presente invención, el compuesto ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo está destinado a asociarse de manera no covalente con el grupo hemo para estabilizarlo.

40 Según otra realización de la presente invención, el compuesto ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo está destinado a reducir los niveles tóxicos de porfirina, en particular los niveles de uroporfirinógeno (UROgenI), coproporfirinógeno I (COPROgenI) y/o sus derivados.

45 Según otra realización de la presente invención, el compuesto ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo está destinado a reducir los niveles tóxicos de catabolitos del grupo hemo, en particular los niveles de bilirrubina, biliverdina y/o sus derivados.

Un aspecto adicional es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente que comprende ciclopirox, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos) o composición líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, lociones o emulsiones).

55 Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, por vía tópica, por vía dérmica, por vía nasal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intracerebroespinal, por vía intracraneal, por vía intraespinal, por vía subcutánea, por vía intraarticular, por vía intrasinovial o por vía intratecal. Otras formas de administración no están excluidas. Según una realización particular, dicha composición es para administración oral o tópica. Según otra realización particular, dicha composición se formula como una laca, como un champú, como una disolución, como una suspensión, como una crema, como una loción o como un gel.

60 La composición respectiva también puede, dependiendo de su vía de administración, contener uno o más excipientes conocidos por los expertos en la técnica. La composición o el medicamento según la presente invención puede producirse según procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

65 El término "excipiente" se refiere a componentes de un compuesto farmacológico distintos del principio activo (definición obtenida de la Agencia Europea de Medicamentos - EMA). Preferiblemente incluyen un "portador", adyuvante y/o vehículo". Los portadores son formas a las que se incorporan sustancias para mejorar el suministro y

la eficacia de los fármacos. Los portadores de fármacos se usan en sistemas de suministro de fármacos tales como la tecnología de liberación controlada para prolongar las acciones de fármacos *in vivo*, disminuir el metabolismo de fármacos y reducir la toxicidad de fármacos. Los portadores también se usan en diseños para aumentar la eficacia del suministro de fármacos a los sitios diana de acciones farmacológicas (Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. Institutos Nacionales de Salud). El adyuvante es una sustancia añadida a una formulación de producto farmacológico que afecta a la acción del principio activo de manera predecible. El vehículo es un excipiente o una sustancia, preferiblemente sin acción terapéutica, usado como medio para dar volumen para la administración de medicamentos (Stedman's Medical Spellchecker, © 2006 Lippincott Williams & Wilkins). Tales portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. La selección de estos excipientes y las cantidades que van a usarse dependerán de la forma de aplicación de la composición farmacéutica.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" incluyen en general la erradicación, eliminación, reversión, alivio, modificación o control de las enfermedades mencionadas anteriormente después de su inicio.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevención", "que previene", "preventivo", "prevenir" y "profilaxis" se refieren a la capacidad de una sustancia, composición o medicamento dado para evitar, minimizar o dificultar el inicio o desarrollo de las enfermedades mencionadas anteriormente antes de su inicio.

También se da a conocer un método de tratamiento de un paciente, particularmente un ser humano, que padece las enfermedades mencionadas anteriormente, o es probable que padezca las enfermedades mencionadas anteriormente, que comprende administrar al paciente que necesita tal tratamiento o profilaxis una cantidad eficaz de ciclopirox, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente farmacológicamente activo se entiende una cantidad no tóxica pero suficiente del fármaco o agente para proporcionar el efecto deseado. En la terapia de la presente invención, una "cantidad eficaz" de ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo es la cantidad de ese compuesto que es eficaz para proporcionar el efecto deseado. La cantidad que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, el agente o agentes activos particulares, y similares. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la técnica usando experimentación de rutina.

Ciclopirox puede usarse junto con otros fármacos útiles adicionales en la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden proporcionarse en forma de una composición independiente para su administración simultánea o secuencial a la de la composición farmacéutica que comprende ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, el tratamiento con ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo podría complementarse con la administración de derivados del hemo o productos sanguíneos para contrarrestar la deficiencia del grupo hemo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan como evidencia de apoyo para la invención, ya que demuestran que el compuesto ciclopirox puede interactuar directamente con el hemo y reducir los niveles tóxicos de porfirina en modelos celulares relevantes que acumulan porfirinas e incluso en células sanas. También se ha demostrado que el mecanismo de acción no está relacionado con la regulación génica.

Ejemplos

1. Ciclopirox se asocia al grupo hemo para formar un complejo de coordinación.

Ciclopirox interactúa con el grupo hemo para formar un complejo de coordinación octaédrico según el cambio de color en una muestra del grupo hemo en presencia de cantidades crecientes de CPX (figura 1). Este cambio de color es un rasgo característico de la geometría de coordinación del complejo y significa que CPX *no* compite con hemo sino que lo *estabiliza*. Puede obtenerse evidencia adicional de la interacción a partir del ensanchamiento de la línea paramagnética en la señal de RMN inducida por el ion Fe^{2+} , como se muestra en la figura 2. En realidad, la cuantificación de este experimento repetido a diferentes concentraciones de CPX proporciona una estimación de la constante de disociación entre CPX y el grupo hemo (380 μM , figura 3).

2. Ciclopirox reduce los niveles de URO I en modelos celulares que acumulan porfirinas:

Los datos de apoyo actuales dados a conocer están relacionados con un modelo celular humano *in vitro* de acumulación de porfirina URO I (obtenido de células HEK293 UROS-C73R) en el que hay un defecto genómico estable introducido en la enzima uroporfirinógeno III sintasa que impulsa la acumulación de porfirinas tóxicas. También se ha

demostrado (Blouin *et al.* PNAS, 2013) que el compuesto herramienta MG en el modelo celular humano reduce los niveles tóxicos de porfirina, respaldando las observaciones del modelo *in vivo* mediante análisis FACS de las líneas celulares (figura 4). La acumulación de porfirinas se mide mediante espectroscopía de fluorescencia (fluorocitos) y aparece desplazada hacia la derecha en comparación con las células normales (que se concentran en el área izquierda). Claramente, la adición de ciclopirox puede restaurar en gran medida el fenotipo celular HEK normal en dos líneas celulares independientes diferentes que producen la acumulación de UROI (HEK293 UROS-P248Q y HEK293 UROS-C73R).

3. Ciclopirox reduce los niveles de UROI en diferentes líneas celulares de pacientes con porfiria:

Se amplificaron líneas celulares de diferentes pacientes (fibroblastos) y se incubaron en presencia de CPX (15 μ M). En todos los casos, se observó una reducción de UROI en comparación con un cultivo celular equivalente no tratado (figura 5), lo que indica que CPX regula eficazmente las porfirinas en los metabolismos disparees del grupo hemo.

4. Ciclopirox también es capaz de modular los niveles de COPROI así como de otras porfirinas.

La figura 6 muestra el cromatograma de HPLC de células HEK en ausencia y en presencia de ciclopirox, donde puede apreciarse claramente una reducción en ciertas porfirinas como hexa I, penta I y coprol. De manera similar, los niveles de bilirrubina y biliverdina pueden monitorizarse mediante el mismo análisis, monitorizando simultáneamente a 365 y 405 nm.

5. Ciclopirox no altera la regulación génica de la vía de biosíntesis de hemo

La figura 7 muestra el análisis transcriptómico de células HEK (WT, UROIIS-C73R y UROIIS-P248Q como se indica) para los diferentes genes de la vía de biosíntesis de hemo en ausencia (blanco) y en presencia (negro) de CPX 120 μ M. La principal diferencia observada es la regulación por incremento del gen ALAS para los modelos celulares de enfermedad, como se notificó anteriormente, pero ciclopirox no está alterando la expresión génica para ninguna de las enzimas en la vía, indicando por tanto que el mecanismo de acción no está relacionado con la regulación génica.

Materiales y métodos

Modelo celular *in vitro* de CEP: Se incubaron 50000 células mutantes URO K562/pocillo en 250 μ l de medio/pocillo (medio RPMI con FBS al 10 %). El tercer día, se cambia el medio y se añade el compuesto en diferentes concentraciones. El compuesto se incubaba durante 16-18 h a 37°C. Finalmente, el efecto del compuesto se verifica por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo (FACS).

Otros modelos celulares: Se obtuvieron tres modelos celulares adicionales del repositorio del Instituto Coriell de diferentes pacientes con porfiria. La línea AIP (porfiria aguda intermitente) corresponde a fibroblastos de una mujer portadora de la mutación T35M. La HC (coproporfiria hereditaria) y las líneas celulares sanas son fibroblastos de individuos masculinos.

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): Se usó HPLC para separar y cuantificar las porfirinas de los ensayos enzimáticos PBGD y UROIIS-C73N y de extractos celulares. La HPLC se llevó a cabo en una columna Hypersil ODS C18 (5 μ m, 3x200 mm; Thermo Scientific, MA, EE.UU.). Las porfirinas se separaron con una elución isocrática de 15 min en una fase móvil del 89 % de tampón acetato de amonio 1 M pH 5,16 y el 11 % de acetonitrilo, a un caudal de 0,5 ml/min, y se detectaron por fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 610 nm, que es característica de las porfirinas. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l.

Experimentos de RMN. La constante de unión de CPX-hemo se determinó recogiendo espectros de 1 H-RMN usando la secuencia de pulsos *zgpr* en un espectrómetro Avance III NMR 800 MHz. Tomando 500 μ M del grupo hemo como valor constante, se prepararon diferentes puntos de titulación a 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2, 2,5 y 5 razones molares de hemo:CPX usando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-D6) como disolvente. Se añadieron 200 μ M de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfónico (DSS) a cada muestra como patrón de calibración. Los espectros se procesaron y analizaron usando software TOPSPIN 3.2 (BRUKER). Debido a los electrones no emparejados de Fe(II) que pueden interactuar con los protones próximos a este metal y ensancharlos (relajación rápida), la observación de ensanchamiento en las señales específicas de CPX es consecuencia de una interacción directa. El ensanchamiento de la línea de CPX (desaparición de la señal) tras la adición del hemo se monitorizó usando dos picos específicos en 6,2 y 5,96 ppm. Las áreas de los picos se calcularon y normalizaron usando DSS. Se realizó un análisis de datos adicional y una estimación de k_D usando MATLAB en secuencias de comandos internas.

Referencias

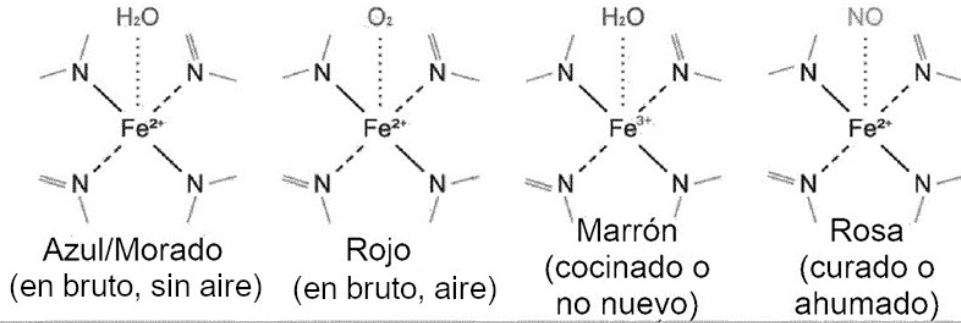
Blouin JM, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, 110, 18238-18243.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ciclopirox o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por biosíntesis de grupo hemo desregulada y caracterizada por la acumulación de UROI, COPROI, bilirrubina y/o biliverdina,
con la condición de que dicha enfermedad no sea porfiria eritropoyética congénita.
- 10 2. Ciclopirox para su uso según la reivindicación 1, en el que la sal es ciclopirox olamina.
3. Ciclopirox para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad es una porfiria seleccionada del grupo que consiste en anemia sideroblástica, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria, harderoporfiria, porfiria variegata y protoporfiria eritropoyética.
- 15 4. Ciclopirox para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Lucey-Driscoll, síndrome de Gilbert, síndrome de Rotor, síndrome de Dubin-Johnson y otras hiperbilirrubinemias hereditarias.
- 20 5. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad provocada por biosíntesis de grupo hemo desregulada y caracterizada por la acumulación de UROI, COPROI, bilirrubina y/o biliverdina,
con la condición de que dicha enfermedad no sea porfiria eritropoyética congénita,
25 comprendiendo dicha composición ciclopirox, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que dicha composición es para administración oral o tópica.
7. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en la que dicha composición se selecciona del grupo que consiste en una laca, un champú, una disolución, una suspensión, una crema, una loción o un gel.
- 35 8. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que la enfermedad es una porfiria seleccionada del grupo que consiste en anemia sideroblástica, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria, harderoporfiria, porfiria variegata y protoporfiria eritropoyética; o una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Lucey-Driscoll, síndrome de Gilbert, síndrome de Rotor, síndrome de Dubin-Johnson y otras hiperbilirrubinemias hereditarias.
- 40

Figura 1

A



B

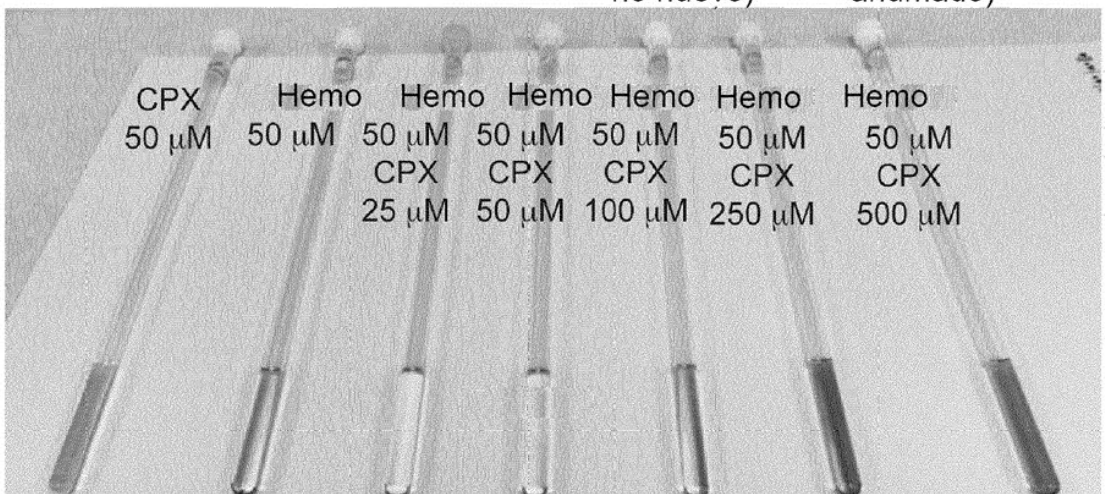


Figura 2

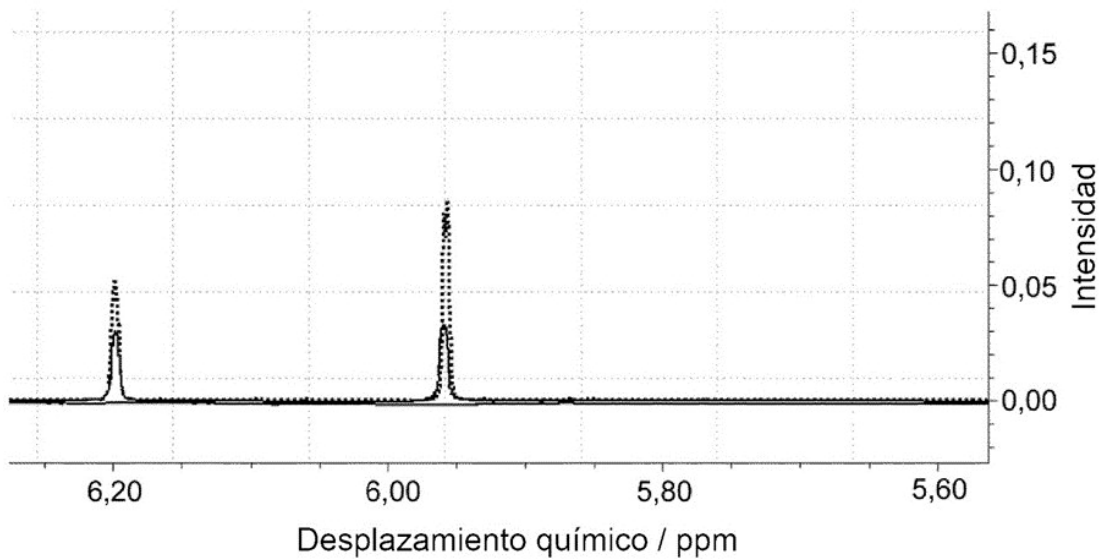


Figura 3

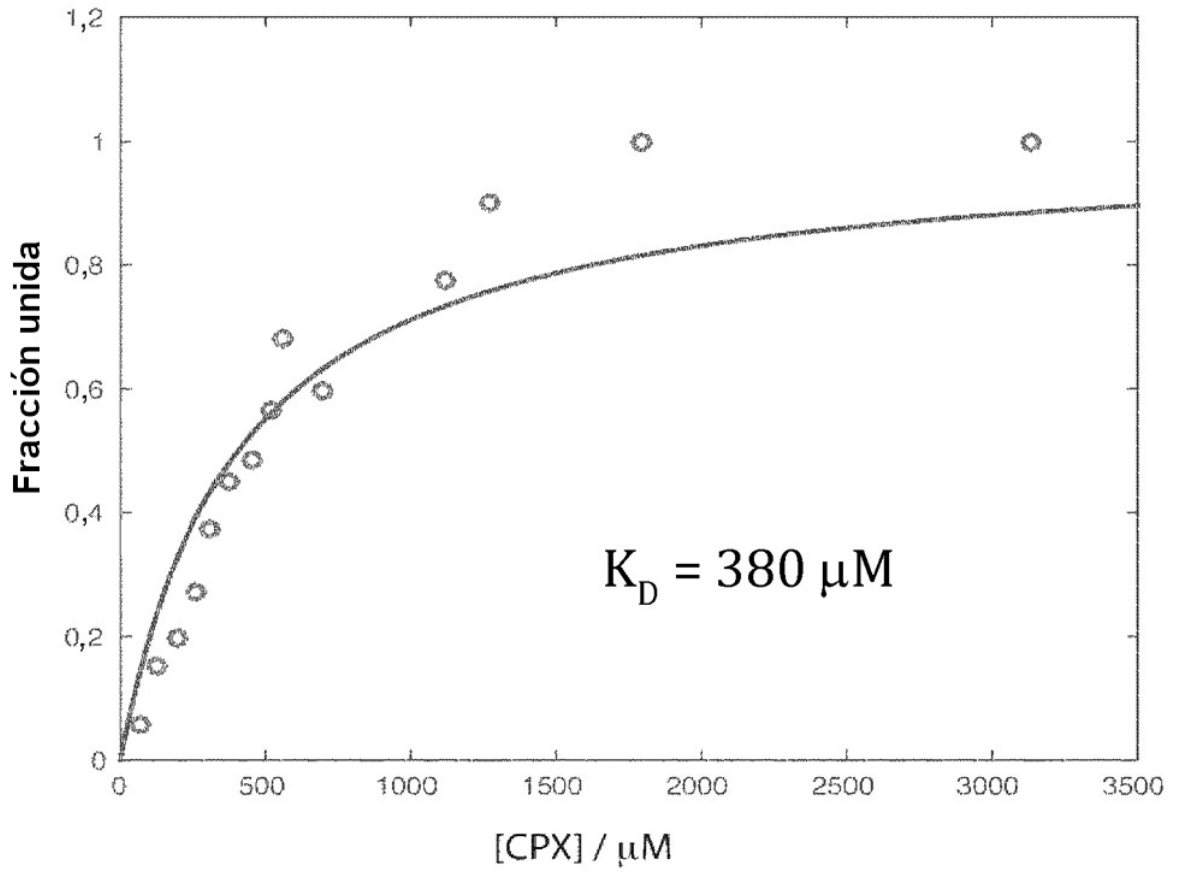


Figura 4

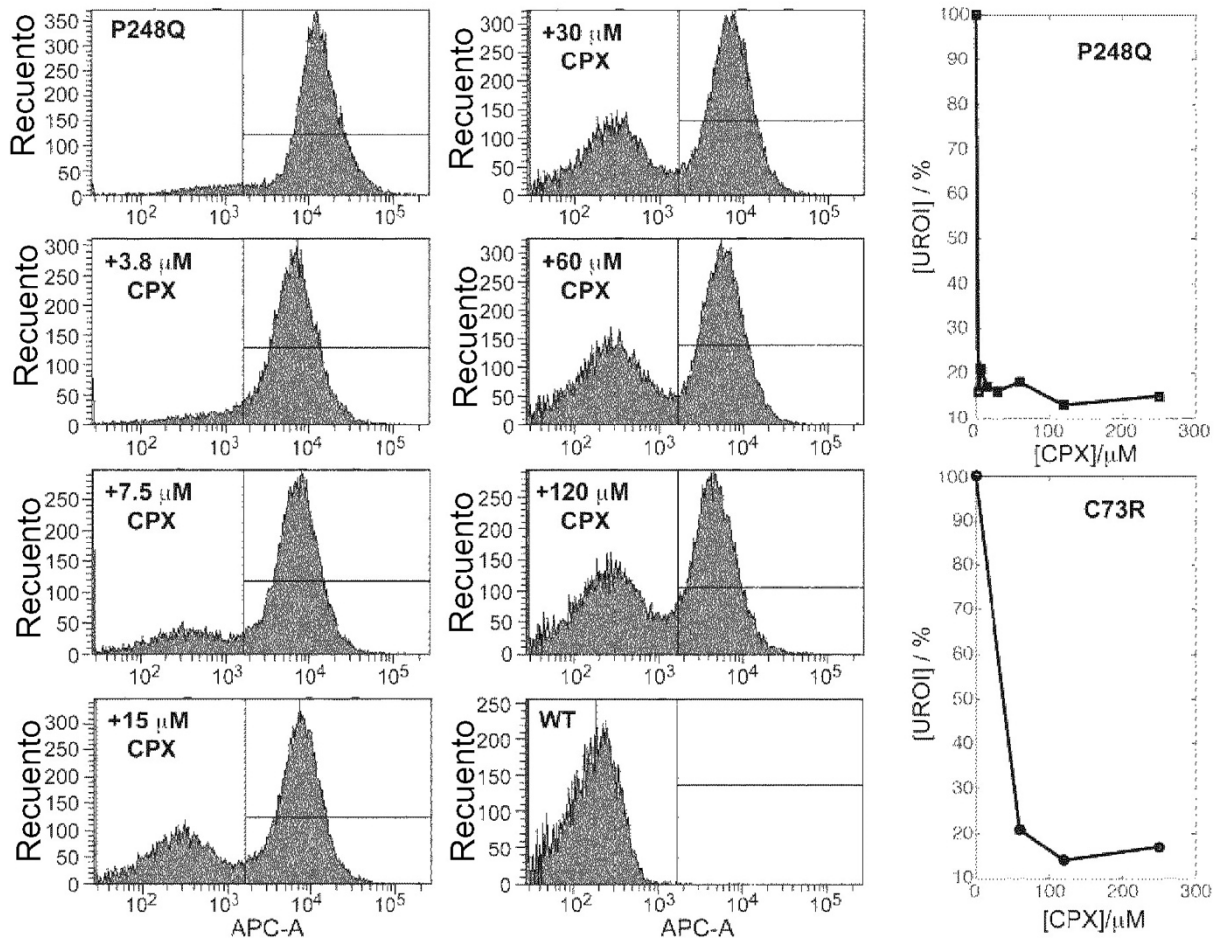


Figura 5

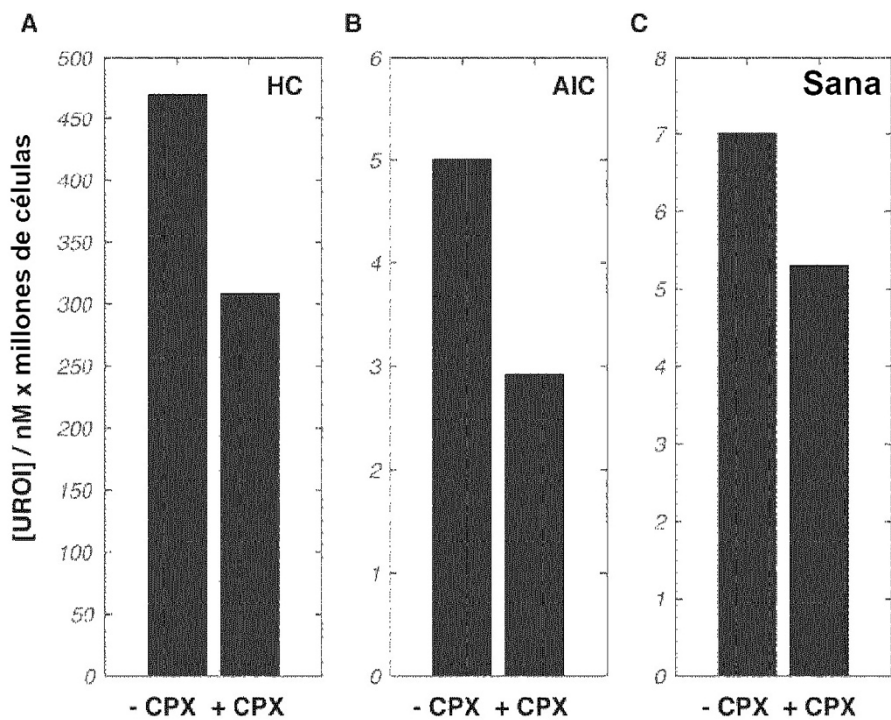


Figura 6

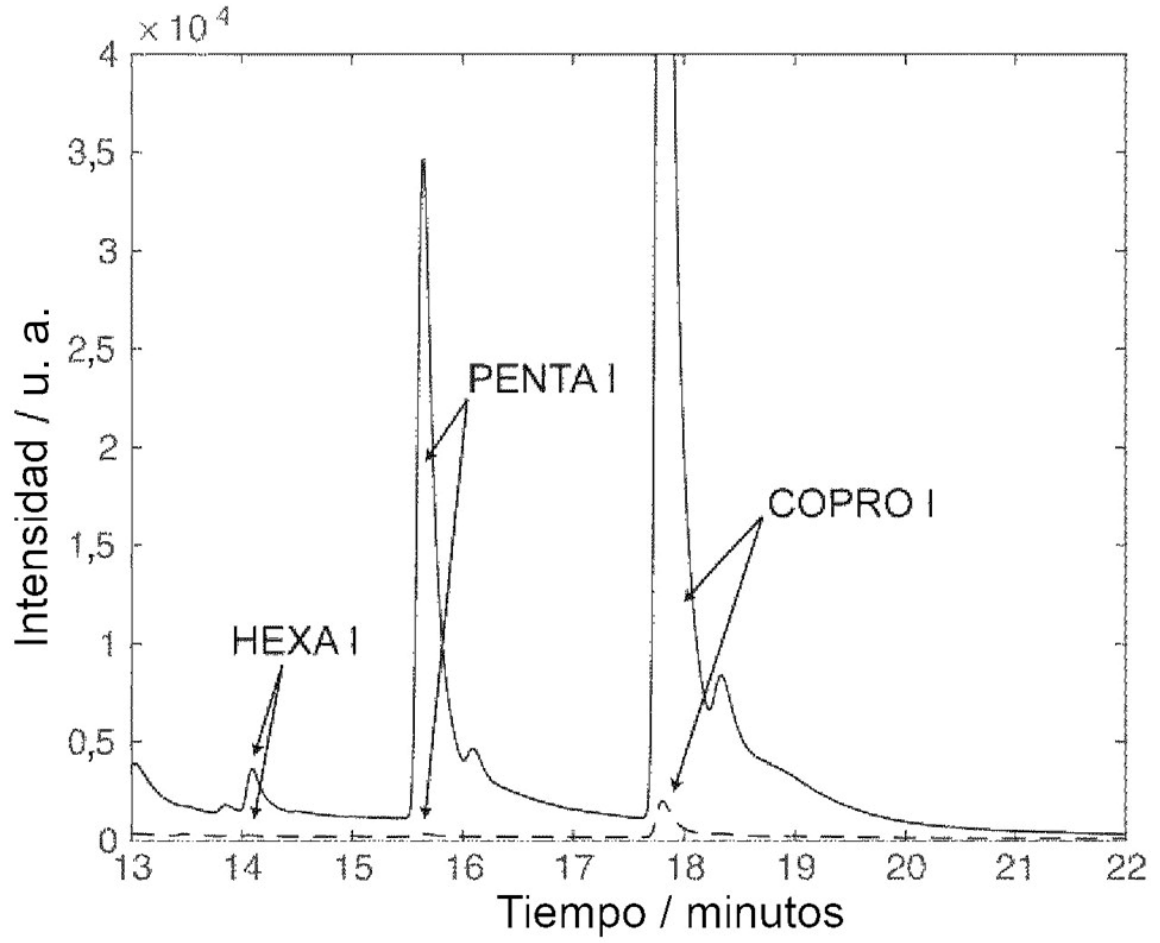


Figura 7

