

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901954045A1

Publication Date

20121214

Applicant

RARE PARTNERS SRL

Title

TRIMETILANGELICINA COME CORRETTORE DI CFTR IN CELLULE
DELL'EPITELIO BRONCHIALE

9441 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“TRIMETILANGELICINA COME CORRETTORE DI CFTR IN
CELLULE DELL’EPITELIO BRONCHIALE”**

a nome : **1. AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA
INTEGRATA DI VERONA (30%); 2. UNIVERSITÀ DEGLI
STUDI DI FERRARA (30%); 3. UNIVERSITÀ DEGLI
STUDI DI BARI (30%); 4. RARE PARTNERS s.r.l. (10%)**

con sede in: 1. Verona; 2. Ferrara; 3: Bari; 4. Milano

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce all’impiego di uno psoralene angolare, la trimetilangelicina (4,6,4’-trimetilangelicina - TMA), quale molecola in grado di correggere la localizzazione intracellulare della forma mutata della proteina di membrana denominata CFTR (da *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) alterata nei tessuti di pazienti affetti da fibrosi cistica; si propone tale molecola per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico della fibrosi cistica (CF).

Stato della tecnica

La fibrosi cistica è una malattia genetica autosomica recessiva causata da mutazioni del gene che codifica CFTR. L’incidenza della malattia nella popolazione caucasica è di 1/2000-3000 nuovi nati, mentre è molto inferiore nei nativi africani ed asiatici (1). Per queste ragioni, la scoperta di molecole in grado di correggere e/o potenziare il CFTR riveste una grande importanza nello sviluppo di terapie innovative per la fibrosi cistica.

D’altra parte l’impiego di molecole allo scopo di inibire il processo

infiammatorio cronico nelle vie respiratorie di soggetti affetti da fibrosi cistica è effettuato da tempo. Nella maggior parte dei casi, tali molecole sono state applicate alla patologia infiammatoria cronica delle vie respiratorie nella fibrosi cistica dopo un uso consolidato in altre patologie infiammatorie croniche, sistemiche o locali, non necessariamente delle vie respiratorie. Le prime molecole utilizzate sono stati i farmaci anti-infiammatori corticosteroidi, quali il prednisolone per via sistemica (2) oppure il fluticasone propionato (3) ed il beclometasone (4) per via inalatoria.

Successivamente, molecole anti-infiammatorie quali ibuprofene sono state largamente applicate (5,6), come pure macrolidi quali azitromicina (7,8). Inoltre, allo scopo di ottenere un efficace effetto anti-infiammatorio, altre molecole sono state studiate a livello sperimentale, quali l'antiossidante N-acetilcisteina (9) e l'antagonista dei recettori dei leucotrieni montelukast (10), per citare i più noti. In sintesi, in diversi casi l'effetto anti-infiammatorio è stato correlato in studi clinici controllati con un significativo miglioramento oppure un rallentato decadimento della funzionalità respiratoria, mentre i principali limiti applicativi hanno riguardato l'insorgenza di effetti indesiderati sulla funzione corticosurrenale, oppure renale o gastrointestinale.

Rispetto al trattamento antiinfiammatorio, una terapia diretta a ridurre l'espressione di IL-8 nel trattamento di pazienti affetti da fibrosi cistica potrebbe pertanto ridurre gli effetti negativi indotti dal processo infiammatorio, anche se è necessario combinare tale attività con quella di altre molecole in grado di correggere gli effetti delle mutazioni che causano inattività della proteina CFTR. Questa necessità riguarda una coorte importante di pazienti, nei quali l'attività del CFTR è particolarmente

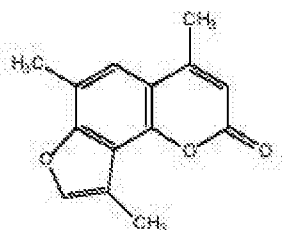
disregolata.

Abbiamo precedentemente dimostrato che un analogo della angelicina, la trimetilangelicina, è un potente inibitore del processo infiammatorio indotto in cellule fibrocistiche da *P. aeruginosa* e un potente potenziatore di CFTR (11). Di interesse è l'osservazione che l'attività antiinfiammatoria è notevolmente superiore a quella di altri psoraleni correntemente utilizzati in terapia clinica di patologie infiammatorie croniche della cute, come ad esempio 5-metossipsoralene (5-MOP) ed 8-metossipsoralene (8-MOP)(11).

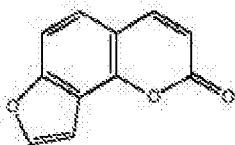
Descrizione dell'invenzione

Si è ora sorprendentemente scoperto che la trimetilangelicina (TMA) è un potente correttore di CFTR. Questo effetto è inatteso e non descritto precedentemente studiando psoraleni lineari ed angolari, oggetto di studio da decenni anche su cellule fibrocistiche. Pertanto, la stessa molecola (TMA) possiede tre attività, tutte di interesse per la terapia della fibrosi cistica: attività antiinfiammatoria, attività potenziatrice di CFTR e attività di correzione di CFTR.

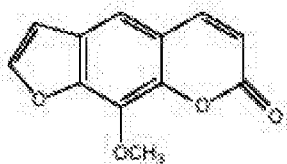
La formula di struttura della TMA, paragonata all'angelicina e al composto 8-MOP e 5-MOP (scelti a titolo esemplificativo tra gli psoraleni lineari), è la seguente:



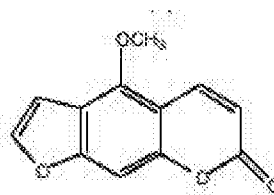
Trimetilangelicina (TMA)



Angelicina (2-oxo-(2H)-furo(2,3-H)-1-benzopirano)



8-metossipsoralene(8-MOP)



5-metossipsoralene (5-MOP)

In particolare, i risultati pregressi ottenuti hanno dimostrato che TMA inibisce l'accumulo di mRNA per IL-8 in cellule epiteliali bronchiali IB3-1 in seguito ad infezione con *P. aeruginosa* (11). IB3-1 è una linea cellulare derivata dall'epitelio bronchiale, immortalizzata con adeno12/SV40 e derivata da un paziente CF con genotipo F508del/W1282X (12). Parallelamente TMA possiede un effetto potenziatore di CFTR.

L'attività di correzione di CFTR, che sta alla base dell'invenzione, è inaspettata alla luce degli utilizzi terapeutici noti di analoghi strutturali di TMA (13-24).

La sintesi chimica di TMA e, più in generale degli psoraleni, è stata descritta da diversi gruppi di ricerca (si vedano ad esempio i riferimenti bibliografici n. 15-18).

Un primo oggetto della presente invenzione è pertanto trimetilangelicina per l'uso come correttore di CFTR in pazienti affetti da fibrosi cistica.

D'altra parte, un trattamento combinato con diversi modificatori del processo infiammatorio potrebbe permettere di incrementare la risposta biologica e clinica alla terapia.

Perciò, un secondo oggetto della presente invenzione è una combinazione di trimetilangelicina (TMA) con almeno un'ulteriore molecola ad azione anti-infiammatoria per l'uso nel trattamento della fibrosi cistica

oppure con un altro correttore o potenziatore di CFTR, quale ad esempio il correttore VX809 e il potenziatore N-(2,4-di-ter-butyl-5-hydroxyphenyl)4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide (VX770).

Esempi di modificatori del processo infiammatorio comprendono azitromicina e ibuprofene.

La TMA, da sola o associata a detti farmaci, potrà essere somministrata per via orale o aerosolica; esempi di formulazioni adatte alla somministrazione orale comprendono capsule, compresse, sciroppi, soluzioni o sospensioni bevibili e simili forme di dosaggio convenzionali. Per la somministrazione aerosol, forme di dosaggio adatte comprendono soluzioni, sospensioni o polveri da somministrare con l'ausilio di dispositivi convenzionali quali i cosiddetti MDI (metered dose inhalers), eventualmente utilizzando opportuni veicoli gassosi quali HFA.

I dosaggi di TMA saranno determinati dagli esperti del settore sulla base dei tests farmacodinamici e farmacocinetici, dipenderanno inoltre dal peso, dall'età e dalle condizioni del paziente e da altri parametri che saranno determinati dal medico curante. In linea di massima, le dosi efficaci potranno essere comprese nell'intervallo da circa 10 a circa 500 mg, preferibilmente da circa 10 a circa 250 mg di TMA al giorno, eventualmente suddivise in più somministrazioni, anche se non si possono escludere dosaggi inferiori o superiori.

La TMA potrà essere somministrata per mezzo di opportuni sistemi di delivery, allo scopo di facilitare l'effetto di correzione/potenziamento del CFTR rispetto all'effetto antiinfiammatorio, in relazione al genotipo/fenotipo del paziente.

L'attività di TMA come correttore di CFTR è stata dimostrata valutando l'efflusso di cloro, misurato mediante spettrofluorimetria. Inoltre l'uso di anticorpi monoclonali per CFTR ha permesso di mettere in evidenza la correzione della localizzazione intracellulare, portando la proteina CFTR mutata sulla membrana plasmatica.

L'invenzione è illustrata in maggior dettaglio negli esempi seguenti.

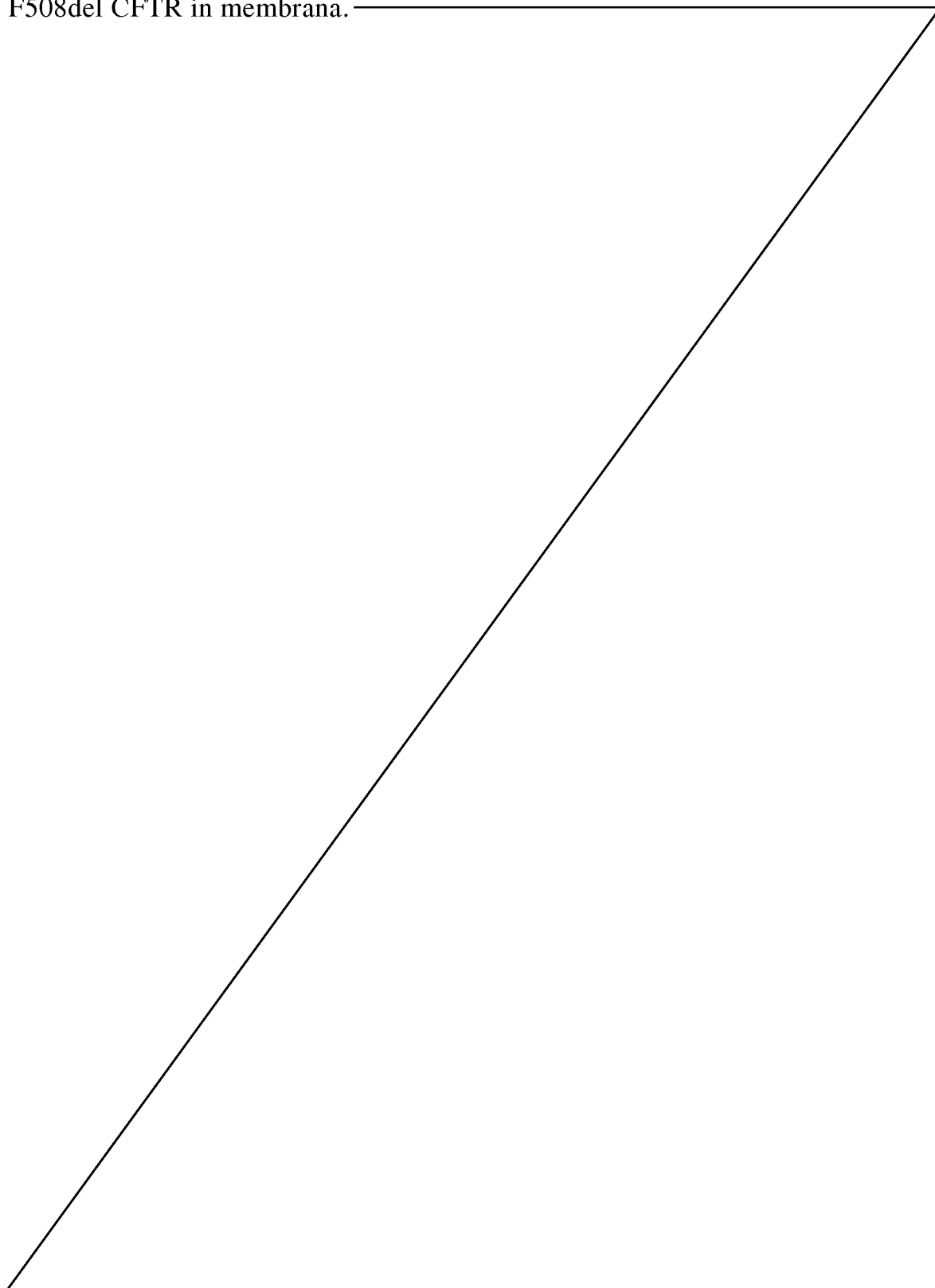
ESEMPIO 1: Ripristino dell'efflusso di cloro CFTR-mediato in monolayers polarizzati di cellule CFBE41o- incubate per 24 ore con TMA 100 nM

L'efflusso di cloro è stato misurato mediante spettrofluorimetria dopo pre-incubazione dei monostrati di cellule bronchiolari FC omozigoti per la mutazione F508del CFTR con il fluoroforo MQAE (5mM), sensibile alla concentrazione intracellulare di cloro. I risultati sono riportati in Figura 1. Nell'istogramma è riportato la media dei valori di efflusso di cloro CFTR-mediato calcolato come la differenza tra efflusso di cloro indotto dall'attivazione della proteinchinasi-AMP ciclico dipendente (PKA) indotta da forskolin (FSK 10 μ M) in assenza e presenza dell'inibitore specifico CFTRinh-172 (5 μ M). L'efflusso di cloro CFTR-dipendente in cellule trattate per 24 ore con il TMA (100 nanomolare) è significativamente differente dalla media dei valori ottenuti in cellule bronchiolari FC di controllo o trattate con il solo solvente (3% DMSO/Metanolo).

ESEMPIO 2: cellule CFBE41o-, trattate o no con TMA 100 nM per 24 ore

Monostrati polarizzati di cellule bronchiolari FC non permeabilizzate erano marcate con l'anticorpo primario monoclonale CF3 che riconosce il

primo loop extracellulare del CFTR. Come è evidente in figura 2, (riquadro a destra) solo i monostrati cellulari preincubati per 24 ore con TMA (100 nanomolare) mostrano una significativa marcatura della proteina mutata F508del CFTR in membrana.



Bibliografia

- 1) Welsh JM, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis in «The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases». Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds) McGraw-Hill, New York, 2001.
- 2) Eigen H, Rosenstein BJ, FitzSimmons S, Schidlow DV. A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group. J Pediatr. 126:515-23, 1995.
- 3) Balfour-Lynn IM, Klein NJ, Dinwiddie R. Randomised controlled trial of inhaled corticosteroids (fluticasone propionate) in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 77:124-30, 1997.
- 4) Wojtczak HA, Kerby GS, Wagener JS, Copenhaver SC, Gotlin RW, Riches DW, Accurso FJ. Beclomethasone dipropionate reduced airway inflammation without adrenal suppression in young children with cystic fibrosis: a pilot study. Pediatr Pulmonol. 32:293-302, 2001.
- 5) Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB. Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. N Engl J Med. 332:848-54, 1995.
- 6) Lands LC, Milner R, Cantin AM, Manson D, Corey M. High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial. J Pediatr. 151:249-54, 2007.
- 7) Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, Coquillette S, Fieberg AY, Accurso FJ, Campbell PW 3rd; Macrolide Study Group. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled

trial. JAMA. 290:1749-56, 2003.

8) Clement A, Tamalet A, Leroux E, Ravilly S, Fauroux B, Jais JP. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. Thorax. 61:895-902, 2006.

9) Tirouvanziam R, Conrad CK, Bottiglieri T, Herzenberg LA, Moss RB, Herzenberg LA. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA. 103:4628-33, 2006.

10) Schmitt-Grohé S, Eickmeier O, Naujoks C, Schubert R, Lentze MJ, Zielen S, Rietschel E. Effects of long-term treatment with montelukast in mild cystic fibrosis (long term treatment with montelukast in cystic fibrosis). Respir Med. 101:684, 2007.

11) Tamanini A, Borgatti M, Finotti A, Piccagli L, Bezzetti V, Favia M, Guerra L, Lampronti I, Bianchi N, Dall'acqua F, Vedaldi D, Salvador A, Fabbri E, Mancini I, Nicolis E, Casavola V, Cabrini G, Gambari R. Trimethylangelicin Reduces IL-8 Transcription and Potentiates CFTR Function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 300: L380-90, 2011.

12) Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R, Guggino WB. A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. Am J Respir Cell Mol Biol. 4:313-9, 1991.

13) Stern RS. Psoralen and ultraviolet a light therapy for psoriasis. N Engl J Med. 357:682-90, 2007.

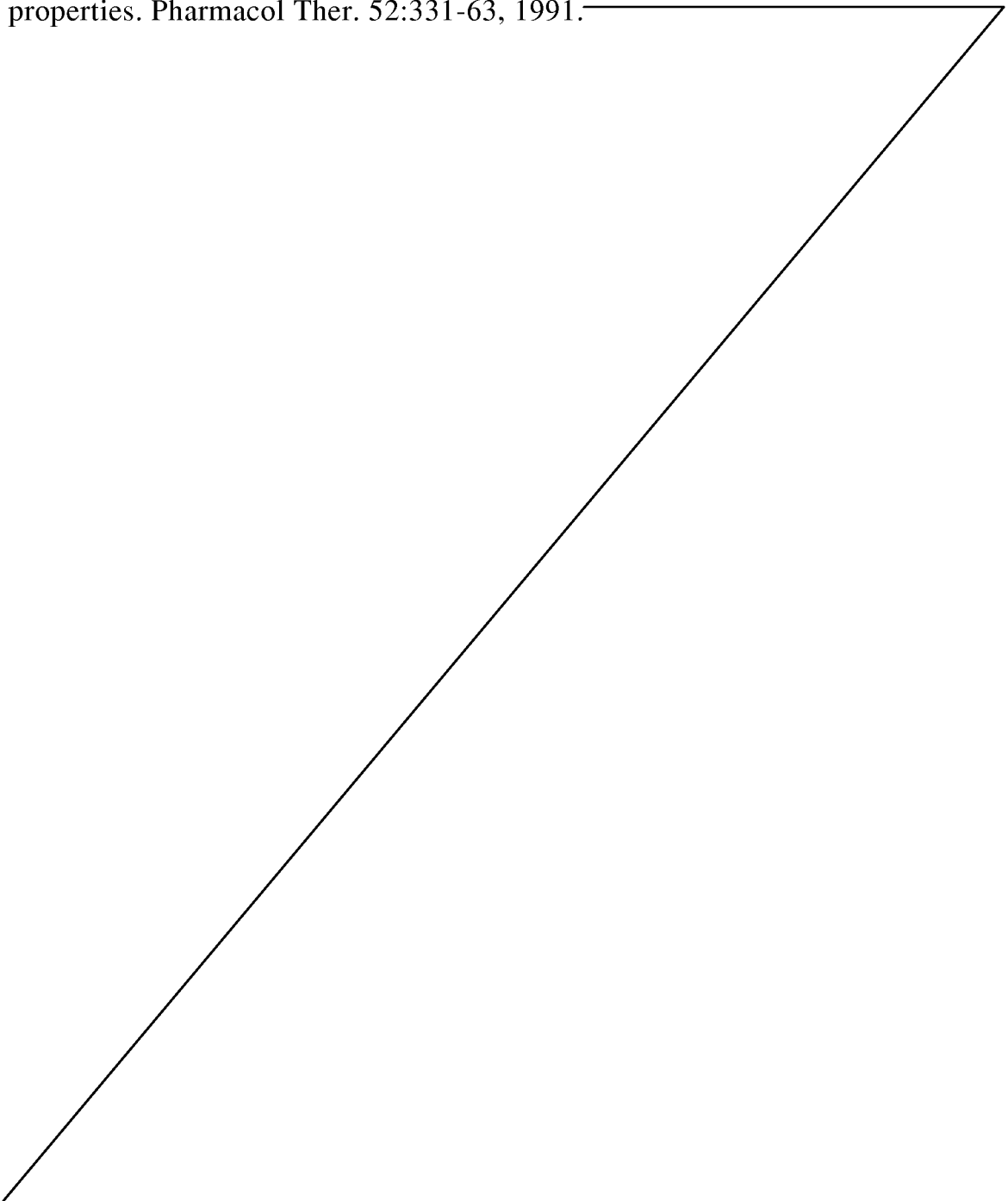
14) Kong LD, Tan RX, Woo AY, Cheng CH. Inhibition of rat brain monoamine oxidase activities by psoralen and isopsoralen: implications for the treatment of affective disorders. Pharmacol Toxicol. 88:75-80, 2001.

- 15) Mosti L, Lo Presti E, Menozzi G, Marzano C, Baccichetti F, Falcone G, Filippelli W, Piucci B. Synthesis of angelicin heteroanalogues: preliminary photobiological and pharmacological studies. *Farmaco*. 53:602-10, 1998.
- 16) Sardari S, Mori Y, Horita K, Micetich RG, Nishibe S, Daneshtalab M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorg Med Chem*. 7:1933-40, 1999.
- 17) Jakobs AE, Christiaens L.A Convenient Synthesis of Thiopyrano[2,3-e]benzofuran: A New Sulfur Analogue of Angelicin. *J Org Chem*. 61:4842-4844, 1996.
- 18) Iester M, Fossa P, Menozzi G, Mosti L, Baccichetti F, Marzano C, Simonato M. Synthesis and photobiological properties of 3-acylangelicins, 3-alkoxycarbonylangelicins and related derivatives. *Farmaco* 50:669-78, 1995.
- 19) Bisagni E. Synthesis of psoralens and analogues. *J Photochem Photobiol B*. 14:23-46, 1992.
- 20) Dall'Acqua F, Vedaldi D, Bordin F, Baccichetti F, Carlassare F, Tamaro M, Rodighiero P, Pastorini G, Guiotto A, Recchia G, Cristofolini M. 4'-Methylangelicins: new potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. *J Med Chem*. 26:870-6, 1983.
- 21) Dall'Acqua F, Vedaldi D, Guiotto A, Rodighiero P, Carlassare F, Baccichetti F, Bordin F. Methylangelicins: new potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. Structure-activity study on the dark and photochemical interactions with DNA. *J Med Chem*. 24:806-11, 1981.
- 22) Conconi MT, Montesi F, Parnigotto PP. Antiproliferative activity and phototoxicity of some methyl derivatives of 5-methoxypsoralen and

5-methoxyangelicin. *Pharmacol Toxicol.* 82:193-8, 1998.

23) Marzano C, Severin E, Pani B, Guiotto A, Bordin F. DNA damage and cytotoxicity induced in mammalian cells by a tetramethylfuroquinolinone derivative. *Environ Mol Mutagen.* 29:256-64, 1997.

24) Bordin F, Dall'Acqua F, Guiotto A. Angelicins, angular analogs of psoralens: chemistry, photochemical, photobiological and phototherapeutic properties. *Pharmacol Ther.* 52:331-63, 1991.



RIVENDICAZIONI

1. Trimetilangelicina (TMA) per l'uso come correttore di CFTR in pazienti affetti da fibrosi cistica.
2. Formulazioni per il trattamento della fibrosi cistica che comprendono l'associazione di trimetilangelicina con almeno un altro modificatore del processo infiammatorio e/o con un altro correttore o potenziatore di CFTR.
3. Formulazioni secondo la rivendicazione 2 in cui l'altro modificatore del processo infiammatorio è ibuprofene oppure azitromicina.
4. Formulazioni secondo la rivendicazione 2 in cui il correttore di CFTR è VX809 e il potenziatore di CFTR è VX770.

Milano, 14 giugno 2011

CLAIMS

1. Trimethylangelicine (TMA) for use as CFTR corrector in patients affected by cystic fibrosis.
2. Formulations for the treatment of cystic fibrosis which comprise the combination of trimethylangelicine with at least one other modifier of the inflammatory process and/or with another CFTR corrector or enhancer.
3. Formulations as claimed in claim 2 wherein the modifier of the inflammatory process is selected from ibuprofen or azitromycine.
4. Formulations as claimed in claim 2 wherein the CFTR corrector is VX809 and the CFTR enhancer is VX770.

Figura 1

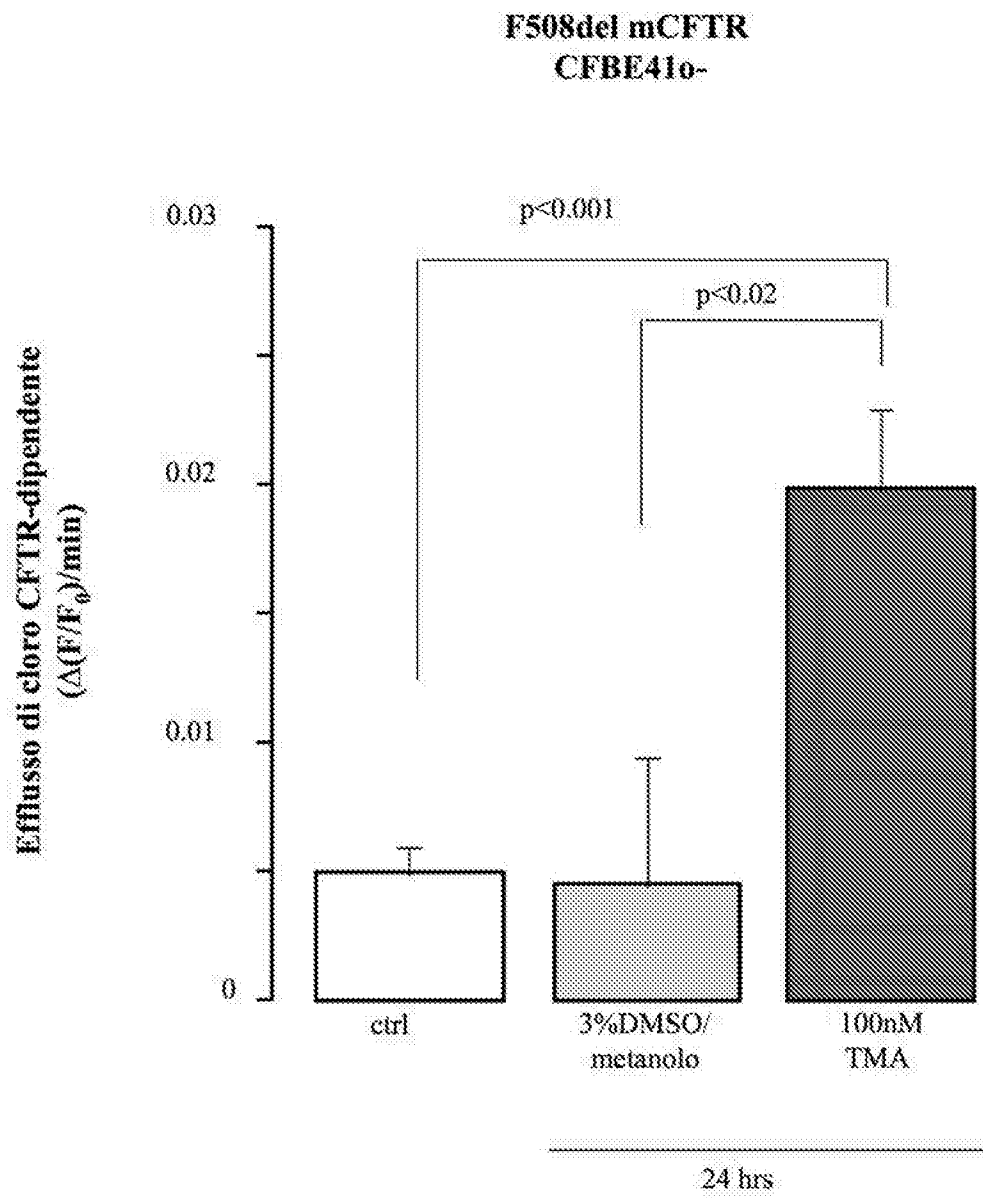


Figura 2

