

**REFERENCIA:** P200502229

**TITULO:** TRATAMIENTO DE LA ACONDROPLASIA POR LA ADMINISTRACION DE DINUCLEOTIDOS.

**DIRECCION SOLIC:** C/ CORUÑA N. 50 - 1C,VIGO 36201 PONTEVEDRA

**SOLICITANTES:** FUNDACION MAGAR

**NACION SOLICITANTE:** ES

**NACION INVENTOR:** ES

**NUM PUB OEPM:** 2278519

**COD PUBLICACION:** A1

**INVENTORES:** PINTOR JUST,JESUS  
GUZMAN ARANGUEZ,ANA ISABEL  
IRAZU MARTINEZ,MARTA  
PERAL CERDA,ASUNCION

**FEC INF TEC:** 20070801

**NUM SOL OEPM:** P200502229

**TIPO PATENTE:** P

**FEC SOL OEPM:** 20050902

**PROVINCIA SOL:** 36

**FEC PUB SOL OEPM:** 20070801

**INF EST TEC OEPM:** US2003207825 US2003036527 WO112644 EP1512401 US2003068313

**CATEGORIA:** A,A,A,A,A

**CLASIF 8:** A61K31/7084 (2006.01)  
A61P19/08 (2006.01)

**RESUMEN:** Tratamiento de la acondroplasia por la administración de dinucleótidos.#La presente invención describe la aplicación de diversos dinucleótidos para el tratamiento de la acondroplasia (enanismo). La aplicación de los mencionados dinucleótidos es capaz de reducir la presencia del receptor mutado (FGFR3) en los condrocitos acondroplásicos con lo que al desaparecer se observa una disminución de los efectos patológicos asociados a esta enfermedad.

**TEXTO DEL PDF:** [ A1 - DESC ] **DESCRIPCIÓN** Tratamiento de la acondroplasia por la administración de dinucleótidos. Objeto de la invención La presente invención describe el empleo de determinados dinucleótidos para el tratamiento de la patología denominada acondroplasia o enanismo. Estado de la técnica El crecimiento de los huesos largos depende de la proliferación y maduración de las células que constituyen el cartílago, los condrocitos. Estas células van a ser reemplazadas de modo gradual por el tejido óseo durante el crecimiento del individuo. Los condrocitos en su proceso de maduración pasan por una primera etapa en la que se hipertrofian para posteriormente morir en un proceso de tipo apoptótico (Roach et al., 1995; Gibson et al., 1997). El crecimiento y desarrollo

de los condrocitos en los cartílagos que flanquean los huesos está controlado por los factores de crecimiento de fibroblastos. Estos factores activan cuatro tipos diferentes de receptores denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, estando los tres primeros implicados en enfermedades congénitas esqueléticas y craneales. Dentro de estas alteraciones destaca la acondroplasia, la forma más común de enanismo congénito. Esta patología se caracteriza por una talla baja desproporcionada y otras anormalidades del esqueleto (Anon, 1988). El receptor alterado en la acondroplasia es el FGFR3, cuyo gen se localiza en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Los estudios realizados en distintas poblaciones, han establecido la existencia de una mutación frecuente (Gly380Arg) en el dominio transmembrana del receptor (Shiang et al., 1994; Rousseau et al., 1994). Junto con esta modificación, observada en el 97% de los casos, también se han identificado otras mutaciones menos frecuentes como el cambio de una Gly 375 por Cys fuera de la región transmembrana (Superti-Furga et al., 1995; Chen et al., 1999), la sustitución de la Gly 346 por Glu (Prinos et al., 1995), así como el reemplazamiento de la Lys 650 por Met en el caso de la forma más severa de acondroplasia (Iwata et al., 2000). Ratones knock-out para el gen del receptor FGFR3 presentan un aumento del crecimiento endocondrial, expansión de la placa de crecimiento ósea y aumento de la proliferación de condrocitos, lo que ha permitido sugerir el papel del receptor FGFR3 como regulador negativo del crecimiento del hueso (Colvin et al., 1996; Goldfarb 1996; Burke et al., 1998), si bien las rutas a través de las cuales influye en los procesos de proliferación y diferenciación de los condrocitos no han sido totalmente esclarecidas. Como miembro de la familia de receptores con actividad tirosina quinasa, este receptor se activa en presencia del FGF y de proteoglicanos del grupo heparán sulfato, para producir la dimerización del receptor y la posterior autofosforilación de los residuos de tirosina. Estos residuos fosforilados de tirosina sirven como sitios de unión de proteínas y efectores que propagan las señales de FGFR3 (Schlessinger et al., 2000; Hart et al., 2001). Los desórdenes en el crecimiento del hueso son resultado del aumento de la transmisión de señales por parte del receptor mutado como consecuencia de la activación sostenida del mismo. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar cómo se produce esta activación continuada de FGFR3. Por ejemplo, en el caso de la mutación G380R, la más típica de la acondroplasia y que afecta a la región transmembrana, se origina una estabilización del dímero, prerequisite para la activación del receptor y que le conduce a activarse incluso en ausencia del agonista (Naski et al., 1996; Webster and Donahue, 1996). Independientemente de cómo se origine la activación sostenida del receptor, una vez que ésta se produce se altera el equilibrio normal entre los procesos de proliferación y maduración inhibiéndose el correcto crecimiento de la placa ósea. Gran parte de los estudios que se han realizado hasta el momento están dirigidos a determinar las vías de señalización celular empleadas por el receptor FGFR3 activado para mediar sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de condrocitos. Así distintas investigaciones han identificado a la ruta de señalización de STAT1 como la vía a través de la cual el receptor FGFR3 inhibe la proliferación de los condrocitos (Li et al., 1999; Sahni et al., 1999, 2001). La activación de STAT1

provoca el aumento de expresión del inhibidor de ciclo celular p21, bloqueándose de esta forma el crecimiento celular. Con respecto a la influencia del receptor FGFR3 en la diferenciación de los condrocitos existe aún una cierta controversia. Mientras algunos autores sostienen que la activación de FGFR3 acelera el proceso de diferenciación promoviendo el incremento de condrocitos hipertróficos (Minina et al., 2002; Dailey et al., 2003), otros plantean que la activación del receptor inhibe la diferenciación de condrocitos a través de la ruta de señalización celular de las MAP quinasas (Murakami et al., 2004). Además, también mediante esta cascada de señalización celular de las MAP quinasas, la activación constitutiva de FGFR3 provoca una menor síntesis de matriz extracelular, hecho que también influiría en la inhibición del crecimiento óseo (Yasoda et al., 2003).

2 null ES 2 278 519 A1 Para abordar todos estos estudios están siendo empleados diversos sistemas modelo. Así, se ha diseñado un ratón modificado genéticamente al que se le ha incorporado el gen mutado del receptor FGFR3 (Wang et al., 1999; Segev et al., 2000). Junto con este modelo animal también se utilizan cultivos primarios de condrocitos o células como las de condrosarcoma de rata (RCS) que presentan marcadores característicos de condrocitos (Rozenblatt-Rosen et al., 2001). Adicionalmente se emplean condrocitos de rata (RCJ) transfectados de manera estable tanto con el receptor FGFR3 humano intacto como con la forma mutada G380R (Monsonigo-Ornan et al., 2000). En cuanto a las estrategias para el tratamiento farmacológico de la acondroplasia, no existe en la actualidad ningún tratamiento comercializado. Este hecho no impide que existan un número relativamente discreto de patentes sobre el tema. Así por ejemplo, existen patentes basadas en formulaciones cuyo fin principal es la intervención de la guanilato ciclasa b de los condrocitos acondroplásicos (US 2003068313, US 2004198665). En otros casos el aumento del crecimiento y de la reabsorción ósea se lleva a cabo por medio de compuestos con un núcleo de pirazilo (EP 1512401). Por último, también se ha encontrado que los péptidos natriuréticos son capaces de modificar la condición característica de la acondroplasia y otras patologías óseas (US 2004138134, WO02074234). En todos estos ejemplos se barajan tratamientos para la acondroplasia por medio de moléculas que nada tienen que ver con las descritas en la presente invención. Por otro lado, los mecanismos moleculares involucrados en las patentes descritas en este párrafo no afectan directamente al receptor de FGFR3 acondroplásico, sin embargo, en la presente patente sí que se describe una disminución del mencionado receptor. Un grupo interesante de moléculas de naturaleza nucleotídica son los dinucleósidos polifosfatos. Esta familia de moléculas intervienen en un número importante de procesos biológicos (Baxi and Vishwanatha, 1995; Flores et al., 1999; McLennan, Szalata, 2001; van der Giet et al., 2002). Un grupo de estos dinucleótidos, los diadenosin polifosfatos presentan un gran interés por su papel como neurotransmisores (Hoyle, 1990; Miras-Portugal et al., 1998; Pintor and Miras-Portugal, 1995). Desde el punto de vista molecular, los diadenosin polifosfatos son compuestos que están formados por dos adenosinas unidas entre sí por una cadena de fosfatos. A estas biomoléculas se les suele denominar de forma abreviada como Ap<sub>n</sub>A donde  $n$  es el número de fosfatos que puentea ambas

adenosinas. La gran variabilidad de compuestos pertenecientes a esta familia de dinucleótidos se establece en base a dos aspectos fundamentales, por una parte a la longitud de la cadena de fosfatos y por otro lado las bases nitrogenadas que posea el dinucleótido. Es precisamente la variabilidad en las bases nitrogenadas uno de los aspectos más atractivos de estas moléculas. La presencia de dinucleótidos con bases clásicas como la adenina, la guanina, el uracilo o la citidina, no son impedimento para que existan otras bases denominadas raras, tales como la 5-metilcitosina, 6-metiladenina, 2metilguanina, 5-hidroximetiluracilo o el 2-tiouracilo que puedan dar lugar de manera natural o a través de procesos de síntesis a nuevos compuestos dinucleotídicos farmacológicamente activos (Nahum et al., 2006; Yerxa et al., 2002). Dadas las propiedades que presentan los dinucleótidos estas moléculas han sido estudiadas con fines terapéuticos de manera que en la actualidad existen también patentes que describen el empleo de dinucleótidos para el tratamiento de diversas patologías. Así por ejemplo las patentes US 2003207825 y CN 1575181 tratan del empleo de los dinucleósidos polifosfatos para el tratamiento de procesos edematosos oculares especialmente enfocados a la retina. Por otro lado la patente US 2003207825 describe el uso de estos mismos compuestos para el tratamiento de afecciones relacionadas con las secreciones mucosas, de fluidos en general así como para procesos de agregación plaquetaria. En este mismo orden de cosas la patente US 2003036527 describe el empleo de dinucleósidos polifosfatos para la limpieza de mucosidades en el ojo, pulmones, oídos etc. Por último, la patente WO0112644 describe el empleo de dinucleósidos polifosfatos como agentes terapéuticos para el tratamiento de las infecciones con el virus VIH. En estos ejemplos aunque se emplean dinucleósidos polifosfatos como los que se describen en esta patente, en ningún caso creemos que las aplicaciones tengan algo que ver con lo descrito en la presente memoria.

Referencias Anon. Human achondroplasia. A multidisciplinary approach. Proceeding of the first international symposium. November 19-21, Rome, Italy. Basic Life Sci. 1988; 48: 1-419. Baxi, M.D. and J.K. Vishwanatha, 1995, Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance, Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods 33, 121-128. Caplen NJ, Fleenor J, Fire A, Morgan RA. dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 2000; 252(1-2):95-105. Chen L, Adar R, Yang X, Monson EO, Li C, Hauschka PV, Yayon A, Deng CX. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem. 1996; 271(25):15292-7. Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease. Mol Gen Met. 2003; 80, 121-128. Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C. A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. J Cell Biol. 2003; 161(6):1053-66. 3 null ES 2 278 519 A1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998; 391(6669):806-11. Flores, N.A., B.M. Stavrou and D.J. Sheridan, 1999, The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system, Cardiovascular Research 42, 15-26. Gibson G, Lin DL, Roque M. Apoptosis of

terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp Cell Res.* 1997; 233(2):372-82. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest.* 1999; 104(11):1517-25. Hoyle, C.H., 1990, Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function, *General Pharmacology* 21, 827-831. Iwata T, Chen L, Li C, Ovchinnikov DA, Behringer RR, Francomano CA, Deng CX. A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(11):1603-13. Kim VN. RNA interference in functional genomics and medicine. *J Korean Med Sci.* 2003 Jun; 18(3):309-18. Review. Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA, Herweijer H. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 2002; 32(1):107-8. McLennan, A.G., Dinucleoside polyphosphates-friend or foe?, *Pharmacology & Therapeutics* 87, 73-89. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 2002 Oct; 3(10):737-47. Review. Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. RNA interference in biology and medicine. *Pharmacol Rev* 2003; 55(4):629- 48. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell.* 2002; 3(3):439-49. Miras-Portugal, M.T., J. Gualix and J. **Pintor**, 1998, The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates, *FEBS Letters* 430, 78-82. Monsonego-Ornan E, Adar R, Feferman T, Segev O, Yayon A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(2):516-22. Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, de Crombrughe B. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 2004; 18(3):290-305. Nahum, V., M. Tulapurkar, S.A. Levesque, J. Sevigny, G. Reiser and B. Fischer, 2006, Diadenosine and diuridine poly(borano)phosphate analogues: synthesis, chemical and enzymatic stability, and activity at P2Y1 and P2Y2 receptors, *Journal Of Medicinal Chemistry* 49, 1980-1990. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2(4):279-289. Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet.* 1996; 13(2):233-7. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb. **Pintor**, J. and M.T. Miras-Portugal, 1995, P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system, *General Pharmacology* 26, 229-235. Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick MW, Tsipouras P. A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum Mol Genet.* 1995; 4(11):2097-101. Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol.* 1995; 131(2):483-94. 4 null ES 2 278 519 A1 Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, Le Merrer M, Munnich A. Mutations in the gene encoding fibroblast growth

factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 1994; 371(6494):252-4. Rozenblatt-Rosen O, Mosonigo-Ornan E, Sadot E, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Ginsberg D, Yayon A. Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J Cell Sci*. 2002; 115(Pt 3):553-62. Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev*. 1999; 13(11):1361-6. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*. 2000; 6(3):743-50. Segev O, Chumakov I, Nevo Z, Givol D, Madar-Shapiro L, Sheinin Y, Weinreb M, Yayon A. Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(2):249-58. Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*. 1994; 78(2):335-42. Superti-Furga A, Eich G, Bucher HU, Wissler J, Giedion A, Gitzelmann R, Steinmann B. A glycine 375to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur J Pediatr*. 1995; 154(3):215-9. Szalata, M., 2001, Dinucleoside polyphosphates: occurrence, metabolism and function, *Postepy Biochemii* 47, 105-113. Szweykowska-Kulińska Z, Jarmolowski A, Figlerowicz M. RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression *Acta Biochem Pol* 2003; 50(1):217-229. van der Giet, M., S. Schmidt, M. Tolle, J. Jankowski, H. Schluter, W. Zidek and M. Tepel, 2002, Effects of dinucleoside polyphosphates on regulation of coronary vascular tone, *European Journal Of Pharmacology* 448, 207- 213. Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, Pines M, Yayon A, Lonai P, Givol D. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(8):4455-60. Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J*. 1996; 15(3):520-7. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPKdependent pathway. *Nat Med*. 2004; 10(1):80-6. Yerxa, B.R., J.R. Sabater, C.W. Davis, M.J. Stutts, M. Lang-Furr, M. Picher, A.C. Jones, M. Cowlen, R. Dougherty and a. Boyer et, 2002, Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5<sub>γ</sub>)-P(4)-(2<sub>γ</sub>-deoxycytidine 5<sub>γ</sub>)tetrphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 302, 871-880. Descripción detallada de la invención La presente invención se basa en el comportamiento de que los dinucleótidos son capaces de disminuir la presencia de los receptores FGFR3 acondroplásicos de las membranas plasmáticas de las células que los poseen (principalmente condrocitos). El aspecto más sobresaliente de esta invención tiene que ver con el

crecimiento de los huesos como consecuencia de la disminución de los receptores de FGFR3 acondroplásicos. La invención provee nuevas composiciones de ciertos dinucleósidos polifosfatos y sus análogos los cuales podrían ser usados terapéuticamente como agonistas de los receptores purinérgicos. La invención también aporta los métodos para emplear dichas composiciones para tratar y prevenir aquellas patologías relacionadas con la falta de estatura como consecuencia de la mutación en el receptor para el FGF denominado FGFR3. El método comprende la administración a un mamífero de una composición farmacéutica terapéuticamente efectiva de un ligando del tipo P2 (P2X y P2Y). Por cantidad terapéuticamente efectiva se entiende una cantidad efectiva para null ES 2 278 519 A1 tratar o prevenir la patología, condición o desorden, la cual es a su vez una cantidad efectiva para inhibir, prevenir, parar o retrasar la progresión del estado patológico y por ende de sus posibles consecuencias. La presente invención demuestra que la existencia de receptores del tipo P2, presentes en muchas células se encuentran también en los condrocitos, células del cartílago responsables de la patología acondroplasia. Los solicitantes consideran que la activación de receptores P2 con los nuevos compuestos de la presente invención activarán efectos celulares específicos los cuales resulten en efectos terapéuticos mediados por los receptores P2. Los agonistas P2 incluyen dinucleósidos polifosfatos como se muestra en la fórmula I. Uno de los aspectos más destacado es la presencia de residuos azucarados de cualquiera de los siguientes tipos: 3 $\zeta$ -desoxiribofuranosil, 2 $\zeta$ ,3 $\zeta$ didesoxiribofuranosil, arabinofuranosil, 3 $\zeta$ -desoxiarabinofuaranosil, xilofuranosil, 2 $\zeta$ -desoxixilofuranosil y lixofuranosil. En donde: X es oxígeno, metileno, dihalometileno o imino n = 0, 1 ó 2 m = 0, 1 ó 2 n + m = 0, 1, 2, 3 ó 4 Z = OH ó H Z $\zeta$  = OH ó H Y = OH ó H Y $\zeta$  = OH ó H y además B y B $\zeta$  son ambos e independientemente un anillo de purina o un anillo de pirimidina como se definen en las fórmulas II y III, unidas por las posiciones 9- ó 1- respectivamente R4 es oxo, hidroxil, mercapto, tiona, amino, ciano, C7 $\zeta$ 12 arilaloxi, C1 $\zeta$ 6 alquiltio, C1 $\zeta$ 6 alquiloxi, C1 $\zeta$ 6 alquilamino o diC1 $\zeta$ 4 alquilamino, donde los grupos alquilo están unidos opcionalmente para formar un heterociclo. 6 null ES 2 278 519 A1 R5 es hidrógeno, acetil, benzoil, C1 $\zeta$ 6 alquil, C1 $\zeta$ 8 alquinoil, arolil o puede estar ausente. R6 es hidroxil, oxo, mercapto, tiona, C1 $\zeta$ 4 alcoxi, C7 $\zeta$ 12 arilalcoxi, C1 $\zeta$ 6 alquiltio, S-fenil, ariltio, arilalquiltio, triazolil, amino, C 2 $\zeta$ 6 alquilamino, C 2 $\zeta$ 5 amino disustituido o di C 2 $\zeta$ 4 alquilamino, donde los grupos dialquil pueden ser opcionales ligados para formar un heterociclo o unidos para formar un anillo sustituido como morfolino, pirrolo etc. R5 y R6 conjuntamente pueden formar un anillo imidazol de 5 miembros entre las posiciones 3 y 4 del anillo de pirimidina y formar un derivado 3,N 4 - etenocitosina donde el grupo eteno es sustituido opcionalmente en las posiciones 4 ó 5 donde al menos un hidrógeno de C 1 $\zeta$ 4 alquil, fenil, feniloxi es sustituido opcionalmente por un grupo de entre halógenos, hidroxil, C1 $\zeta$ 4 alcoxi, C1 $\zeta$ 4 alquil, C6 $\zeta$ 10 aril, C7 $\zeta$ 12 arilalquil, carboxi, ciano, nitro, sulfonamido, sulfonato, fosfato, ácido sulfónico, amino, C1 $\zeta$ 4 alquilamino y di C3 $\zeta$ 4 alquilamino, donde los grupos dialquil pueden estar opcionalmente unidos para formar un heterociclo. R 7 puede estar formado por hidrógeno, hidroxilo, ciano, nitro, C

2;8 alquiniil, halógeno, C 1;6 alquil, CF 3, C 2;3 alqueniil, C2;3 alquiniil, alilamino, bromovinil, etil propenoato, ácido propenoico y C2;8 alqueniil. R 6 y R 7 conjuntamente pueden formar un anillo saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros unidos por medio de N, O u S a R 6, ese anillo podría contener sustituyentes. R8 puede ser hidrógeno, amino, C1;4 alquilamino, C1;4 alcoxi, C7;12 arilalcoxi, C1;6 alquiltio, C7;12 arilalquiltio, carboxamidometil, carboximetil, metoxi, metiltio, fenoxi y feniltio de modo que cuando R8 es amino o amino sustituido, R 7 es hidrógeno. Los diferentes agentes serán administrados en cantidades farmacológicamente suficientes para lograr concentraciones en el cartílago que varíen entre 10 ;7 a 100 g/litro. Su administración se podrá realizar de maneras diversas, por medio de vehículos portadores como gotas de líquido, lavados de líquido, geles ungüentos sprays o liposomas. La administración de estas sustancias se realizará empleando dispositivos catéter-bomba, de liberación En donde R 1 es cloro, amino, hidrógeno, ceto, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones. R2, es alqueniil, hidroxi, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilamino. Rx, es H, O ó está ausente. R 2 y R x son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N 6 -eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aralquil. R 3 es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio como se define más adelante. J es nitrógeno o carbono en previsión de que cuando J es nitrógeno, R3 está ausente. Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser tanto lineales como ramificados. Los grupos arilo pueden ser opcionalmente mono, di o trisustituidos con alquil, aril amino, mono o dialquilamino, NO2, N3, ciano, carboxil, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato o halógeno. 7 null ES 2 278 519 A1 continua o selectiva, o sistemas sencillos como gotas nasales, sprays nasales o nebulizados a las vías orales o nasofaríngeas, de forma oral, de forma inyectable o por medio de supositorios de manera que el principio activo contacte con los tejidos afectados en una cantidad terapéuticamente efectiva tras su absorción sistémica y circulación hasta dichas zonas. Breve descripción de las figuras Para facilitar la comprensión de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva se acompañan una serie de figuras: Figura 1.- Marcaje del receptor FGFR3 acondroplásico en condrocitos. En los 2 paneles superiores, a la izquierda se ve el marcaje de color verde que corresponde a los receptores FGFR3 acondroplásicos. A su derecha las células vistas por microscopia de Nomarski. En los paneles inferiores se aprecia cómo la cantidad de receptor disminuye (menos verde) tras el tratamiento con el Ap4A. Figura 2.- Análisis de inmunotransferencia en el que en el recuadro superior se puede observar el efecto del Ap4A (bandas de la derecha) en comparación con el control (bandas de la izquierda), donde se aprecia que las bandas de la derecha son menos intensas que las del control. Dichas bandas,

tanto en el control como en el tratado representan el receptor de FGFR3. Debajo se representa en forma de diagrama de barras la cuantificación de dichas bandas, donde se evalúa que hay menos receptor FGFR3 en las células tratadas con Ap4A que en las control. Figura 3.- Análisis de inmunotransferencia en el que en el recuadro superior se puede observar el efecto del Up 4U (bandas de la derecha) en comparación con el control (bandas de la izquierda), donde se aprecia que las bandas de la derecha son menos intensas que las del control. Dichas bandas, tanto en el control como en el tratado representan el receptor de FGFR3. Debajo se representa en forma de diagrama de barras la cuantificación de dichas bandas, donde se evalúa que hay menos receptor FGFR3 en las células tratadas con Up 4U que en las control. Figura 4.- Análisis de inmunotransferencia en el que en el recuadro superior se puede observar el efecto del Ap3A (bandas de la derecha) en comparación con el control (bandas de la izquierda), donde se aprecia que las bandas de la derecha son menos intensas que las del control. Dichas bandas, tanto en el control como en el tratado representan el receptor de FGFR3. Debajo se representa en forma de diagrama de barras la cuantificación de dichas bandas, donde se evalúa que hay menos receptor FGFR3 en las células tratadas con Ap3A que en las control. Figura 5.- Análisis de inmunotransferencia en el que en el recuadro superior se puede observar el efecto del Ap5A (bandas de la derecha) en comparación con el control (bandas de la izquierda), donde se aprecia que las bandas de la derecha son menos intensas que las del control. Dichas bandas, tanto en el control como en el tratado representan el receptor de FGFR3. Debajo se representa en forma de diagrama de barras la cuantificación de dichas bandas, donde se evalúa que hay menos receptor FGFR3 en las células tratadas con Ap5A que en las control.

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1 Una muestra conteniendo a la adenosina 5' tetrafosfo 5' adenosina (Ap 4A, véase fórmula IV), un dinucleótido con la estructura general descrita en la fórmula I y con una base nitrogenada como la descrita en la fórmula II, fue incubado con condrocitos acondroplásicos (que presentan el receptor FGFR3 humano mutado).

8 null ES 2 278 519 A1 Una concentración de 100 µM del dinucleótido Ap4A fue incubada con las células durante 10 minutos. Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió el dinucleótido y ambos se compararon. Para medir y constatar las posibles modificaciones en la presencia del receptor FGFR3 (acondroplásico) se emplearon anticuerpos comerciales frente al mencionado receptor, y se verificaron las posibles modificaciones por técnicas inmunocitoquímicas y de inmunotransferencia (western-blot). La presencia del dinucleótido Ap4A, cuando es comparado con el experimento control demuestra que los niveles del receptor FGFR3 disminuyen significativamente de la membrana de las células, tal y como se ve en la figura 1. Los estudios realizados con la técnica de inmunotransferencia (western-blot) corroboran los resultados anteriores. Las células tratadas con Ap4A presentan menos receptores FGFR3 mutados que las no tratadas, tal y como se aprecia en la figura 2.

Ejemplo 2 Una muestra conteniendo a la uridina 5' tetrafosfo 5' uridina (Up4U, véase formula V), un dinucleótido con la estructura general descrita en la fórmula I y con una base nitrogenada como la descrita en la fórmula III, fue incubado con los condrocitos

(que presentan el receptor FGFR3 mutado). Una concentración de 100  $\mu$ M del dinucleótido Up4U fue incubada con las células durante 10 minutos. Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió el dinucleótido y ambos se compararon. Para medir y constatar las posibles modificaciones en la presencia del receptor FGFR3 (acondroplásico) se emplearon anticuerpos comerciales frente al mencionado receptor, y se verificaron las posibles modificaciones por técnicas de inmunotransferencia (western-blot). Como se observa en la figura 3, el dinucleótido Up4U hizo desaparecer al receptor FGFR3 acondroplásico de las células. Ejemplo 3 Una muestra conteniendo a la adenosina 5 $\zeta$  trifosfo 5 $\zeta$  adenosina (Ap3A, véase fórmula VI), un dinucleótido con la estructura general descrita en la fórmula I y con una base nitrogenada como la descrita en la fórmula II, fue incubado con condrocitos acondroplásicos (que presentan el receptor FGFR3 humano mutado). 9 null ES 2 278 519 A1 Una concentración de 100  $\mu$ M del dinucleótido Ap3A fue incubada con las células durante 10 minutos. Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió el dinucleótido y ambos se compararon. Para medir y constatar las posibles modificaciones en la presencia del receptor FGFR3 (acondroplásico) se emplearon anticuerpos comerciales frente al mencionado receptor, y se verificaron las posibles modificaciones por técnicas de inmunotransferencia (western-blot). Los estudios realizados con la técnica de inmunotransferencia (western-blot) demuestran que las células tratadas con Ap 3A presentan menos receptores FGFR3 mutados que las no tratadas, tal y como se aprecia en la figura 4. Ejemplo 4 Una muestra conteniendo a la adenosina 5 $\zeta$  pentafofo 5 $\zeta$  adenosina (Ap5A, véase fórmula VII), un dinucleótido con la estructura general descrita en la fórmula I y con una base nitrogenada como la descrita en la fórmula II, fue incubado con condrocitos acondroplásicos (que presentan el receptor FGFR3 humano mutado). Una concentración de 100  $\mu$ M del dinucleótido Ap5A fue incubada con las células durante 10 minutos. Este experimento se realizó en paralelo con otro idéntico en el que no se añadió el dinucleótido y ambos se compararon. Para medir y constatar las posibles modificaciones en la presencia del receptor FGFR3 (acondroplásico) se emplearon anticuerpos comerciales frente al mencionado receptor, y se verificaron las posibles modificaciones por técnicas de inmunotransferencia (western-blot). Los estudios realizados con la técnica de inmunotransferencia (western-blot) demuestran que las células tratadas con Ap 5A presentan menos receptores FGFR3 mutados que las no tratadas, tal y como se aprecia en la figura 5. null ES 2 278 519 A1

[ A1 - REIV ] **REIVINDICACIONES** 1. El uso de un compuesto con la estructura definida en la fórmula I, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la acondroplasia en donde: los azúcares que forman la estructura sean del tipo 3 $\zeta$ -desoxiribofuranosil, 2 $\zeta$ ,3 $\zeta$ -didesoxiribofuranosil, arabinofuranosil, 3 $\zeta$ -desoxiarabinofuaranosil, xilofuranosil, 2 $\zeta$ -desoxixilofuranosil y lixofuranosil. Donde además: X es oxígeno, metileno, dihalometileno o imino n = 0, 1 ó 2 m = 0, 1 ó 2 n + m = 0, 1, 2, 3 ó 4 Z = OH ó H Z $\zeta$  = OH ó H Y = OH ó H Y $\zeta$  = OH ó H y además B y B $\zeta$  son ambos e independientemente una purina o una pirimidina como se definen en las fórmulas

II y III, unidas por las posiciones 9- ó 1- respectivamente En donde R 1 es cloro, amino, hidrógeno, amino monosustituido, amino disustituido, alquiltio, ariltio, aralquiltio, y donde en la sustitución del sulfuro contenga hasta un máximo de 20 átomos de carbono, con o sin insaturaciones. R2, es alquenil, hidroxil, oxo, amino, mercapto, tiona, alquiltio, ariltio, aralquiltio, aciltio, alquiloxi, ariloxi, aralquiloxi, alquilaminos monosustituidos, cicloalquilamino monosustituidos heterociclicos, arilamino monosustituidos, diaralquilamino, diarilamino, dialquilamino, acilamino o diacilamino. 11 null Rx, es H, O ó está ausente. ES 2 278 519 A1 R2 y Rx son tomados adicionalmente de modo conjunto para formar anillos de cinco miembros fusionándose el anillo imidazol de 1, N 6 -eteno adenina derivados, opcionalmente sustituidos en las posiciones 4- o 5- del anillo eteno con alquil, aralquil. R3 es hidrógeno, azido, alcoxi, ariloxi, aralquiloxi, alquiltio, ariltio o aralquiltio como se define más adelante. J es nitrógeno o carbono en previsión de que cuando J es nitrógeno, R 3 está ausente. Para todos los alquilos anteriormente definidos, estos pueden ser tanto lineales como ramificados. Los grupos arilo pueden ser opcionalmente mono, di o trisustituidos con menor alquil, aril amino, mono o dialquilamino, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, ciano, carboxilo, amido, sulfonamido, ácido sulfónico, fosfato o halógeno. R4 es oxo, hidroxil, mercapto, tiona, amino, ciano, C<sub>7</sub>12 arilaloxi, C<sub>1</sub>6 alquiltio, C<sub>1</sub>6 alquiloxi, C<sub>1</sub>6 alquilamino o diC<sub>1</sub>4 alquilamino, donde los grupos alquilo están unidos opcionalmente para formar un heterociclo. R5 es hidrógeno, acetil, benzoil, C<sub>1</sub>6 alquil, C<sub>1</sub>8 alquinoil, arolil o puede estar ausente. R6 es hidroxil, oxo, mercapto, tiona, C<sub>1</sub>4 alcoxi, C<sub>7</sub>12 arilalcoxi, C<sub>1</sub>6 alquiltio, S-fenil, ariltio, arilalquiltio, triazolil, amino, C<sub>2</sub>6 alquilamino, C<sub>2</sub>5 amino disustituido o di C<sub>2</sub>4 alquilamino, donde los grupos dialquil pueden ser opcionales ligados para formar un heterociclo o unidos para formar un anillo sustituido como morfolino, pirrolo etc. R5 y R6 conjuntamente pueden formar un anillo imidazol de 5 miembros entre las posiciones 3 y 4 del anillo de pirimidina y formar un derivado 3,N 4 - etenocitosina donde el grupo eteno es sustituido opcionalmente en las posiciones 4 ó 5 donde al menos un hidrógeno de C<sub>1</sub>4 alquil, fenil, feniloxi es sustituido opcionalmente por un grupo de entre halógenos, hidroxil, C<sub>1</sub>4 alcoxi, C<sub>1</sub>4 alquil, C<sub>6</sub>10 aril, C<sub>7</sub>12 arilalquil, carboxi, ciano, nitro, sulfonamido, sulfonato, fosfato, ácido sulfónico, amino, C<sub>1</sub>4 alquilamino y di C<sub>3</sub>4 alquilamino, donde los grupos dialquil pueden estar opcionalmente unidos para formar un heterociclo. R 7 puede estar formado por hidrógeno, hidroxilo, ciano, nitro, C<sub>2</sub>8 alquinil, halógeno, C<sub>1</sub>6 alquil, CF 3, C<sub>2</sub>3 alquenil, C<sub>2</sub>3 alquinil, alilamino, bromovinil, etil propenoato, ácido propenoico y C<sub>2</sub>8 alquenil. R 6 y R 7 conjuntamente pueden formar un anillo saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros unidos por medio de N, O u S a R 6, ese anillo podría contener sustituyentes. R8 puede ser hidrógeno, amino, C<sub>1</sub>4 alquilamino, C<sub>1</sub>4 alcoxi, C<sub>7</sub>12 arilalcoxi, C<sub>1</sub>6 alquiltio, C<sub>7</sub>12 arilalquiltio, carboxamidometil, carboximetil, metoxi, metiltio, fenoxi y feniltio de modo que cuando R8 es amino o amino sustituido, R 7 es hidrógeno. 2. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto pueda ser la adenosina 5' tetrafosfo 5' adenosina, Ap4A, como el descrito en la formula IV, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la acondroplasia. 3.

El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto pueda ser la uridina 5 $\zeta$  tetrafosfo 5 $\zeta$  uridina, Up4U, como el descrito en la fórmula V, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la acondroplasia. 12 null ES 2 278 519 A1 4. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto pueda ser la adenosina 5 $\zeta$  trifosfo 5 $\zeta$  adenosina, Ap3A, como el descrito en la formula VI, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la acondroplasia. 5. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto pueda ser la adenosina 5 $\zeta$  pentafosfo 5 $\zeta$  adenosina, Ap5A, como el descrito en la fórmula VII, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la acondroplasia. 6. El uso, de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5 donde dichos compuestos sean administrados en una cantidad suficiente para lograr concentraciones en el cartílago que varíen entre 10  $\zeta$  7 a 100 g/litro. 7. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, donde dicha administración implique la aplicación del compuesto descrito a través de un vehículo portador seleccionado de un grupo consistente en gotas de líquido, lavados con líquido, geles, ungüentos, sprays y liposomas. 8. El uso, de acuerdo con la reivindicación 7 donde dicha aplicación implique infusiones de este compuesto a dicho cartílago a través de un dispositivo seleccionado de un grupo consistente en sistemas de catéter-bomba, un dispositivo de liberación continua o selectiva. 9. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, donde dicha administración implique la administración sistémica de este compuesto, aplicando una suspensión líquido/líquido a través de gotas nasales o spray nasal o líquido nebulizado a las vías orales o nasofaríngeas de dicho sujeto, tal que una cantidad terapéuticamente efectiva del mencionado compuesto contacte con los tejidos afectados de dicho sujeto (cartílago) a través de la absorción sistémica y circulación. 10. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, donde dicha administración sistémica de dicho compuesto sea llevada a cabo administrando una forma oral de dicho compuesto, tal que una cantidad terapéuticamente activa de él contacte con el cartílago a través de la absorción sistémica y circulación. 11. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, donde dicha administración sistémica del mencionado compuesto sea llevada a cabo, administrando una forma inyectable del mismo tal que una cantidad terapéuticamente activa de él contacte con el cartílago a través de la absorción sistémica y circulación. 12. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, donde dicha administración sistémica del mencionado compuesto sea llevada a cabo aplicando un supositorio del mencionado compuesto tal que una cantidad terapéuticamente activa de él contacte con el cartílago a través de la absorción sistémica y circulación. 13 null ES 2 278 519 A1 14 null ES 2 278 519 A1 null OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS ESPAÑA INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA 51 $\zeta$  Int. Cl.: A61K 31/7084 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01) 11 $\zeta$  ES 2 278 519 21 $\zeta$  Nº de solicitud: 200502229 22 $\zeta$  Fecha de presentación de la solicitud: 02.09.2005 32 $\zeta$  Fecha de prioridad: DOCUMENTOS RELEVANTES Categoría Documentos citados Reivindicaciones Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la

misma categoría A: refleja el estado de la técnica El presente informe ha sido realizado O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud ¿¿ para todas las reivindicaciones ¿ para las reivindicaciones nº: afectadas A US 2003207825 A1 (RUDEOUT, J. y col.) 06.11.2003, 1-12 todo el documento. A US 2003036527 A (JACOBUS, D. y col.) 20.02.2003, 1-12 todo el documento. A WO 0112644 A1 (ADANI, A. y col.) 22.02.2001, todo el documento. 1-12 A EP 1512401 A1 (YUNG SHIN PHARMACEUTICAL IND. CO. LTD.) 1-12 02.09.2004, todo el documento. A US 2003068313 A (NAKAO KZUWA) 10.04.2003, todo el documento. 1-12 Fecha de realización del informe Examinador Página 11.05.2007 E. Albarrán Gómez 1/1 null