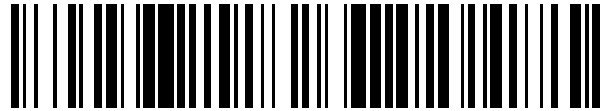


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 765**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11805174 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2611457**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de la Ataxia de Friedreich con interferón gamma**

30 Prioridad:

30.08.2010 US 378284 P

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

11.06.2014

73 Titular/es:

TESTI, ROBERTO (50.0%)

Via Cadlolo 82

00136 Roma, IT y

TOMASSINI, BARBARA (50.0%)

72 Inventor/es:

TESTI, ROBERTO y

TOMASSINI, BARBARA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 466 765 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).

Composiciones y métodos para el tratamiento de la Ataxia de Friedreich con interferón gamma**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere, generalmente, al interferón gamma para su uso en el tratamiento de la Ataxia de Friedreich.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La enfermedad. La AFRD es una enfermedad rara que afecta, aproximadamente, a 3 : 100.000 individuos en la población caucásica. Generalmente, tras 10 o 15 años desde el inicio de la enfermedad, lleva a la pérdida de la deambulación y a una discapacidad completa, con muerte prematura, causada a menudo por insuficiencia cardíaca. Los síntomas suelen aparecer al final de la primera década o al principio de la segunda década de vida, e incluyen inestabilidad para caminar y falta de coordinación. La ataxia del caminar tiene características cerebrales y sensoriales, afecta al tronco y a las extremidades, y es progresiva y, generalmente, incoercible. El caminar de manera atáxica es común y, dado que cada vez se vuelve más severa, puede requerir ayuda constante y el uso de una silla de ruedas. La disartria tiene lugar al comienzo de la enfermedad y, al final, supone problemas en el habla. Además, la disfagia es una característica tardía y puede requerir alimentación artificial. La pérdida de neuronas periféricas de los ganglios espinales es el descubrimiento patológico más notable. La hipertrofia ventricular caracteriza el cuadro cardíaco, y puede conducir progresivamente a un fallo cardíaco congestivo y a arritmias fatales. Una minoría significativa de pacientes también desarrolla diabetes mellitus a través de mecanismos que aún no se han definido claramente.

[0003] La AFRD está causada por la hiperexpansion homocigótica de los tripletes GAA en el primer intrón de FXN, un gen de cinco exones altamente conservado localizado en el extremo largo del cromosoma 9 humano, que codifica la proteína frataxina. Las expansiones patológicas de GAA (de ~ 70 a > 1000 tripletes) dan como resultado estructuras de ADN "pegajoso" y cambios epigenéticos que reducen severamente la transcripción del gen FXN. Los pacientes con AFRD viven con un 10 – 30 % de frataxina residual, y la severidad de la enfermedad es, normalmente, proporcional al número de tripletes de GAA y al consecuente grado de reducción de frataxina. Una minoría de pacientes de AFRD, llamados compuestos heterocigóticos, tiene expansiones patológicas de GAA en uno de los alelos FXN y mutaciones de pérdida de funciones en el otro.

[0004] Enfoques terapéuticos actuales. Actualmente no hay ninguna terapia específica para prevenir la progresión de la enfermedad. La mayoría de los enfoques terapéuticos se centran en reducir la disfunción mitocondrial y la sobrecarga de hierro, y se basan, además, en el uso de antioxidantes o agentes quelantes de hierro. Aunque se han estudiado numerosos enfoques para tratar la AFRD, cada uno de estos enfoques tiene limitaciones significativas. Por tanto, existe una necesidad en la disciplina de nuevos métodos para tratar más eficazmente la AFRD.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0005] La presente invención presenta interferón gamma para su uso en métodos para incrementar la expresión de frataxina en las células y para el tratamiento de la Ataxia de Friedreich.

[0006] La divulgación presenta un método para incrementar la expresión de frataxina en una célula identificada con una cantidad deficiente de frataxina o con Ataxia de Friedreich, incluyendo la administración de una cantidad efectiva de interferón gamma a la célula. La divulgación presenta un método de incrementar la actividad de la aconitasa en una célula identificada con una cantidad deficiente de actividad aconitasa o con Ataxia de Friedreich, incluyendo la administración de una cantidad efectiva de interferón gamma a la célula.

[0007] En una realización de la invención, se presenta interferón gamma para su uso en un método para el tratamiento de la Ataxia de Friedreich, incluyendo la administración a un sujeto diagnosticado con Ataxia de Friedreich una cantidad terapéuticamente efectiva de interferón gamma. En otra realización de la invención, el interferón gamma aumenta la frataxina o disminuye la expresión de frataxina en una célula del paciente con Ataxia de Friedreich.

[0008] En una realización, el interferón gamma tiene una secuencia que comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de la tabla 2.

[0009] En otra realización, el interferón gamma es una forma recombinante de interferón gamma. En otra realización, el interferón gamma recombinante es ACTIMUNET™ o IMUKIN™. En otra realización; el interferón gamma recombinante comprende o consiste en la SEC ID N° 2.

65

[0010] Se describe en la presente un interferón gamma para su uso en el tratamiento de la Ataxia de Friedreich.

[0011] En una realización, el interferón gamma es recombinante.

5 [0012] En una realización, el interferón gamma consiste o comprende cualquiera de la secuencias de la Tabla 2.

[0013] En una realización, el interferón gamma consiste o comprende la SEC ID N° 2.

10 [0014] En una realización, el interferón gamma es ACTIMUNE™ o IMUKIN™.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0015]

En la Fig. 1 el interferón gamma induce la acumulación de frataxina en múltiples tipos celulares.

15 En la Fig. 2 el interferón gamma induce la acumulación de frataxina en células con AFRD.

En la Fig. 3 el interferón gamma induce la acumulación de frataxina del ARNm en células con AFRD.

En la Fig. 4 el interferón gamma restaura la actividad de la aconitasa en células con AFRD.

20 En la Fig. 5A – 5B el interferón gamma incrementa los niveles de frataxina *in vivo* y mejora la coordinación locomotora y motora en ratones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la disciplina en la práctica de la presente realización. El término "comprende" utilizado en la presente significa "incluye" y las formas singulares "un", "una", "el" o "la" incluyen las referencias plurales a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "comprende una célula" incluye una o más de dichas células, etc. El término "o" se refiere a un elemento simple o de unos elementos alternativos establecidos o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30 [0017] A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el comprendido normalmente por los expertos en la disciplina a la que pertenece la divulgación. Aunque pueden emplearse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente para la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación métodos y materiales apropiados. Los materiales, métodos y ejemplos tienen un objetivo meramente ilustrativo y no pretenden ser limitantes. A partir de la descripción siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones, otras características de la divulgación resultaran evidentes.

40 [0018] Se presentan ciertos términos en la presente para proporcionar una guía adicional para el profesional médico describiendo los componentes, dispositivos, métodos y similares de los aspectos de la invención, y como prepararlos o utilizarlos. Resultará evidente que el mismo término puede decirse de diferentes maneras. En consecuencia, pueden utilizarse sinónimos y un lenguaje alternativo para cualquiera de los términos descritos en la presente. Carece de importancia si un término se elabora o discute o no en la presente. Se presentan algunos sinónimos o métodos sustituibles, materiales y similares. El uso de uno o unos sinónimos o equivalentes no excluye el uso de otros sinónimos o equivalente, a no ser que se indique claramente lo contrario. El uso de ejemplos, incluyendo los ejemplos de los términos, tiene objetivos meramente ilustrativos.

50 [0019] El término "péptido" utilizado en la presente se refiere a un polipéptido corto, por ejemplo, uno que tiene, normalmente, menos de 50 aminoácidos y, normalmente, más de 30 aminoácidos. El término tal y como se utiliza en la presente abarca los análogos y miméticos que imitan la estructura y, por tanto, la función biológica.

55 [0020] El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no se asocia con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo, (2) existe en una pureza no encontrada en la naturaleza, donde pureza puede decretarse respecto a la presencia de otro material celular (por ejemplo, esta libre de otras proteínas de la misma especie) (3) es expresado por una célula de diferentes especies, o (4) no tiene lugar en la naturaleza o los enlaces son diferentes a los enlaces péptidos comunes). Por tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular distinto de la célula que se origina naturalmente se "aislará" a partir de sus componentes naturalmente asociados. Un polipéptido o proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento, utilizando técnicas de purificación de proteínas ya conocidas en la disciplina. De este modo, "aislado" no requiere necesariamente que la proteína, polipéptido, péptido u oligopéptido así descritos hayan sido físicamente eliminados de su medio nativo.

65 [0021] Una proteína tiene "homología" o es "homóloga" a una segunda proteína si la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína tiene una secuencia similar a la secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda

5 proteína. De manera alternativa, una proteína tiene homología con una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias aminoácidas “similares”. (Por tanto, el término “proteínas homólogas”) se defina como que las dos proteínas tienen secuencias aminoácidas similares). Tal y como se utiliza en la presente, la homología entre dos regiones de una secuencia aminoácida (especialmente con respecto a las similitudes estructurales pronosticadas) se interpreta como que implican similitud en la función.

10 [0022] Cuando se utiliza “homólogo” en referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones residuales que no son idénticas a menudo difieren en las sustituciones aminoácidas conservativas. Una “sustitución aminoácida conservativa” es una en la que un residuo aminoácido se sustituye por otro residuo aminoácido con una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución aminoácida conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos en los que difieren dos o más secuencias aminoácidas entre ellas por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de homología puede ajustarse a la alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la disciplina. Véanse Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24: 307 - 31 y 25: 365 – 89.

20 [0023] Los siguientes seis grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas para otro: 1) Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Alanina (A), Valina (V) y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). La Tabla 1 es una matriz de sustitución aminoácida general BLOSUM62.

Tabla 1

Matriz de sustitución aminoácida general BLOSUM62.

Referencia: Henikoff, S. y Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Usa 89: 10915 – 10919.

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | K | L | M | N | P | Q | R | S | T | V | W | X | Y | Z |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 4 | -2 | 0 | -2 | -1 | -2 | 0 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | -1 | -1 | 1 | 0 | 0 | -3 | -1 | -2 | -1 |
| B | -2 | 6 | -3 | 6 | 2 | -3 | -1 | -1 | -3 | -1 | -4 | -3 | 1 | -1 | 0 | -2 | 0 | -1 | -3 | -4 | -1 | -3 | 2 |
| C | 0 | -3 | 9 | -3 | -4 | -2 | -3 | -3 | -1 | -3 | -1 | -1 | -3 | -3 | -3 | -3 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | -2 | -4 |
| D | -2 | 6 | -3 | 6 | 2 | -3 | -1 | -1 | -3 | -1 | -4 | -3 | 1 | -1 | 0 | -2 | 0 | -1 | -3 | -4 | -1 | -3 | 2 |
| E | -1 | 2 | -4 | 2 | 5 | -3 | -2 | 0 | -3 | 1 | -3 | -2 | 0 | -1 | 2 | 0 | 0 | -1 | -2 | -3 | -1 | -2 | 5 |
| F | -2 | -3 | -2 | -3 | -3 | 6 | -3 | -1 | 0 | -3 | 0 | 0 | -3 | -4 | -3 | -3 | -2 | -2 | -1 | 1 | -1 | 3 | -3 |
| G | 0 | -1 | -3 | -1 | -2 | -3 | 6 | -2 | -4 | -2 | -4 | -3 | 0 | -2 | -2 | -2 | 0 | -2 | -3 | -2 | -1 | -3 | -2 |
| H | -2 | -1 | -3 | -1 | 0 | -1 | -2 | 8 | -3 | -1 | -3 | -2 | 1 | -2 | 0 | 0 | -1 | -2 | -3 | -2 | -1 | 2 | 0 |
| I | -1 | -3 | -1 | -3 | -3 | 0 | -4 | -3 | 4 | -3 | 2 | 1 | -3 | -3 | -3 | -3 | -2 | -1 | 3 | -3 | -1 | -1 | -3 |
| K | -1 | -1 | -3 | -1 | 1 | -3 | -2 | -1 | -3 | 5 | -2 | -1 | 0 | -1 | 1 | 2 | 0 | -1 | -2 | -3 | -1 | -2 | 1 |
| L | -1 | -4 | -1 | -4 | -3 | 0 | -4 | -3 | 2 | -2 | 4 | 2 | -3 | -3 | -2 | -2 | -2 | -1 | 1 | -2 | -1 | -1 | -3 |
| M | -1 | -3 | -1 | -3 | -2 | 0 | -3 | -2 | 1 | -1 | 2 | 5 | -2 | -2 | 0 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | -2 |
| N | -2 | 1 | -3 | 1 | 0 | -3 | 0 | 1 | -3 | 0 | -3 | -2 | 6 | -2 | 0 | 0 | 1 | 0 | -3 | -4 | -1 | -2 | 0 |
| P | -1 | -1 | -3 | -1 | -1 | -4 | -2 | -2 | -3 | -1 | -3 | -2 | -2 | 7 | -1 | -2 | -1 | -1 | -2 | -4 | -1 | -3 | -1 |
| Q | -1 | 0 | -3 | 0 | 2 | -3 | -2 | 0 | -3 | 1 | -2 | 0 | 0 | -1 | 5 | 1 | 0 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | 2 |
| R | -1 | -2 | -3 | -2 | 0 | -3 | -2 | 0 | -3 | 2 | -2 | -1 | 0 | -2 | 1 | 5 | -1 | -1 | -3 | -3 | -1 | -2 | 0 |
| S | 1 | 0 | -1 | 0 | 0 | -2 | 0 | -1 | -2 | 0 | -2 | -1 | 1 | -1 | 0 | -1 | 4 | 1 | -2 | -3 | -1 | -2 | 0 |
| T | 0 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0 | -1 | -1 | -1 | 1 | 5 | 0 | -2 | -1 | -2 | -1 |
| V | 0 | -3 | -1 | -3 | -2 | -1 | -3 | -3 | 3 | -2 | 1 | 1 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | 0 | 4 | -3 | -1 | -1 | -2 |
| W | -3 | -4 | -2 | -4 | -3 | 1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -2 | -1 | -4 | -4 | -2 | -3 | -3 | -2 | -3 | 11 | -1 | 2 | -3 |
| X | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| Y | -2 | -3 | -2 | -3 | -2 | 3 | -3 | 2 | -1 | -2 | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | -2 | -2 | -2 | -1 | 2 | -1 | 7 | -2 |
| Z | -1 | 2 | -4 | 2 | 5 | -3 | -2 | 0 | -3 | 1 | -3 | -2 | 0 | -1 | 2 | 0 | 0 | -1 | -2 | -3 | -1 | -2 | 5 |

55 [0024] La homología de secuencia para polipéptidos, también denominada porcentaje de identidad de secuencia, se mide normalmente utilizando software de análisis de secuencia. Véase, por ejemplo, el Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group (GCG), Universidad de Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705. El software de análisis de proteínas compara/empareja secuencias similares utilizando una medida de homología asignada a varias sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el GCG contiene programas como “Gap” y “Bestfit” que pueden emplearse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos cercanos, como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Version 6.1.

- 5 **[0025]** Un algoritmo preferible cuando se compara una secuencia polipeptídica particular con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa de ordenador BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 – 410 (1990); Gish y States, Nature Genet. 3: 266 - 272 (1993); Madden et al., Meth. Enzymol. 266: 131 - 141 (1996); Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997); Zhang y Madden, Genome Res. 7: 649 - 656 (1997)), especialmente blastp o tblastn (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997)).
- 10 **[0026]** Los parámetros preferidos para BLASTp son: Expectation value: 10 (default); Filter: seg (default); Cost to open a gap: 11 (default); Cost to extend a gap: 1 (default); Max. alignments: 100 (default); Word size: 11 (default); No. of descriptions: 100 (default); Penalty Matrix: BLOSUM62.
- 15 **[0027]** Un experto en la disciplina también puede utilizar el programa ALIGN incorporando el algoritmo no lineal de Myers y Miller (Comput. Appl. Biosci. (1988) 4: 11 – 17). Para la comparación de secuencias amino utilizando el programa ALIGN, un experto en la disciplina puede utilizar una tabla de peso residual PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4.
- 20 **[0028]** La longitud de las secuencias polipeptídicas comparadas por su homología serán, generalmente, de al menos 16 aminoácidos residuales, normalmente de al menos 20 residuos y, más normalmente, de al menos 24 residuos, comúnmente de al menos 28 residuos y, preferiblemente, más de 35 residuos. Cuando se busca una base de datos con secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias aminoácidas. La búsqueda en bases de datos utilizando secuencias aminoácidas puede medirse mediante otros algoritmos diferentes de blastp conocidos en la disciplina. Por ejemplo, las secuencias polipeptídicas pueden
- 25 compararse utilizando FASTA, un programa del GCG Version 6.1. FASTA proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre la secuencia buscada y la consultada Pearson, Methods Enzymol. 183: 63 – 98 (1990). Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias aminoácidas puede determinarse utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 2 y la matriz de puntuación PAM250), como se presenta en el GCG Version 6.1.
- 30 **[0029]** Molécula de ácido nucleico: El término “molécula de ácido nucleico” o “polinucleótido” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de, al menos, 10 bases. El término incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico o sintético) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm o ARN sintético), así como análogos de ADN o ARN con análogos nucleótidos no naturales, enlaces internucleósidos no nativos, o ambos. El ácido nucleico puede encontrarse en cualquier conformación topológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser monocatenario,
- 35 bicatenario, tricatenario, cuadruplexado, parcialmente bicatenario, ramificado, en horquilla, circular o con forma de candado. Si es monocatenario, la molécula de ácido nucleico puede ser de hebra sentido o antisentido. “Molécula de ácido nucleico” incluye moléculas de ácido nucleico no naturales.
- 40 **[0030]** Aislado: Un ácido nucleico o polinucleótido “aislado” (por ejemplo, un ARN, ADN o un polímero combinado) es uno que está sustancialmente separado de otros componentes celulares que acompañan naturalmente al polinucleótido nativo en su célula huésped natural, por ejemplo, ribosomas, polimerasas y secuencias genómicas con los que están naturalmente asociados. El término abarca un ácido nucleico o polinucleótido que (1) ha sido eliminado de su medio natural, (2) no está asociado con todo o parte de un polinucleótido en el que el “polinucleótido
- 45 aislado” se encuentra en la naturaleza, (3) está unido operablemente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (4) no se encuentra en la naturaleza. El término “aislado” o “sustancialmente puro” también puede utilizarse en referencia a los aislados de ADN recombinante o clonado, análogos de polinucleótidos químicamente sintetizados o análogos de polinucleótidos que se sintetizan biológicamente mediante sistemas heterólogos. Sin embargo, “aislado” no exige necesariamente que el ácido nucleico o polinucleótido así descrito haya sido eliminado físicamente de su medio natural. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico endógeno en el genoma de un organismo se considera “aislado” en la presente si una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia que no está naturalmente adyacente a esta secuencia de ácido nucleico endógena) se encuentra adyacente a la secuencia de ácido nucleico endógena, de manera que la expresión de esta secuencia de ácido nucleico se altera. Por ejemplo, una secuencia promotora no nativa puede sustituirse (por ejemplo mediante recombinación homóloga) por el promotor nativo de un gen en el genoma de una célula humana, de manera que este gen tiene un patrón de
- 50 expresión modificado. Este gen podría de esta manera “aislarse” ya que se ha separado de, al menos, algunas de las secuencias que lo flanquean naturalmente. Un ácido nucleico también se considera “aislado” si contiene cualquier modificación que no tiene lugar naturalmente en el ácido nucleico correspondiente en un genoma. Por ejemplo, una secuencia codificadora endógena se considera “aislada” si contiene una inserción, delección o punto de mutación introducido artificialmente, por ejemplo, mediante intervención humana. Un “ácido nucleico aislado”
- 55 también incluye un ácido nucleico integrado en el cromosoma de una célula huésped en un sitio heterólogo, así como un constructo de ácido nucleico presente como un episoma. Además, un “ácido nucleico aislado” puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o sustancialmente libre de medios de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas mediante
- 60
- 65

expresión recombinante en una célula huésped así como en moléculas y proteínas de ácido nucleico químicamente sintetizadas.

5 **[0031]** El término “porcentaje de identidad de secuencia” o “idéntico”, en el contexto de las secuencias de ácido nucleico, se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para ver su máxima correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser variar desde los nueve nucleótidos, normalmente al menos 20 nucleótidos, más normalmente al menos 24 nucleótidos, típicamente al menos 28 nucleótidos, más típicamente al menos 32 y preferiblemente al menos 36 o más nucleótidos. Hay numerosos algoritmos diferentes conocidos en la disciplina que pueden emplearse para medir la identidad de secuencia nucleotídica. Por ejemplo, las secuencias polinucleótidas pueden compararse utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas del Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis. FASTA proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre la secuencia buscada y la consultada. Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63 – 98 (1990). Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico puede determinarse utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o utilizando Gap con sus parámetros por defecto como los proporcionados en GCG Version 6.1. De manera alternativa, las secuencias pueden compararse utilizando el programa de ordenador BLAST (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403 – 410 (1990); Gish y States, *Nature Genet.* 3: 266 - 272 (1993); Madden et al., *Meth. Enzymol.* 266: 131 - 141 (1996); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 - 3402 (1997); Zhang y Madden, *Genome Res.* 7: 649 - 656 (1997)), especialmente blastp o tblastn (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389 - 3402 (1997)).

25 **[0032]** Un ejemplo particular pero no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1990) USA 87: 2264 - 68; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90: 5873 – 77) como el utilizado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (*J. Mol. Biol.* (1990) 215: 403 – 10). Las búsquedas de nucleótidos mediante BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Para obtener alineamientos separados para su comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (*Nucleic Acids Research* (1997) 25 (17): 3389 – 3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden emplearse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (véase la página web de BLAST ubicada en el National Center for Biotechnology Information).

35 **[0033]** Purificado: el término purificado no requiere pureza absoluta; más bien pretende ser un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de un producto purificado, es una en la que el producto está más concentrado de lo que está el producto en su medio en una célula. Tal y como se utiliza en la presente, una composición que es un compuesto “sustancialmente puro” está sustancialmente libre de uno o más de otros compuestos, es decir, la composición contiene más del 80 % vol., más del 90 % vol., más del 95 % vol., más del 96 % vol., más del 97 % vol., más del 98 % vol., más del 99 % vol., más del 99,5 % vol., más del 99,6 % vol., más del 99,7 % vol., más del 99,8 % vol., más del 99,9 % vol. del compuesto; o menos del 20 % vol., menos del 10 % vol., menos del 5 % vol., menos del 3 % vol., menos del 1 % vol., menos del 0,5 % vol., menos del 0,1 % vol., menos del 0,01 % vol. de uno o más de los compuestos, en base al volumen total de la composición.

45 **[0034]** Recombinante: una molécula o proteína de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia no natural, que tiene una secuencia hecha mediante una combinación artificial de otros dos segmentos separados de secuencia, o ambos. Esta combinación artificial puede realizarse, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas o proteínas de ácido nucleico, como las técnicas de ingeniería genética. Recombinante también se emplea para describir moléculas o proteínas de ácido nucleico que han sido manipuladas artificialmente, pero que contienen las mismas secuencias reguladoras y regiones codificadoras que se encuentran en el organismo del que se aisló el ácido nucleico.

50 **[0035]** “Unión específica” se refiere a la capacidad de dos moléculas de unirse preferentemente entre sí a unirse a otras moléculas del medio. Normalmente, “unión específica” discrimina la unión accidental en una reacción mediante, al menos, dos veces, más normalmente al menos 10 veces y, a menudo, al menos 100 veces. Normalmente, la afinidad o avidez de una reacción específica, como se cuantifica mediante una constante de disociación, es de 10^{-7} M o mayor (por ejemplo, 10^{-8} M 10^{-9} M o incluso mayor).

60 **[0036]** En general, la “hibridación severa” se lleva a cabo a 25 °C menos del punto de fusión (T_m) para el ADN híbrido específico en un conjunto de condiciones en particular. El “lavado severo” se lleva a cabo a una temperatura de 5 °C por debajo de la T_m para el ADN híbrido específico en un conjunto de condiciones en particular. La T_m es la temperatura a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), pág 9.51. Para los objetivos de la presente, las “condiciones severas” se definen para la hibridación en fase de solución como hibridación acuosa (es decir, libre de formamida) en 6xSSC (donde 20xSSC contiene NaCl 3,0 M y citrato sódico 0,3 M), 1 % SDS a 65 °C durante 8 – 12 horas, seguido de dos lavados en 0,2xSSC, 0,1 % SDS a 65 °C durante 20 minutos. Resultará evidente para los expertos en la disciplina que la

hibridación a 65 °C tendrá lugar a diferentes velocidades dependiendo de numerosos factores que incluyen la longitud y el porcentaje de identidad de las secuencias que se están hibridando.

5 **[0037]** Un ejemplo preferido y no limitante de condiciones de hibridación severas incluye la hibridación en 4x cloruro sódico / citrato sódico (SSC) a 65 – 70 °C (o hibridación en 4x SSC más 50 % de formamida a 42 – 50 °C) seguido de uno o más lavados en 0,3xSSC a 65 – 70 °C. Un ejemplo preferido y no limitante de condiciones de hibridación severas reducidas incluyen hibridación en 4xSSC a 50 – 60 °C (o alternativamente hibridación en 6xSSC más 50 % de formamida a 40 – 45 °C) seguido de uno o más lavados en 2xSSC a 50 – 60 °C. Los rangos intermedios, por ejemplo a 65 – 70 °C o a 42 – 50 °C también están dentro del alcance de la invención. Puede sustituirse SSPE (1x SSPE es NaCl 0,15 M, 10 mM NaH₂PO₄ y 1,25 mM EDTA, pH 7,4) por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y 15 mM de citrato sódico) en la hibridación y en los tampones de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos tras la hibridación. La temperatura de hibridación para los híbridos que se suponían inferiores a 50 pares de bases debería ser 5 – 10 °C inferior a la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina según las siguientes ecuaciones. Para los híbridos inferiores a 18 pares de bases, T_m (°C) = 2(# de bases A + T) + 4 (# de bases G+C). Para los híbridos de entre 18 y 49 pares de bases, T_m (°C) = 81,5 – 16,6(log 10 [Na⁺]) + 0,41 (% G + C) – (600 / N), donde N es el número de bases en el híbrido y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ([Na⁺] para 1x SSC = 0,165 M).

20 **[0038]** El profesional médico reconocerá que pueden añadirse reactivos a la hibridación y / o tampones de lavado. Por ejemplo, para disminuir la hibridación no específica de moléculas de ácido nucleico a, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa o nylon, pueden utilizarse agentes bloqueantes, incluyendo de manera no limitante ADN portador de esperma de arenque o salmón o BSA y / o detergentes, incluyendo de manera no limitante SDS, agentes quelantes EDTA, Ficoll, PVP y similares. Cuando se emplean membranas de nylon, en particular, otro ejemplo no limitante adicional de condiciones de hibridación severa es la hibridación en NaH₂PO₄ 0,25 – 0,5 M, 7 % SDS a 65 °C, seguido de uno o más lavados en NaH₂PO₄ 0,02 M, 1 % SDS a 65 °C (Church y Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991 – 1995,) o, alternativamente, 0,2xSSC, 1 % SDS.

30 **[0039]** El término “homología sustancial” o “similitud sustancial”, cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando está alineado de forma óptima con las inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad entre las secuencias de nucleótidos en al menos el 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, preferiblemente al menos el 90 % y, más preferiblemente, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleótidas, como se mide mediante cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, como por ejemplo FASTA, BLAST o Gap, como se ha descrito anteriormente.

35 **[0040]** De forma alternativa, existe una homología o similitud sustancial cuando un ácido nucleico o fragmento del mismo se hibrida a otro ácido nucleico, a una hebra de otro ácido nucleico, o a su hebra complementaria, en condiciones de hibridación severas. Las “condiciones de hibridación severas” y “condiciones de lavado severas” en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico dependen de numerosos parámetros físicos diferentes. La hibridación del ácido nucleico se verá afectada por condiciones tales como concentración salina, temperatura, disolventes, la composición de las bases de las especies a hibridar, la longitud de las regiones complementarias y el número de emparejamientos erróneos entre las bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos que se hibridan, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Una persona de experiencia ordinaria en la técnica sabe cómo variar estos parámetros para lograr una severidad particular en la hibridación.

40 **[0041]** El término “vector” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se haya unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden unirse segmentos adicionales de ADN. Otros vectores incluyen cósmidos, cromosomas bacterianos artificiales (BAC) y cromosomas artificiales para levaduras (YAC). Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden unirse segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico (se describe en más detalle más adelante). Ciertos vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que funciona en las células huésped).

45 Pueden integrarse otros vectores en el genoma de una célula huésped después de introducirlos en las células huésped, y así se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores preferentes pueden dirigir la expresión de genes a los que están ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la disciplina. Cuando el resultado de la integración es una expresión estable, el sitio de integración del constructo puede tener lugar de manera aleatoria en el genoma huésped o puede dirigirse mediante el uso de constructos con regiones de homología con el genoma huésped suficientemente para dirigir la recombinación con el locus huésped. Cuando los constructos se dirigen a un locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras transcripcionales y translaciones pueden proporcionarse por el locus endógeno.

50 **Modulación de los niveles de frataxina por el interferón gamma (IFN γ)**

55

60

65

5 **[0042]** El IFN γ es una citoquina existente en un dímero. El IFN γ se encuentra en algunos mamíferos, incluyendo los seres humanos. Cuando se forma, el IFN γ humano tiene una SEC ID N° 3 de 166 aminoácidos (MKYTSYLAF QLCIVLGS LG CYCQDPYVKE AENLKKYFNA GHSDVADNGT LFLGILKNWK EESDRKIMQS QIVSFYFKLF KNFKDDQSIQ KSVETIKEDM NVKFFNSNKK KRDDFEKLTN YSVTDLNVQR KAIHELIVM AELSPA AKTG KRKRSQMLFR GRRASQ). Antes de la secreción de la célula, los primeros 23 aminoácidos y la señal peptídica se eliminan para generar un IFN γ maduro de 143 aminoácidos. (SEC ID N° 4 – véase la Tabla 2). El propéptido al final de la secuencia se elimina también dando lugar a la SEC ID N° 5 (véase la Tabla 2).

10 **[0043]** Las variaciones naturales del IFN γ incluyen sustituciones de aminoácidos en K29Q y en R160Q con posiciones determinadas en la secuencia completa de 166 aminoácidos. El IFN γ humano con una o dos de estas variaciones podría ser de la siguiente manera: la SEC ID N° 6 (MKYTSYLAFQLCIVLGS LG CYCQDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFK LFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRGRRASQ) es una secuencia completa de 166 aminoácidos del IFN γ K29Q. La SEC ID N° 7 (véase la Tabla 2) es un IFN γ maduro K29Q. La SEC ID N° 8 (véase la Tabla 2) es un IFN γ maduro K29Q sin el propéptido. La SEC ID N° 9 (MKYTSYLAFQLCIVLGS LG CYCQDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFK LFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQGRRASQ) es una secuencia completa de 166 aminoácidos del IFN γ R160Q. La SEC ID N° 10 (véase la Tabla 2) es un IFN γ maduro R160Q. La SEC ID N° 11 (véase la Tabla 2) es un IFN γ maduro R160Q sin el propéptido. La SEC ID N° 12 (MKYTSYLAFQLCIVLGS LG CYCQDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQS QIVSFYFK LFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHEL1QVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQGRRASQ) es una secuencia completa de 166 aminoácidos del IFN γ K29Q y R160Q. La SEC ID N° 13 (véase la Tabla 2) es un IFN γ maduro K29Q y R160Q. La SEC ID N° 14 (véase la Tabla 2) es un IFN γ maduro K29Q y R160Q sin el propéptido.

30 **[0044]** Están disponibles las formas recombinantes del IFN γ . Los ejemplos incluyen, no se limitan a, ACTIMMUNE™ (conocido también como IMUKIN™ y tiene la SEC ID N° 2) disponible en InterMune en Brisbane, CA; y el IFN γ recombinante humano cat. #300 - 02 (SEC ID N° 1) disponible en Peprotech en Rocky Hill, NJ.

35 **[0045]** Introducción de IFN γ en una variedad de células que modula los niveles de frataxina. Tanto el ARNm de frataxina como la proteína de frataxina se acumulan en respuesta al IFN γ en las líneas celulares carentes de frataxina, y la frataxina se encuentra también en las CMSP primarias de los pacientes con AFRD. La frataxina se aumenta transcripcionalmente mediante el IFN γ en numerosos sistemas celulares, incluyendo las células defectuosas en frataxina derivadas de los pacientes con AFRD.

40 **[0046]** En una realización, el IFN γ se introduce en la células en forma de una composición que comprende un polipéptido que tiene una o más de las secuencias de la Tabla 2. En una realización, la composición comprende un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% en cualquiera de las secuencias de la Tabla 2.

45 **[0047]** En una realización, el IFN γ se administra a un paciente que necesita la modulación de los niveles de frataxina. En una realización, el paciente tiene ataxia de Friedreich. En una realización, la composición administrada al paciente comprende un polipéptido que tiene una o más de las secuencias de la Tabla 2. En una realización, la composición comprende un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% en cualquiera de las secuencias de la Tabla 2. En una realización, la composición administrada al paciente comprende además manitol, succinato de sodio y polisorbato. En una realización, la composición comprende además agua estéril.

50 **[0048]** El IFN γ se puede administrar al paciente a través de una inyección. En una realización, se inyecta al paciente una composición que comprende 100 mcg de IFN γ formulado en 20 mg de manitol, 0,36 de succinato de sodio, 0,05 de polisorbato 20 y agua estéril.

55 **[0049]** En una realización, se administra al paciente ACTIMMUNE™ o IMUKIN™ (SEC ID N° 2) de acuerdo con las indicaciones en el envase del fármaco.

Modulación de la aconitasa por el interferón gamma

60 **[0050]** El IFN γ aumenta la proteína frataxina mitocondrial, un componente central de la maquinaria de los grupos de hierro – azufre (ISC) en las eucariotas (1, 14). La enzima aconitasa contiene ISC. La carencia de frataxina provoca por lo tanto alteraciones metabólicas generalizadas, incluyendo la severa reducción en la producción de ATP mitocondrial, en la disfunción del ciclo de Krebs y en el daño oxidativo. De este modo, el aumento del IFN γ inducido de la frataxina en las células con AFRD mejora la actividad metabólica en las células con AFRD que incluyen la recuperación de la actividad de la aconitasa.

65

5 [0051] La introducción del IFN γ en las células provoca una mejora de la actividad de la aconitasa. En una realización, el IFN γ se introduce en la célula en forma de composición que comprende un polipéptido que tiene una o más de las secuencias de la Tabla 2. En una realización, la composición comprende un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% en cualquiera de las secuencias de la Tabla 2.

10 [0052] En una realización, el IFN γ se administra a un paciente que necesita mejorar la actividad de la aconitasa. En una realización, el paciente tiene ataxia de Friedreich. En una realización, la composición administrada al paciente comprende un polipéptido que tiene una o más de las secuencias de la Tabla 2. En una realización, la composición comprende un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia del 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% en cualquiera de las secuencias de la Tabla 2. En una realización, la composición administrada al paciente comprende además manitol, succinato de sodio y polisorbato. En una realización, la composición comprende además agua estéril.

15 [0053] El IFN γ se puede administrar al paciente a través de una inyección. En una realización, se inyecta al paciente una composición que comprende 100 mcg de IFN γ formulado en 20 mg de manitol, 0,36 de succinato de sodio, 0,05 de polisorbato 20 y agua estéril.

20 [0054] En una realización, se administra al paciente ACTIMMUNE™ o IMUKIN™ (SEC ID N° 2) de acuerdo con las indicaciones en el envase del fármaco.

EJEMPLOS

Procedimientos generales

25 [0055] *Cultivos celulares.* Se obtuvieron líneas celulares Hela (carcinoma cervical humano), U937 (leucemia monocítica) y U118 (glioblastoma humano) de la colección europea de cultivos celulares. Las células HeLa y U937 se cultivaron en el medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de L – glutamina y antibióticos. Las células U118 se cultivaron en medio D – MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de L – glutamina y antibióticos. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los donantes más sanos y los pacientes con AFRD se aislaron a partir de la sangre venosa heparinizada mediante la centrifugación del gradiente Ficoll 400. Los fibroblastos humanos derivados de un paciente con AFRD (GM03816) se obtuvieron en el depósito de células genéticas humanas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales (NIGMS) en el Coriell Institute, Camden, Nueva Jersey, EE.UU. Las células se cultivaron en medio DMEM con 15 % de suero fetal bovino con 2 mM de L – glutamina y antibióticos. El IFN γ recombinante humano era de Peprotech (cat. #300 - 02, sec:

40 MQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL
 FKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELI
 QVMAELSPAAGTGRKRKRSQMLFQGRRASQ (SEC ID N° 1)).

45 [0056] *Inmunoelctrotransferencia.* Los extractos celulares totales se prepararon en un tampón de lisis RIPA frío suplementado con inhibidores de la proteasa. Las proteínas se separaron en SDS – PAGE al 12 %, se electrotransfirieron a las membranas de nitrocelulosa de Protan (Whatman) y se analizaron por detección por ECL (GE Healthcare Life Sciences) con los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti – frataxina (MAB10876 Immunological sciences), anticuerpo monoclonal anti – alfa - tubulina (Sigma) y anticuerpo monoclonal anti – actina (Sigma).

50 [0057] *RT – PCR cuantitativa.* El ARN total (500 ng) se aisló de la AFRD. Los fibroblastos se extrajeron utilizando un reactivo TRI – zol (Invitrogen) y el ADNc se preparó utilizando SuperScript VILO (invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los niveles de la expresión del ARNm de la FXN humana se evaluaron mediante la RT – PCR cuantitativa utilizando un secuenciador ABI Prism 7000, SYBR® Green (Applied Biosystems) con los siguientes cebadores: RTFxnFWD 5' - CATACACGTTTGAGGACTATGATGTCT - 3', RTFxnREV 5' – TTCGGCGTCTGCTTGTGATC - 3' (Invitrogen) y QuantiTect Primer Assay (200) (QT00095431) (Qiagen) para los cebadores de la actina como los genes constitutivos. El análisis de la PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando el método 2 (- Delta Delta C(T)) (2 – DDCT). Los datos se normalizaron utilizando la media geométrica de un gen constitutivo identificado por el software geNorm 3.4 (13). La relación de cambio en la expresión génica se consideró significativamente diferente a la referencia cuando la prueba T de Student produjo $p < 0,05$.

Ejemplo 1 – el IFN γ induce la acumulación de frataxina

65 [0058] Para comprobar si el IFN γ puede afectar a los niveles de proteína de frataxina, las células HeLa, las células U937, las células U118 y las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de los donantes sanos se cultivaron durante 24 horas en presencia de concentraciones indicadas de interferón gamma, a continuación los

lisados celulares se analizaron mediante SDS – PAGE y se transfirieron con anticuerpos monoclonales anti – frataxina y anti – actina. Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes para cada tipo celular. Las transferencias representativas se muestran en la Figura 1. El IFN γ induce la acumulación de la frataxina en las células HeLa del carcinoma cervical humano (Figura 1 A) y en la línea celular U937 de la leucemia monocítica (Figura 1 B) en una forma dependiente de la dosis. De manera similar, el IFN γ promovió la expresión de la frataxina en la línea celular U 118 del glioblastoma humano (Figura 1 C). Para verificar que el IFN γ puede inducir la acumulación de la frataxina en las células no transformadas, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en reposo de los individuos normales se expusieron al IFN γ y a la acumulación de la frataxina cuantificada por Western blot. La Figura 1 D muestra que el IFN γ indujo la acumulación de la frataxina en las CMPS en reposo en una forma dependiente de la dosis. Todos estos datos indican que el IFN γ es capaz de aumentar los niveles de frataxina en diversos tipos celulares.

Ejemplo 2 – el IFN γ induce la expresión de frataxina en las células con AFRD

[0059] Los fibroblastos GM03816 derivados de AFRD se cultivaron durante 24 horas en presencia de concentraciones indicadas de interferón gamma, a continuación los lisados celulares se analizaron mediante SDS – PAGE y se transfirieron con anticuerpos monoclonales anti – frataxina y anti – actina. La Figura 2 A muestra una transferencia representativa de tres experimentos independientes realizados. Tal como muestra la Figura 2 A, el IFN γ indujo el aumento de la frataxina en las células defectuosas en frataxina en una forma dependiente de la dosis.

[0060] Para verificar que el IFN γ puede ser eficaz en las células primarias con AFRD, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recién aisladas de un paciente con AFRD se cultivaron durante 24 horas en presencia de concentraciones indicadas de interferón gamma, a continuación los lisados celulares se analizaron mediante SDS – PAGE y se transfirieron con anticuerpos monoclonales anti – frataxina y anti – actina. Tal como muestra la Figura 2 B, el IFN γ incrementó de manera significativa la expresión de la frataxina en una forma dependiente de la dosis. La cantidad de frataxina presente en las CMSP de un hermano sano del paciente se muestra también para la comparación (HC). La comparación indica que el IFN γ indujo una recuperación de hasta ~ 50 % de los niveles normales de frataxina. Las CMSP aisladas de nueve de diez pacientes con AFRD testadas (6 hombres y 4 mujeres, tripletes GAA que oscilan entre 350 – 915, edad comprendida entre 14 – 56 años) dieron resultados similares.

Ejemplo 3 – el IFN γ induce la acumulación del ARNm de la frataxina en las células con AFRD

[0061] Los fibroblastos con AFRD (células GM03816) se cultivaron durante los tiempos indicados en presencia de 500 ng / ml de interferón gamma, a continuación se cuantificó el ARNm por RT – PCR. Los medios \pm 1 SD de tres experimentos independientes se mostraron en la Figura 3. Puede detectarse un incremento del ARNm de la frataxina en los fibroblastos con AFRD tras 1 hora de exposición al IFN γ , con picos de acumulación a las 2 horas y se vuelve a los niveles de línea de base a las 4 horas. El aumento en el ARNm de la frataxina en las células tratadas con IFN γ contra las células tratadas con el control fue significativo a la hora ($p < 0,001$) y a las 2 horas ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el IFN γ induce la acumulación de la frataxina mediante el aumento de los transcritos de frataxina en las células con AFRD.

Ejemplo 4 – IFN γ recupera el defecto de la aconitasa en las células con AFRD

[0062] Las células defectuosas en frataxina tienen una actividad carente de enzimas que contienen ISC, tal y como las aconitasas. Para investigar las consecuencias funcionales del aumento de la frataxina inducida en el IFN γ , los fibroblastos con AFRD se cultivaron durante 24 horas en presencia de concentraciones indicadas del IFN γ , después se cuantificó la actividad enzimática de la aconitasa.

[0063] Los fibroblastos con AFRD se recogieron por tripsinización, se lavaron dos veces en tampón fosfato salino de Dulbecco (DPBS) y se lisaron en un tampón CelLytic M (Sigma – Aldrich) suplementado con un cóctel completo del inhibidor de la proteasa sin EDTA (Roche). La actividad de la aconitasa se midió espectrofotométricamente a 340 nm por una reacción acoplada de la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa. Las reacciones del ensayo contenían 100 μ g de extracto celular en 50 nM de Hepes, pH 7,4, 1 nM de citrato de sodio, 0,6 nM de MnCl $_2$, 0,2 de NADP $^+$ y 2 U / ml de isocitrato deshidrogenasa (Sigma – Aldrich). Para el cálculo de la actividad enzimática, se definió una miliunidad de la enzima mientras la cantidad de la proteína convirtió 1 nmol de NADP $^+$ en 1 minuto a 25 °C. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba T de Student; todos los valores se expresaron como medios \pm 1SD.

[0064] Los medios \pm 1SD de cuatro experimentos independientes se mostraron en la Figura 4. El aumento de la actividad de la aconitasa en las células tratadas con IFN γ contra las células tratadas con control fue significativo ($p < 0,01$) en ambas concentraciones del IFN γ . EL IFN γ indujo un fuerte aumento (un aumento de hasta > 90 %) de la actividad de la aconitasa en los fibroblastos con AFRD.

Ejemplo 5 – el IFN γ aumenta los niveles de la frataxina *in vivo* y mejora la coordinación locomotora y motora en ratones

5 [0065] Para investigar si el IFN γ puede ser eficaz *in vivo*, 13 ratones con AFRD (ratones YG8R modificados para expresar el gen de la frataxina humana que contiene múltiples repeticiones GAA (39, 40)) se trataron con inyecciones subcutáneas de 40 μg / kg de IFN γ , tres veces / semana desde las 8 semanas de edad durante 14 semanas, mientras que 13 ratones con AFRD de la misma edad se les proporcionó un vehículo. Cada dos semanas se evaluó la coordinación motora y la actividad locomotora, incluyendo la distancia ambulante, la velocidad media, los recuentos verticales y el rendimiento del *rotarod*. También se midió el peso corporal en cada punto temporal. Tal y como se muestra en la Figura 5 A, los ratones con AFRD tratados con IFN γ mostraron una mejora significativa de la actividad locomotora, como midió la distancia ambulante ($p < 0,01$), la velocidad media ($p < 0,01$) y los recuentos verticales ($p < 0,001$), en comparación con los ratones con AFRD tratados con el vehículo. La coordinación motora, tal como midió por el rendimiento del *rotarod*, mejoró considerablemente en los ratones tratados con IFN γ tras 10 semanas de tratamiento en comparación con los ratones tratados con el vehículo ($p < 0,001$). Los mejores rendimientos en la actividad locomotora y en la coordinación motora en ratones tratados con IFN γ sucedieron independientemente de los cambios en el peso corporal. Se mostró en la Figura 5 A en los puntos temporales indicados la media de la relación de cambio del tiempo 0, \pm s.e.m. para cada parámetro medido en 13 ratones con AFRD inyectados con IFN γ en comparación con los 13 ratones con AFRD inyectados con el vehículo. Cuadrados: animales tratados con IFN γ , triángulos: animales tratados con el vehículo.

20 [0066] Para comprobar que la frataxina aumentó de hecho *in vivo* en los tejidos sensibles al IFN γ , se cuantificó la frataxina en el bazo de 4 ratones con AFRD tratados con IFN γ elegidos al azar y 4 ratones con AFRD tratados con el vehículo elegidos al azar al final del tratamiento del IFN γ . Todos los lisados celulares se analizaron por SDS – PAGE y se transfirieron con anticuerpos monoclonales anti – frataxina y anti – actina. La Figura 5 B muestra que los niveles de frataxina eran mayores en el bazo de los ratones tratados con IFN γ que en los ratones con AFRD tratados con el vehículo.

25 **Ejemplo profético 1 – tratamiento de la ataxia de Friedreich con IFN γ**

30 [0067] El IFN γ recombinante se produce en sistemas de expresión altamente eficaces de la proteína, se purifica y se administra en un animal que tiene frataxina reducida o que tiene ataxia de Friedreich (AFRD). El IFN γ se administra en forma monomérica o dimérica formulado con un excipiente apropiado. Se inyecta una dosis de 1 – 2 millones de UI de IFN γ / m^2 de superficie corporal por vía subcutánea o intramuscular en días alternos o tres veces por semana. Los regímenes alternativos o las vías de administración se utilizarán cuando sea necesario.

35 [0068] Los animales se controlan durante el tratamiento por procedimientos estándares del laboratorio para la acumulación de la frataxina en las células mononucleares de sangre periférica (por ejemplo, por SDS – PAGE seguido por análisis de inmunotransferencia de los lisados celulares, por inmunotinción intracelular, y / o por análisis de FACS de las células intactas). El tratamiento con IFN γ recombinante provoca un aumento de los niveles celulares de la frataxina en los animales carentes de frataxina.

40 **Ejemplo profético 2 – tratamiento de la ataxia de Friedreich con IFN γ**

45 [0069] El IFN γ recombinante se produce en sistemas de expresión altamente eficaces de proteína, se purifica y se administra en un paciente que tiene ataxia de Friedreich (AFRD). El IFN γ se administra en forma monomérica o dimérica formulado con un excipiente apropiado. Se inyecta una dosis de 1 – 2 millones de UI de IFN γ / m^2 de superficie corporal por vía subcutánea o intramuscular en días alternos o tres veces por semana. Los regímenes alternativos o las vías de administración se utilizarán cuando sea necesario.

50 [0070] El tratamiento con IFN γ recombinante comienza tras el diagnóstico que se ha establecido de la AFRD. Para un conjunto de datos experimentales, los pacientes con AFRD que ya han padecido de manera poco satisfactoria la terapia se inyectan con IFN γ recombinante tras el periodo de lavado mínimo necesario. Los pacientes se controlan durante el tratamiento mediante los procedimientos estándares clínicos / de laboratorio (por ejemplo, examen físico, ECG, análisis hematológico, registro de posibles efectos secundarios) para la acumulación de frataxina en las células mononucleares de sangre periférica (por ejemplo, por SDS – PAGE seguido por análisis de inmunotransferencia de los lisados celulares, por inmunotinción intracelular, y / o por análisis de FACS de las células intactas), y para los parámetros específicos de eficacia, tal como se cuantificó mediante las escalas como la Escala Internacional Cooperativa de Clasificación de Ataxia (ICARS), la Escala de Clasificación de Ataxia de Friedreich (FARS), el Índice de Barthel Modificado (MBI) o la Medida de Independencia Funcional (FIM). El tratamiento con IFN γ recombinante provoca un aumento de los niveles celulares de frataxina en los pacientes con AFRD y una mejora consecuente de los parámetros clínicos, tal como midió uno o más métodos de puntuación anteriormente mencionados.

60 [0071] Además, el IFN γ recombinante se utiliza en pacientes con AFRD junto a otros enfoques terapéuticos (por ejemplo, tratamientos basados en antioxidantes) que utilizan regímenes de combinación óptimos. Una vez más, el tratamiento de combinación con el IFN γ recombinante provoca un aumento adicional de los niveles celulares de frataxina y una mejora consecuente de los parámetros clínicos, tal como midió al menos una de las puntuaciones de ICARS, FARS, MBI o FIM.

[0072] Se ha presentado con fines de ilustración la descripción del documento; no pretende ser exhaustivo o limitar la invención a las formas precisas reveladas. Los expertos en la disciplina pueden apreciar a tenor de las enseñanzas que algunas modificaciones y variaciones son posibles.

5

Tabla 2:

| | | |
|----|---------------------|---|
| 10 | SEC ID Nº 1 | MQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKK RDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQGRRASQ |
| 15 | SEC ID Nº 2 | MQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDR KIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKK RDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRGR |
| 20 | SEC ID Nº 4 | QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFR GRRASQ |
| 25 | SEC ID Nº 5 | QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRG |
| 30 | SEC ID Nº 7 | QDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRGRRASQ |
| 35 | SEC ID Nº 8 | QDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRG |
| 40 | SEC ID Nº 10 | QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQGRRASQ |
| 45 | SEC ID Nº 11 | QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQG |
| 50 | SEC ID Nº 13 | QDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQGRRASQ |
| 55 | SEC ID Nº 14 | QDPYVQEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKR DDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFQG |
| 60 | | |

65

REFERENCIAS

[0073]

- 5 1. Pandolfo, M., and A. Pastore. 2009. *The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin*. J Neurol 256 Suppl 1: 9 - 17.
2. Pandolfo, M. 2009. *Friedreich ataxia: the clinical picture*. J Neurol 256 Suppl 1: 3 - 8.
3. Delatycki, M.B. 2009. *Evaluating the progression of Friedreich ataxia and its treatment*. J Neurol 256 Suppl 1: 36 - 41.
- 10 4. Marmolino, D., and F. Acquaviva. 2009. *Friedreich's Ataxia: from the (GAA)_n repeat mediated silencing to new promising molecules for therapy*. Cerebellum 8: 245 - 259.
5. Puccio, H. 2009. *Multicellular models of Friedreich ataxia*. J Neurol 256 Suppl 1.: 18 - 24.
6. Condò, I., N. Ventura, F. Malisan, A. Rufini, B. Tomassini, and R. Testi. 2007. *In vivo maturation of human frataxin*. Hum Mol Genet 16: 1534 - 1540.
- 15 7. Schmucker, S., M. Argentini, N. Carelle-Calmels, A. Martelli, and H. Puccio. 2008. *The in vivo mitochondrial twostep maturation of human frataxin*. Hum Mol Genet 17: 3521 - 3531.
8. Acquaviva, F., I. De Biase, L. Nezi, G. Ruggiero, F. Tatangelo, C. Pisano, A. Monticelli, C. Garbi, A.M. Acquaviva, and S. Coccozza. 2005. *Extra-mitochondrial localisation of frataxin and its association with IscU during enterocytelike differentiation of the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2*. J Cell Sci 118: 3917 - 3924.
- 20 9. Condò, I., N. Ventura, F. Malisan, B. Tomassini, and R. Testi. 2006. *A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival*. J Biol Chem 281: 16750 - 16756.
10. Condò, I., F. Malisan, I. Guccini, D. Serio, A. Rufini, and R. Testi. 2010. *Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin*. Hum Mol Genet 19: 1221 - 1229.
- 25 11. Yoon, T., and J.A. Cowan. 2003. *Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins*. J Am Chem Soc 125: 6078 - 6084.
12. Adinolfi, S., C. Iannuzzi, F. Prischi, C. Pastore, S. Iametti, S.R. Martin, F. Bonomi, and A. Pastore. 2009. *Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS*. Nat Struct Mol Biol 16: 390 - 396.
- 30 13. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol 3: RESEARCH0034.
14. Stemmler, T.L., E. Lesuisse, D. Pain, and A. Dancis. 2010. *Frataxin and mitochondrial Fe-S cluster biogenesis*. J Biol Chem
- 35 15. Lill, R., and U. Muhlenhoff. 2006. *Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms*. Annu Rev Cell Dev Biol 22: 457 - 486.
16. Bandyopadhyay, S., K. Chandramouli, and M.K. Johnson. 2008. *Iron-sulfur cluster biosynthesis*. Biochem Soc Trans 36: 1112 - 1119.
- 40 17. Collins, H.L. 2008. *Withholding iron as a cellular defence mechanism--friend or foe?* Eur J Immunol 38: 1803 - 1806.
18. Ganz, T. 2009. *Iron in innate immunity: starve the invaders*. Curr Opin Immunol 21: 63 - 67.
19. Byrd, T.F., and M.A. Horwitz. 1993. *Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma*. J Clin Invest 91: 969 - 976.
- 45 20. Fcelders, R.A., G. Vreugdenhil, A.M. Eggermont, P.A. Kuiper-Kramer, H.G. van Eijk, and A.J. Swaak. 1998. *Regulation of iron metabolism in the acute-phase response: interferon gamma and tumour necrosis factor alpha induce hypoferraemia, ferritin production and a decrease in circulating transferrin receptors in cancer patients*. Eur J Clin. Invest 28: 520 - 527.
- 50 21. Tacchini, L., E. Gammella, C. De Ponti, S. Recalcati, and G. Cairo. 2008. *Role of HIF-1 and NF-kappaB transcription factors in the modulation of transferrin receptor by inflammatory and anti-inflammatory signals*. J Biol Chem 283: 20674 - 20686.
22. Ludwiczek, S., E. Aigner, I. Theurl, and G. Weiss. 2003. *Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells*. Blood 101: 4148 - 4154.
- 55 23. Van Zandt, K.E., F.B. Sow, W.C. Florence, B.S. Zwillig, A.R. Satoskar, L.S. Schlesinger, and W.P. Lafuse. 2008. *The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome*. J Leukoc Biol 84: 689 - 700.
24. Sow, F.B., W.C. Florence, A.R. Satoskar, L.S. Schlesinger, B.S. Zwillig, and W.P. Lafuse. 2007. *Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis*. J Leukoc Biol 82: 934 - 945.
- 60 25. Kim, S., and P. Ponka. 2000. *Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2*. J Biol Chem 275: 6220 - 6226.
26. Alter-Koltunoff, M., S. Goren, J. Nousbeck, C.G. Feng, A. Sher, K. Ozato, A. Azriel, and B.Z. Levi. 2008. *Innate immunity to intraphagosomal pathogens is mediated by interferon regulatory factor 8 (IRF-8) that*
- 65

- stimulates the expression of macrophage-specific *Nrampl* through antagonizing repression by *c-Myc*. *J Biol Chem* 283: 2724 - 2733.
27. Richardson, D.R., M.L. Huang, M. Whitnall, E.M. Becker, P. Ponka, and Y.S. Rahmanto. 2010. *The ins and outs of mitochondrial iron-loading: the metabolic defect in Friedreich's ataxia*. *J Mol Med* 88: 323 - 329.
- 5 28. Saha, B., S. Jyothi Prasanna, B. Chandrasekar, and D. Nandi. 2010. *Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma*. *Cytokine* 50: 1 - 14.
29. Vanin, A.F. 2009. *Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology*. *Nitric Oxide* 21: 1 - 13.
- 10 30. Castro, L., M. Rodriguez, and R. Radi. 1994. *Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide*. *J Biol Chem* 269: 29409 - 29415.
31. Kennedy, M.C., W.E. Antholine, and H. Beinert. 1997. *An EPR investigation of the products of the reaction of cytosolic and mitochondrial aconitases with nitric oxide*. *J Biol Chem* 272: 20340 - 20347.
32. Tsou, A.Y., L.S. Friedman, R.B. Wilson, and D.R. Lynch. 2009. *Pharmacotherapy for Friedreich ataxia*. *CNS Drugs* 23: 213 - 223.
- 15 33. Marmolino, D., M. Manto, F. Acquaviva, P. Vergara, A. Ravello, A. Monticelli, and M. Pandolfo. 2010. *PGC1alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia*. *PLoS One* 5: e10025.
34. Sturm, B., D. Stupphann, C. Kaun, S. Boesch, M. Schranzhofer, J. Wojta, H. Goldenberg, and B. Scheiber-Mojdehkar. 2005. *Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro*. *Eur J Clin Invest* 35: 711 - 717.
- 20 35. Acquaviva, F., I. Castaldo, A. Filla, M. Giacchetti, D. Marmolino, A. Monticelli, M. Pinelli, F. Sacca, and S. Coccozza. 2008. *Recombinant human erythropoietin increases frataxin protein expression without increasing mRNA expression*. *Cerebellum* 7: 360 - 365.
36. Herman, D., K. Jenssen, R. Burnett, E. Soragni, S.L. Perlman, and J.M. Gottesfeld. 2006. *Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia*. *Nat Chem Biol* 2: 551 - 558.
- 25 37. Rai, M., E. Soragni, K. Jenssen, R. Burnett, D. Herman, G. Coppola, D.H. Geschwind, J.M. Gottesfeld, and M. Pandolfo. 2008. *HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model*. *PLoS One* 3: e1958.
38. Miller, C.H., S.G. Maher, and H.A. Young. 2009. *Clinical Use of Interferon-gamma*. *Ann N Y Acad Sci* 1182 :69 - 79.
- 30 39. Al-Mahdawi, S., et al. *The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues*. *Hum Mol Genet* 17, 735 - 746 (2008).
40. Al-Mahdawi, S., et al. *GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology*. *Genomics* 88, 580 - 590 (2006).

LISTADO SECUENCIAL

- 35 **[0074]**
- <110> TESTI, ROBERTO TOMASSINI, BARBARA
- 40 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ATAXIA DE FRIEDREICH CON INTERFERÓN GAMMA
- <130> 27808 - 19035 PCT
- 45 <140> PCT / IB2011 / 002710
- <141> 2011 - 08 -30
- <150> 61 / 378.284
- 50 <151> 2010 - 08 - 30
- <160> 16
- <170> Patente en versión 3.5
- 55 <210> 1
- <211> 144
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"
- 65

<400> 1

5 Met Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe
 1 5 10 15

10 Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly
 20 25 30

15 Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser
 35 40 45

20 Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp
 50 55 60

25 Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val
 65 70 75 80

30 Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu
 85 90 95

35 Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His
 100 105 110

40 Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly
 115 120 125

45 Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

<210> 2

<211> 140

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

50 <400> 2

55

60

65

ES 2 466 765 T3

1 Met Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe
 5 Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly
 10 Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser
 15 Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp
 20 Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val
 25 Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu
 30 Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His
 35 Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg
 40

<210> 3
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

45 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 50 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
 55
 60
 65

ES 2 466 765 T3

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45

5 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
 50 55 60

10 Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
 65 70 75 80

15 Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
 85 90 95

20 Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
 100 105 110

25 Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
 115 120 125

30 Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
 130 135 140

35 Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
 145 150 155 160

40 Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

<210> 4
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

45 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15

50 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30

55 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

60 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

65 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

65

ES 2 466 765 T3

5 <210> 6
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

10 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15

15 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Gln Glu Ala Glu
 20 25 30

20 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45

25 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
 50 55 60

30 Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
 65 70 75 80

35 Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
 85 90 95

40 Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
 100 105 110

45 Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
 115 120 125

50 Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
 130 135 140

55 Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
 145 150 155 160

60 Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

55 <210> 7
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

60

65

ES 2 466 765 T3

5 Gln Asp Pro Tyr Val Gln Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30
 10 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45
 15 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 25 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110
 30 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125
 35 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

40 <210> 8
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

45

50

55

60

65

ES 2 466 765 T3

1 Gln Asp Pro Tyr Val Gln Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 5 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 10 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 15 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 20 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 25 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 30 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 35 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly
 130 135

40 <210> 9
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

45

50

55

60

65

5 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
1 5 10 15

10 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
20 25 30

15 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
35 40 45

20 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
50 55 60

25 Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
65 70 75 80

30 Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
85 90 95

35 Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
100 105 110

40 Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
115 120 125

45 Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
130 135 140

50 Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln
145 150 155 160

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
165

50 <210> 10
<211> 143
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

55 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
1 5 10 15

60

65

ES 2 466 765 T3

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30

5 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

10 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

15 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

20 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95

25 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

30 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125

35 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

35 <210> 11
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

40 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15

45 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30

50 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

55 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

60 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

65 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

5

 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125

10

 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly
 130 135

15

 <210> 12
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

20

 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15

25

 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Gln Glu Ala Glu
 20 25 30

30

 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45

35

 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
 50 55 60

40

 Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
 65 70 75 80

45

 Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
 85 90 95

50

 Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
 100 105 110

55

 Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
 115 120 125

60

 Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
 130 135 140

65

 Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln
 145 150 155 160

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

ES 2 466 765 T3

<210> 13
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

5

Gln Asp Pro Tyr Val Gln Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15

10

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30

15

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

20

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

25

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

30

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95

35

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

40

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125

45

<210> 14
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

50

Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

55

60

65

ES 2 466 765 T3

1 Gln Asp Pro Tyr Val Gln Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 5 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 10 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 15 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 20 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 25 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 30 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 35 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly

40 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

 <400> 15
 catacacggtt tgaggactat gatgtct 27

 50 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <221> fuente
 <223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

 60 <400> 16
 ttcggcgtct gctgttgat c 21

65

Reivindicaciones

1. El interferón gamma para su utilización en un método de tratamiento de la ataxia de Friedreich.
- 5 2. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1 que consiste en o comprende al menos una identidad de secuencia del 90 % en cualquiera de las secuencias de la Tabla 2.
- 10 3. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho interferón gamma es recombinante.
- 15 4. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho interferón gamma es ACTIMMUNE™ o IMUKIN™.
- 20 5. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1 que consiste en o comprende la SEC ID N° 2.
6. El interferón gamma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el interferón gamma aumenta la expresión de la frataxina o incrementa la frataxina en una célula del paciente que tiene ataxia de Friedreich.
7. El interferón gamma para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el interferón gamma aumenta la actividad de la aconitasa en una célula del paciente que tiene ataxia de Friedreich.
- 25 8. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1, en el que el interferón gamma se administra en forma monomérica o dimérica formulado con un excipiente apropiado.
- 30 9. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 8, en el que se inyecta una dosis de 1 – 2 millones de UI de interferón gamma por m² de superficie corporal por vía subcutánea o intramuscular en días alternos o tres veces por semana.
- 35 10. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1, en el que el interferón gamma se administra en una composición que comprende manitol, succinato de sodio y polisorbato, y opcionalmente agua estéril.
- 40 11. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1, en el que el interferón gamma se administra a un paciente a través de una inyección.
- 45 12. El interferón gamma para su utilización según la reivindicación 1, en el que se inyecta al paciente una composición que comprende 100 mcg de interferón gamma formulado en 20 mg de manitol, 0,36 de succinato de sodio, 0,05 de polisorbato 20 y agua estéril.
- 50 13. Un método *ex vivo* del incremento de la expresión de la frataxina en una célula identificada que tiene una cantidad deficiente de frataxina o que tiene ataxia de Friedreich, que comprende la administración de una cantidad eficaz del interferón gamma de dicha células.
- 55 14. Un método *ex vivo* del incremento de la actividad de la aconitasa en una célula identificada que tiene una cantidad deficiente de actividad de la aconitasa o que tiene ataxia de Friedreich, que comprende la administración de una cantidad eficaz del interferón gamma de dicha célula.
- 60 15. Un método *ex vivo* según las reivindicaciones 13 o 14, en el que se define el interferón gamma en cualquiera de las reivindicaciones 2 – 5.
- 65

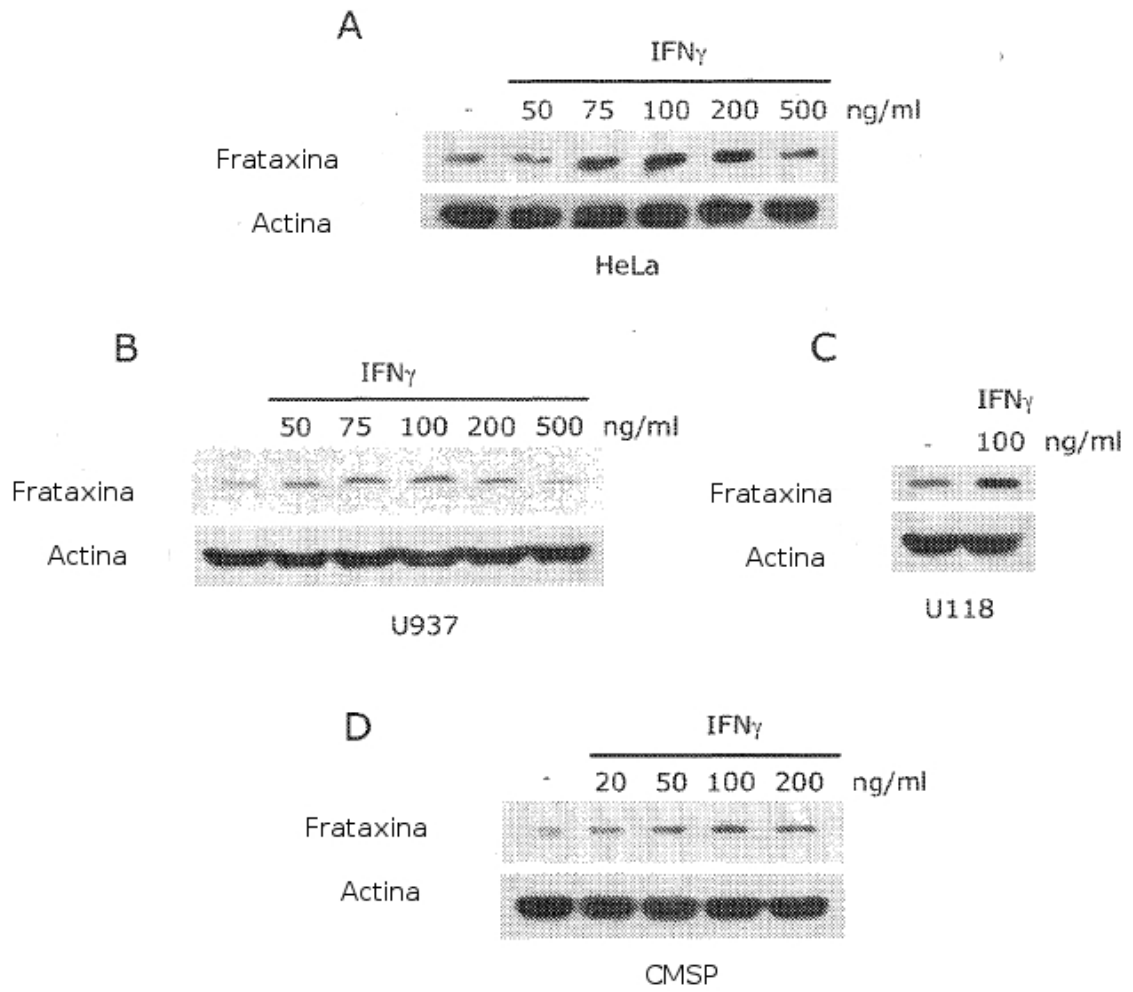


Fig. 1

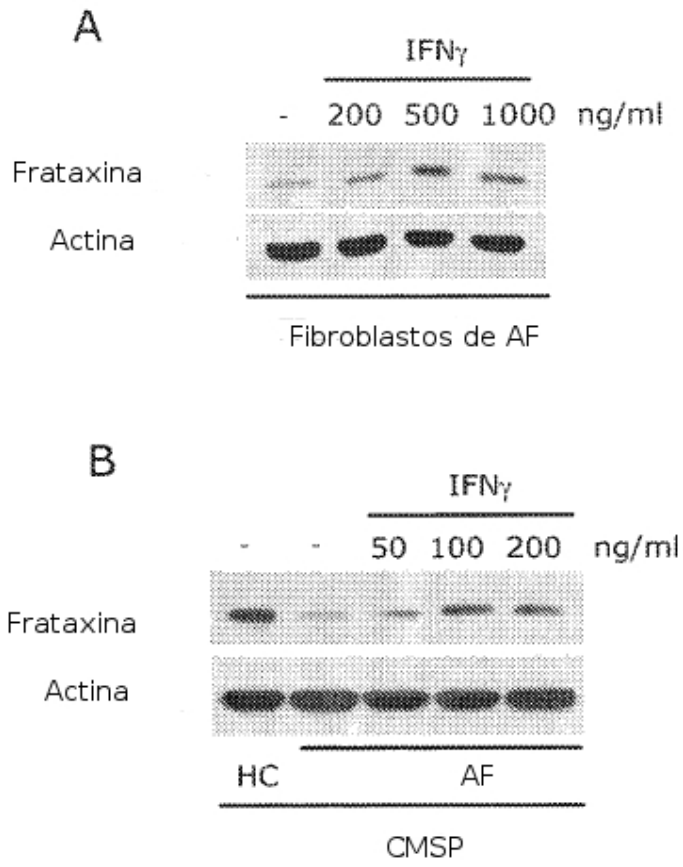


Fig. 2

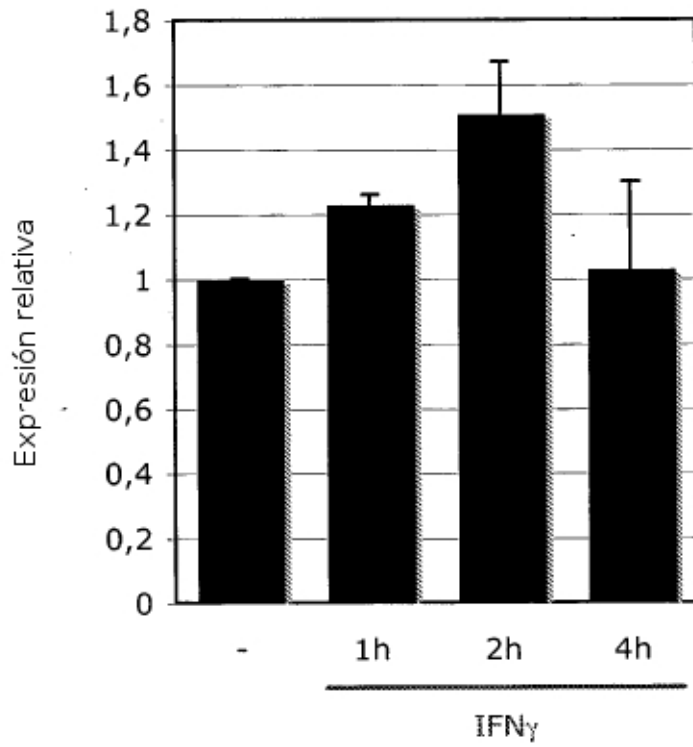


Fig. 3

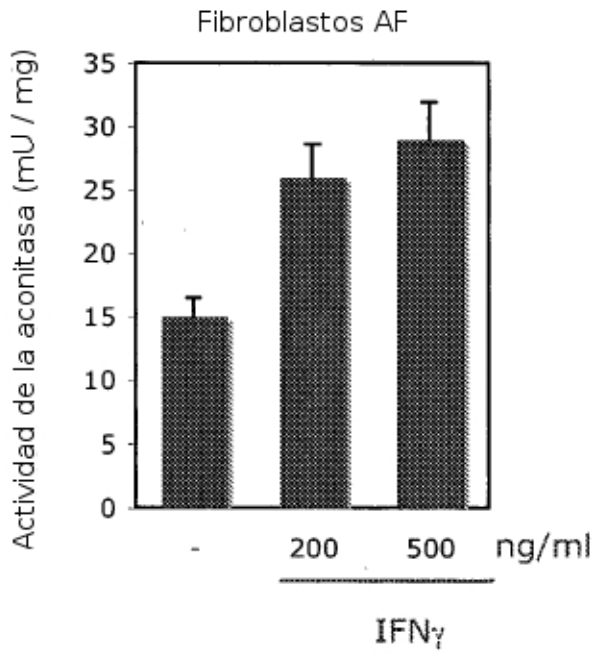


Fig. 4

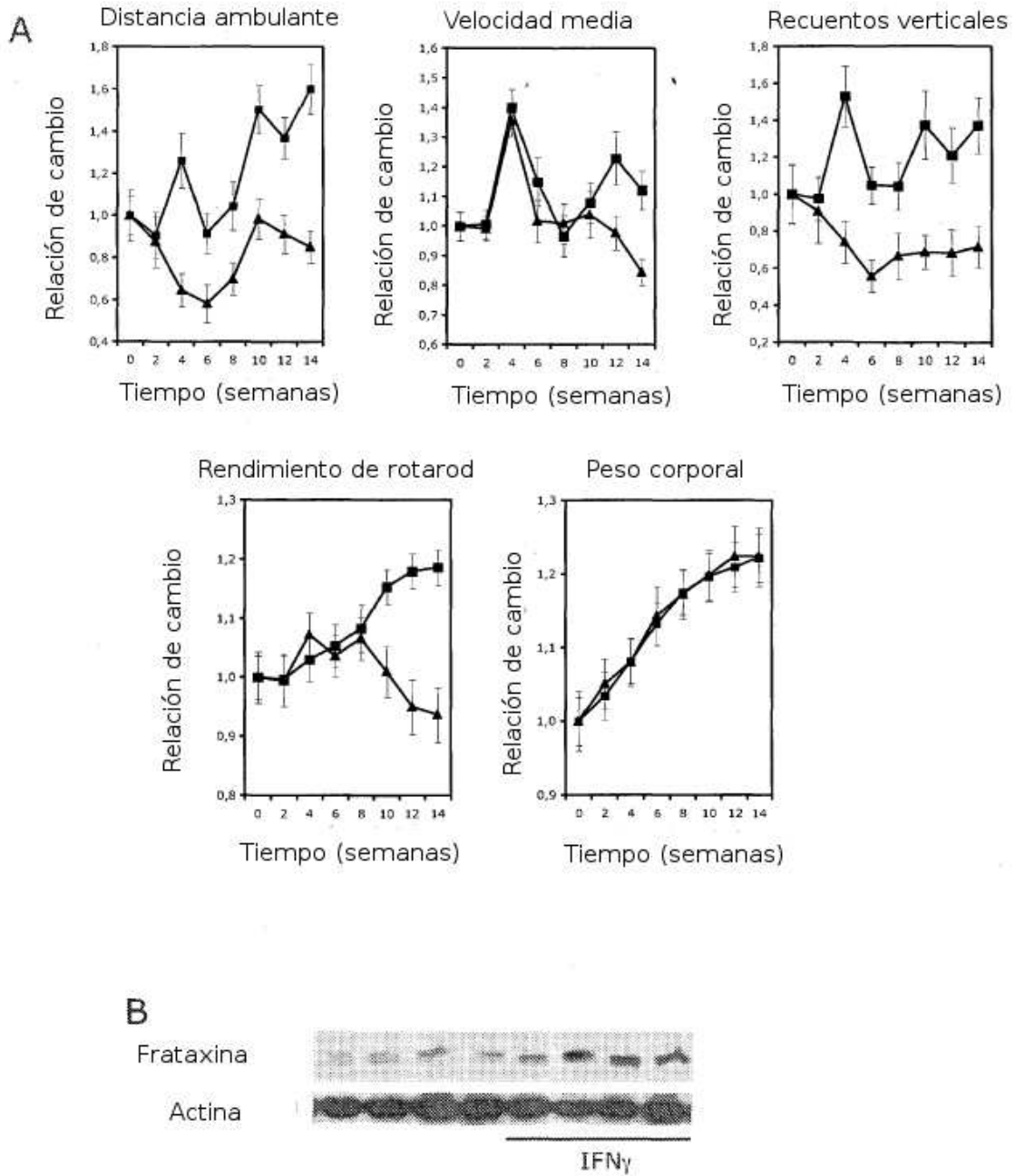


Fig. 5