

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 478**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2008 E 08716957 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2121685**

54 Título: **Nuevos compuestos derivados de indol y composiciones farmacéuticas que los contienen**

30 Prioridad:

19.02.2007 FR 0753349

21.03.2007 FR 0753975

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)**

3 rue Michel-Ange

75016 Paris, FR;

INSTITUT CURIE (33.3%) y

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)

72 Inventor/es:

LEJEUNE, FABRICE;

TAZI, JAMAL;

GRIERSON, DAVID;

RIVALLE, CHRISTIAN y

MAHUTEAU-BETZER, FLORENCE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 569 478 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos compuestos derivados de indol y composiciones farmacéuticas que los contienen

5 El proceso de degradación de los ARNm que poseen un codón de terminación precoz (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD) es un proceso de control cualitativo identificado en todos los organismos eucariotas estudiados hoy en día (CONTI y IZAURRALDE, 2005; MAQUAT, 2004a). Uno de las funciones de este mecanismo es degradar los
10 ARNm que presentan un codón de terminación prematuro (PTC) a fin de prevenir la síntesis de proteínas truncadas que podrían no ser funcionales o cuya función podría ser deletérea para la célula. Además, la vía NMD se ha
15 identificado como estando implicada en la regulación génica en la levadura, la drosófila y los mamíferos (HE *et al.*, 2003; MENDELL *et al.*, 2002; REHWINKEL *et al.*, 2005; SUREAU *et al.*, 2001; WOLLERTON *et al.*, 2004).

En las células de mamíferos, el NMD tiene lugar después del corte y empalme de los ARN pre-mensajeros y, en la mayoría de los casos, está modulado por un complejo proteico fijado 20 a 24 nucleótidos secuencia arriba de la
15 unión exón-exón (Conti and Izaurralde, 2005; Lejeune and Maquat, 2005; Maquat, 2004b). Este complejo proteico, denominado complejo de las uniones exónicas (complejo exon-unión, EJC) recluta supuestamente las proteínas conservadas UPF que tienen un papel esencial, no caracterizado hasta la fecha, en el NMD. Durante lo que se
20 denomina el "primer ciclo de traducción" (Ishigaki *et al.*, 2001), los PTC son reconocidos y los ARNm diana degradados por una digestión 5' hacia 3' que implica la retirada de la caperuza y de las exorribonucleasas tales como hXRN1 y hXRN2/hRAT1, y por una digestión 3' hacia 5' que implica una desadenilación y el exosoma (Chen y Shyu, 2003; Couttet y Grange, 2004; Lejeune *et al.*, 2003).

UPF1 es una fosfoproteína que sufre un ciclo de fosforilación/desfosforilación durante el NMD (Ohnishi *et al.*, 2003; Page *et al.*, 1999; Pal *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la UPF1 interactúa con unos factores de terminación de la
25 traducción en la levadura (Czapinski *et al.*, 1998) y en los mamíferos (Kashima *et al.*, 2006), y podría hacer la unión, por lo tanto, entre la EJC y el complejo de terminación de la traducción. Una interacción directa entre hUPF1 y la proteína de unión a la caperuza CBP80 se ha demostrado recientemente en las células de mamífero (Hosoda *et al.*, 2005), lo que indica que hUPF1 establece una interacción compleja antes o durante el primer ciclo de la traducción. Se ha demostrado que la fosforilación de hUPF1 se efectúa por hSMG1, una quinasa relacionada con PI3 (Page *et al.*, 1999; Pal *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2001), y requiere la presencia de hUPF2 y de hUPF3 (Kashima *et al.*, 2006). Por contraste, la desfosforilación de hUPF1 requiere la presencia de un complejo multi-proteico compuesto de hSMG5, hSMG6, hSMG7 y de la proteína fosfatasa (PP)-2A (Chiu *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2003). Las proteínas hSMG5 y hSMG7 están localizadas principalmente en el citoplasma, del que una fracción está presente en los
35 "processing bodies" (P-bodies) (Unterholzner y Izaurralde, 2004). hSMG6 es asimismo una proteína citoplásmica que se concentra en ciertos focos citoplásmicos que parecen distintos de los "P-bodies" y cuya naturaleza todavía no se ha determinado (Unterholzner y Izaurralde, 2004).

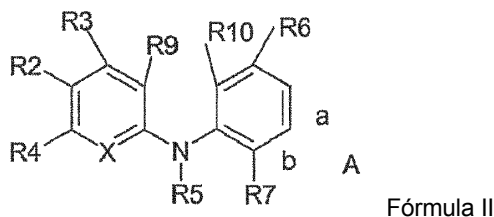
Los "P-bodies" se han descrito en las células eucariotas superiores e inferiores (Cougot *et al.*, 2004; Sheth y Parker, 2003). En los mamíferos, estas estructuras citoplásmicas contienen múltiples factores implicados en la degradación
40 de los ARNm que incluyen unos componentes de la maquinaria de retirada de la caperuza como DCP1a (Ingelfinger *et al.*, 2002), DCP2 (Ingelfinger *et al.*, 2002; van Dijk *et al.*, 2002), GE1 (Yu *et al.*, 2005) también denominado HEDLS (Fenger-Gron *et al.*, 2005), p54/RCK (Cougot *et al.*, 2004), la desadenilasa CCR4 (Cougot *et al.*, 2004), XRN1 (Bashkurov *et al.*, 1997), el complejo LSM1-7 implicado en diferentes aspectos de los procesos relacionados con el ARN (Cougot *et al.*, 2004; Ingelfinger *et al.*, 2002), y los componentes de la maquinaria NMD que son hUPF1, hSMG5 y hSMG7 (Fukuhara *et al.*, 2005; Unterholzner y Izaurralde, 2004). La función de los "P-bodies" es todavía
45 determinada, pero podría servir de compartimiento de almacenamiento para los ARNm no traducidos y para las proteínas implicadas en la degradación de los ARNm (Brenques *et al.*, 2005; Pillai *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005), y/o en el sitio de degradación de los ARN (Cougot *et al.*, 2004; Sheth y Parker, 2006).

50 En la actualidad, cerca de una tercera parte de las enfermedades genéticas humanas tendrían por origen la aparición de un codón de terminación precoz (Frischmeyer y Dietz, 1999; Kuzmiak y Maquat, 2006). En la gran mayoría de los casos, este codón de terminación provoca la degradación del ARNm que lo lleva por el mecanismo de NMD. Prosigue entonces una ausencia de la expresión del gen en cuestión, y esto incluso cuando la mutación en cuestión permitiría la traducción de una proteína truncada funcional. La inhibición del mecanismo de NMD en
55 pacientes que padecen tales patologías debería permitir restaurar la expresión de la proteína truncada funcional y constituye como tal una vía interesante.

Por el documento WO2005/023255 se conocen unos derivados de indol para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el proceso de corte y empalme. Estas moléculas tienen en particular la capacidad de inhibir los procesos de corte y empalme de los ARN pre-mensajeros.

Los inventores han puesto en evidencia que unos derivados de indol particulares eran capaces de inhibir específicamente el NMD *in vitro* e *in vivo*, y que dichos compuestos permitían aumentar el nivel de expresión del ARNm de la distrofina que presenta unos codones de terminación prematuros en unas líneas celulares de pacientes que padecen distrofia muscular de Duchenne (DMD).

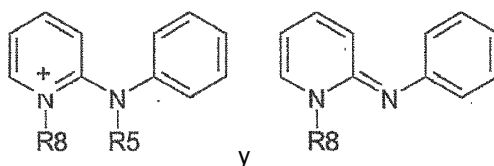
En consecuencia, un primer objeto de la invención se refiere a compuestos derivados de indol que corresponden a la fórmula II siguiente:



- 5 en la que:
- * X representa N o el anhidro base N⁺R8,
 - 10 en el que R8 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o alquilo o metoxi eventualmente sustituido con un grupo fenilo, preferentemente R8 representa un átomo de hidrógeno,
 - * R2, R3 y R4 representan independientemente, un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno o un grupo alquilo de C1-C4,
 - 15 * R5 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, saturado o insaturado,
 - * R6 representa un grupo alquilo de C1-C3, preferentemente un grupo metilo o etilo y de manera particularmente preferida R6 representa un grupo metilo,
 - 20 * R7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C3 eventualmente sustituido,
 - * R9 y R10 representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo R11, OR11 o SR11,
 - 25 en los que R11 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de oxígeno, un grupo alquilo de C1-C3 saturado o insaturado, que puede contener uno o varios átomos de azufre, de oxígeno o de nitrógeno;
 - * A representa un anillo en la posición a y que corresponde a



- 30 en la que:
- R1 representa un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno o un grupo alquilo o amina lineal o ramificado y/o insaturado,
 - 35 R13 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C4, y
 - unas sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.
 - 40 Por "átomo de halógeno" se entiende el grupo F, Cl, Br e I, y más particularmente el Cl.
 - Por "grupo alquilo insaturado" se entiende un grupo alquilo que presenta al menos un doble enlace.
 - 45 En el caso en el que X representa el anhidro base N⁺R8 y en el que R5 representa un hidrógeno, existe un equilibrio entre las dos formas siguientes:



- 50 Ventajosamente, R2, R3 y R4 representan un átomo de hidrógeno.

Preferentemente, R2, R3 y/o R4 representan independientemente los unos de los otros un átomo de halógeno seleccionado del grupo que comprende F, Cl, Br e I, preferentemente dicho átomo de halógeno es un átomo de Cl.

5 Ventajosamente, R5 representa un grupo metilo, etilo, propilo o butilo y, de manera particularmente preferida, R5 representa un átomo de hidrógeno.

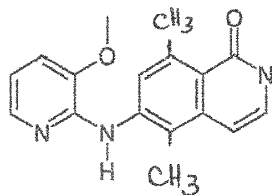
Ventajosamente, R7 representa un grupo metilo o etilo y de manera particularmente preferida R7 representa un grupo metilo.

10 Ventajosamente, R1 es un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno.

En un primer modo de realización particular, cuando R9 representa un grupo diferente de un átomo de hidrógeno, entonces R10 representa un átomo de hidrógeno.

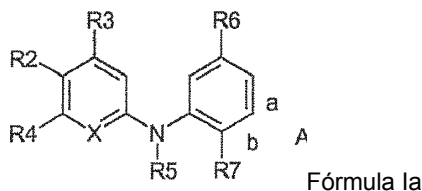
15 Ventajosamente, R9 representa un grupo OR11, en el que R11 representa un grupo metilo.

Preferentemente, el compuesto de la fórmula I responde a la fórmula siguiente:



20 En un segundo modo de realización particular, cuando R10 representa un grupo diferente de un átomo de hidrógeno, entonces R9 representa un átomo de hidrógeno.

25 Ventajosamente, R9 y R10 representan ambos un átomo de hidrógeno. El compuesto de la fórmula general II responde entonces a la fórmula siguiente:



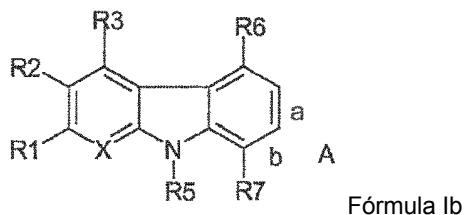
30 en la que R2, R3, R4, R5, R6, R7, X y el anillo A son tales como se han definido anteriormente, y pertenecen también a la invención.

Un compuesto preferido de fórmula Ia es la 5,8-dimetil-6-(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina.

35 Otro compuesto preferido de fórmula Ia es la 5,8-dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona.

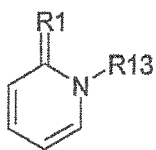
Preferentemente, R9 y R10 representan un hidrógeno y X representa N o el anhidro base N⁺R8.

40 La presente solicitud describe también los compuestos para los cuales R9 y R10 representan juntos un enlace carbono, respondiendo entonces el compuesto de la fórmula general II a la fórmula Ib siguiente:



45 en la que R2, R3, R4, R5, R6, R7, X y el anillo A son tales como se han definido anteriormente.

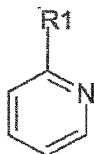
Ventajosamente, el anillo A representa el grupo:



en el que R1 representa un oxígeno, una amina, o un grupo alquilo lineal o ramificado y/o insaturado, y R13 representa un grupo alquilo de C1-C4 eventualmente sustituido.

5

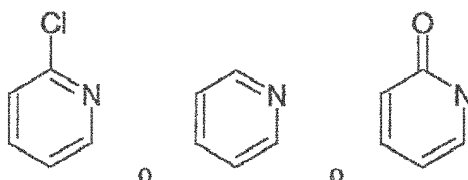
Más ventajosamente, el anillo A representa el grupo:



10 en el que R1 representa un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno o un grupo alquilo o amina lineal o ramificado y/o insaturado, preferentemente un átomo de hidrógeno o un halógeno, preferentemente un átomo de cloro.

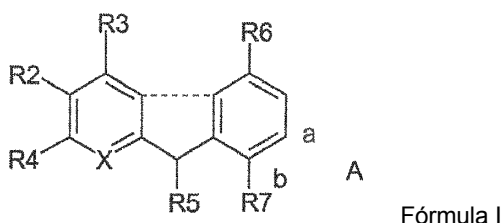
15

En otro modo de realización preferido, A se selecciona del grupo que comprende:



La presente invención describe también los compuestos derivados de indol de la fórmula II, que responden a la fórmula I siguiente:

20



Fórmula I

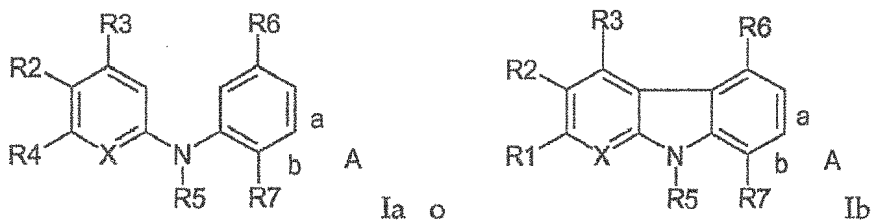
en la que R2, R3, R4, R5, R6, R7, X y el anillo A son tales como se han definido anteriormente;

25 X, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y el anillo A son tales como se han definido anteriormente;

y/o sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

30

Se entiende por la fórmula I, unos compuestos de fórmula:



Entre los compuestos derivados de indol, se citan:

35 * 6-Cloro-5, 10-dimetil-11H-pirido[3',2']:4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina (compuesto 70);

* 5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina (compuesto 71);

* 5,8-Dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona; (compuesto 72),

* 8-dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-isoquinolin-1-ona (compuesto 497); y

5 * 5,8-dimetil-6(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina (compuesto 500)

Preferentemente, el compuesto derivado de indol se selecciona del grupo constituido de la 5,8-dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona, de la 5,8-dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-isoquinolin-1-ona y de la 5,8-dimetil-6-(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina.

10 Ventajosamente, el compuesto derivado de indol es la 5,8-Dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona.

Un segundo objeto de la invención consiste en una composición farmacéutica que comprende al menos un derivado de indol tal como se ha descrito anteriormente y, eventualmente, un soporte farmacéuticamente aceptable.

15 A título de ejemplo de soporte farmacéuticamente aceptable, la composición puede comprender unas emulsiones, unas microemulsiones de aceite en agua, unos lípidos anhidros y unas emulsiones de agua en aceite, u otros tipos de emulsiones.

20 La composición según la invención puede comprender además uno o varios aditivos tales como los diluyentes, los excipientes, los estabilizadores y los conservantes. Tales aditivos son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en particular en "Ullmann's Enciclopedia of Industrial Chemistry, 6ª edición" (diferentes editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y en "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System" (ANSEL *et al.*, 1994, WILLIAMS & WILKINS).

25 La presente invención describe la utilización de al menos un derivado de indol tal como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento destinado a tratar, en un sujeto, una enfermedad genética que resulta de al menos una mutación que conlleva la aparición de un codón de terminación precoz.

30 Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "sujeto" corresponde a un mamífero tal como un roedor, un felino, un canino, un primate o un humano, preferentemente dicho sujeto es un humano.

Tales enfermedades genéticas que resultan de al menos una mutación que conlleva la aparición de un codón de terminación precoz son bien conocidas y representarían cerca de la tercera parte de las enfermedades genéticas actualmente. A título de ejemplo de tales enfermedades genéticas, se puede citar la β -talasemia, el síndrome de Marfan, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la distrofia muscular de Becker (BMD), la enfermedad de Ulrich, el síndrome de Hurler o la fibrosis quística (CF), más conocida bajo el nombre de mucoviscidosis, y para unos pacientes que presentan un codón de terminación precoz en el gen implicado en dichas enfermedades genéticas.

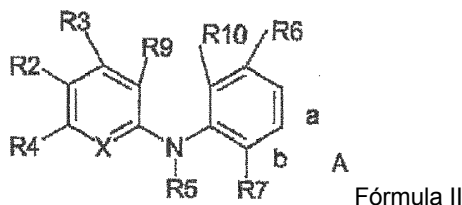
40 Preferentemente, dicha mutación permite a pesar de todo obtener una proteína truncada funcional.

Los compuestos según la invención tienen en efecto la capacidad de inhibir el mecanismo de NMD y permitir la traducción de ARNm que presenta unos codones de terminación precoz.

45 Por proteína funcional, se entiende una proteína que permite restaurar un fenotipo salvaje.

Ventajosamente, se entiende por "proteína funcional" una proteína que presenta una actividad suficiente con respecto a la proteína salvaje para asegurar la misma función que esta última y que permite obtener un fenotipo salvaje.

50 Un tercer objeto de la invención consiste en la utilización de un compuesto derivado de indol que corresponde a la fórmula II siguiente:



55 en la que:

- X representa N, CR8 o el anhidro base N⁺R8,

en el que R8 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o alquilo o metoxi eventualmente sustituido con un grupo fenilo, preferentemente R8 representa un átomo de hidrógeno,

- R2, R3 y R4 representan independientemente un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno o un grupo alquilo de C1-C4,

- R5 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, saturado o insaturado,

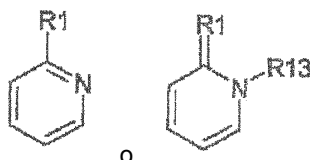
- R6 representa un grupo alquilo de C1-C3, preferentemente un grupo metilo o etilo y de manera particularmente preferida R6 representa un grupo metilo,

- R7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C3,

- R9 y R10 representan juntos un enlace carbono o representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo R11, OR11 o SR11,

en los que R11 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de oxígeno, un grupo alquilo de C1-C3 saturado o insaturado, que puede contener uno o varios átomos de azufre, de oxígeno o de nitrógeno,

- A representa un anillo en la posición a y que corresponde a



en las que:

- R1 representa un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno o un grupo alquilo o amina lineal o ramificado y/o insaturado,

- R13 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C4, y/o unas sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos,

para su utilización para tratar, en un sujeto, una enfermedad genética seleccionada del grupo que comprende la β -talasemia, el síndrome de Marfan, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la distrofia muscular de Becker (BMD), la enfermedad de Ullrich, el síndrome de Hurler y la fibrosis quística (CF).

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de un compuesto de fórmula II tal como ha definido anteriormente, caracterizada por que dicho compuesto se selecciona del grupo que comprende:

* 6-Cloro-5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina;

* 5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina;

* 5,8-Dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona;

* 5,8-Dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-isoquinolin-1-ona; y

* 5,8-dimetil-6-(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina.

La invención describe asimismo un método de tratamiento terapéutico de un sujeto para una enfermedad genética que resulta de al menos una mutación que conlleva la aparición de un codón de terminación precoz que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, tal como se ha descrito anteriormente.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que permite inducir la inhibición de NMD. El experto en la materia será capaz de determinar dicha cantidad terapéuticamente eficaz a la luz de sus conocimientos generales y métodos descritos en los ejemplos.

Los compuestos podrán ser administrados mediante cualquier método de administración como, por ejemplo, por vía intramuscular, intravenosa, oral, etc.

Los ejemplos siguientes se dan a título de ilustración y no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos:

I-MATERIAL Y MÉTODOS

5

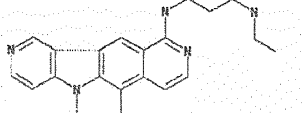
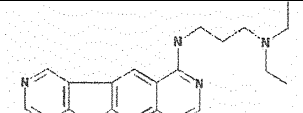
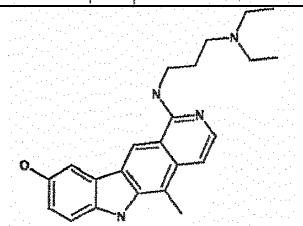
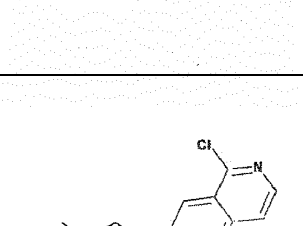
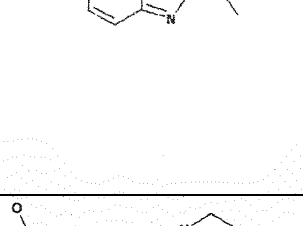
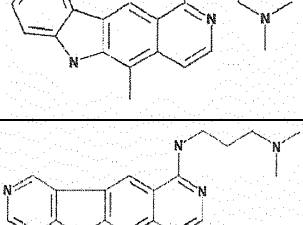
I-1 Compuestos indoles

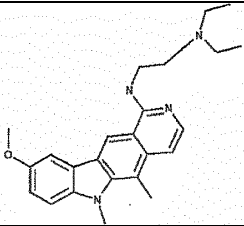
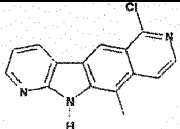
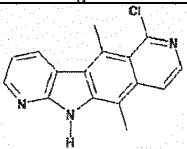
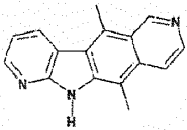
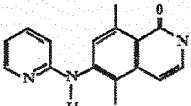
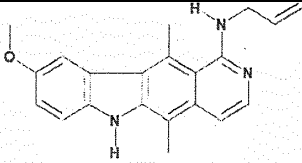
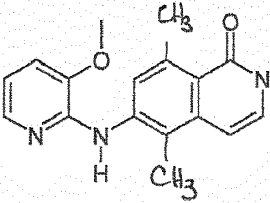
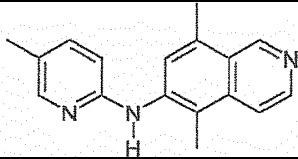
Todos los compuestos indoles policíclicos utilizados se suspendieron en DMSO a 20 mg/ml, y después se prepararon con una dilución 5 mM en 10% DMSO (v/v).

10

Los compuestos ensayados se presentan en la tabla I siguiente:

Tabla I

Compuestos	Fórmula	Nomenclatura
13 fuera de la invención		N-(5,6-Dimetil-5H-pirido[3',4':4,5]pirrolo[2,3-g]isoquinolin-10-il)-N'-etil-propano-1,3-diamina
15 fuera de la invención		N'-(5,6-Dimetil-5H-pirido[3',4':4,5]pirrolo[2,3-g]isoquinolin-10-il)-N,N-dietil-propano-1,3-diamina
17 fuera de la invención		1-(3-Dietilamino-propilamino)-5-metil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-9-ol
29 fuera de la invención		10-Cloro-2,6-dimetil-2H-pirido[3',4':4,5]pirrolo[2,3-g]isoquinolina
35 fuera de la invención		1-(3-Dimetilamino-propilamino)-5-metil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-9-ol
fuera de la invención 37		N'-(5,6-Dimetil-5H-pirido[3',4':4,5]pirrolo[2,3-g]isoquinolin-10-il)-N,N-dimetil-propano-1,3-diamina

Compuestos	Fórmula	Nomenclatura
39 fuera de la invención		N,N-Dietil-N'-(9-metoxi-5,6-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-1-il)-etano-1,2-diamina
67 fuera de la invención		6-Cloro-10-metil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina
70 invención		6-Cloro-5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina
71 invención		5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina
72 invención		5,8-Dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona
81 fuera de la invención		Allil-(9-metoxi-5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-b]carbazol-1-il)-amina
497 invención		5,8-dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-isoquinolin-1-ona
500 invención		5,8-dimetil-6-(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina

I-3 Síntesis de los compuestos según la presente invención

5 La síntesis de los compuestos 17, 35 y 39 se describe en la publicación siguiente: RIVALLE *et al.*, J. Med. Cem. 1983, 26, 181-185.

El compuesto 81 se obtiene mediante el mismo procedimiento general que los compuestos 17, 35 y 39, a partir del

compuesto descrito como 8a en la publicación y allamina.

La síntesis de los compuestos 67, 70 y 71 se describe en RIVALLE *et al.*, Tetrahedron 1981; 37, 2097-2103

5 La síntesis de los compuestos 13, 15 y 37 se describe en BISAGNI *et al.* Heterocycles 1988, 27, 1671-1678.

10 El compuesto 29 se obtiene mediante el procedimiento de síntesis siguiente: el compuesto descrito en la publicación de RIVALLE *et al.*, (J. Med. Chem. 1983, 26, 181-185) se pone en suspensión en DMF. Se añade un exceso de yoduro de metilo (10 eq.). El medio de reacción se calienta a 80°C durante 1h y después se enfría hasta temperatura ambiente. Se añade una solución de N₂CO₃ 2M y el medio de reacción se lleva a 80°C durante 18h. El producto se extrae mediante diclorometano.

Los compuestos 72, 497 y 500 se obtienen mediante el procedimiento de síntesis siguiente:

15 La bromopiridina (1 equivalente) y la amina (1 equivalente) adecuadas se colocan en *tert*-butanol en presencia de 2 mol% de Pd(OAc)₂ del 3,5 mol% de Xantphos y de 2,4 equivalentes de Cs₂CO₃. El medio de reacción se lleva a 90°C durante 48 horas y después se filtra sobre celita y se purifica sobre columna de sílice ((C₂Cl₂/ EtOH 95:5).

20 Para la síntesis del compuesto 72, se utilizan la 2-bromopiridina y la 6-amino-5,8-dimetil-2H-isoquinolin-1-ona como amina. Esta amina está descrita en DUCROCQ *et al.* (Tetrahedron 1979, 35, 142).

Para la síntesis del compuesto 497 se utilizan la 2-bromo-3-metoxipiridina y la 6-amino-5,8-dimetil-2H-isoquinolin-1-ona como amina.

25 Para la síntesis del compuesto 500, se utilizan la 2-bromo-5-metilpiridina y la 5,8-dimetil-isoquinolin-6-ilamina como amina. Esta amina está descrita en BALKAN *et al.* (Australian Journal of Chemistry 1969, 22, 2489).

I-3 Construcciones

30 Las construcciones β-globina Norm y Ter se han obtenido mediante amplificación por PCR de las construcciones β-globina WT y NS39 (Thermann *et al.*, 1998) utilizando el cebador sentido 5'GCAACCTCAAGCTTACACCATGGTGCACCTGAC3' (SEQ ID n° 1) y el cebador antisentido 5'AGAAAGCAGATCTGCTTAGTGATACTTGTG3' (SEQ ID n° 2). Los fragmentos amplificados se han clonado en las posiciones HindIII/BglII de un plásmido pRSVbgal modificado que comprende 24 sitios MS2 (Fusco *et al.*, 2003).

35 I-4 Medición NMD por RT-PCR

Las células HeLa se han cultivado en cajas de 60 mm en un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO-BRL) suplementado con el 10% (v/v) de suero fetal de ternera a 37°C y 5% CO₂. Las células (1 x 10⁶) se transfectoron entonces con 3μg de plásmidos ensayos pmCMV-GI (Norm o 39Ter)(Sun *et al.*, 1998) o 3 μg de plásmidos ensayos pmCMV-GPx1 (Norm o 46Ter)(Moriarti *et al.*, 1998) y de 1 μg de plásmido de referencia phCMV-MUP (Belgrader y Maquat, 1994) utilizando el kit LIPOFECTAMINA PLUS REAGENT (INVITROGEN) según las instrucciones del fabricante. Se trataron las células, 24 horas después de la transfección, durante 20 horas con 5 μM de cada uno de los compuestos a ensayar o con DMSO 0,01% (v/v) como control. El ARN se ha amplificado utilizando TRI Reagent (SIGMA-ALDRIC) según las instrucciones del fabricante, después se ha efectuado una transcripción inversa de los ARNm GI, GPx1 y MUP antes de una amplificación por PCR en presencia de nucleótido dCTP radiomarcado al ³²P. Las condiciones de PCR y el método de análisis se han descrito anteriormente (Ishigaki *et al.*, 2001). Los productos de PCR se han cuantificado sobre Tiphon 9200 (Amersham Biosciences).

50 I-5 Ensayo de eficacia de traducción

Las células HeLa se transfectoron con 2 μg de plásmido pFluc y 1 μg de plásmido pRluc. 24 horas después, de la transfección, las células se incubaron en presencia de DMSO 0,01% (v/v), o de diferentes compuestos a ensayar (5 μM) durante 20 horas o de 100 μg/ml de cicloheximida durante 4 horas antes de recoger las células. La actividad luciferasa se cuantificó sobre el equivalente de 2x10⁵ células sobre un microLumat LB 96P (EG&G Bertold) utilizando el kit Dual Glo Luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante. La actividad luciferasa se normalizó después frente al nivel de ARNm Fluc y Rluc.

60 I-6 Actividad luciferasa para medir la integridad de la vía de degradación siRNA en presencia de los compuestos inhibidores de NMD

Las células se cultivan en placas de 6 pocillos y se transfectan utilizando el kit Lipofectamina Plus reagent (Invitrogen) con 50ng de ARN reportador RLperfect (Pillai *et al.*, 2005), 200 ng de plásmido pG13 que codifica para la 'Firefly luciferasa' y 4 μg de plásmido pTzU6. 24 horas después de la transfección, los compuestos a ensayar se

añadieron a los pocillos correspondientes. 48 horas después de la transfección, se midió la actividad luciferasa con el kit Dual Glo Luciferasa (Promega) según las instrucciones del fabricante.

I-7 Medición del nivel de fosforilación de FLAG-hUPF 1 por análisis del gel 2D

Se transfectaron unas células 293T (10^6) con $1\mu\text{g}$ de plásmido *pFLAG-hUpf1* (Sun y *al.*, 1998) utilizando el kit Lipofectamina Plus Reagent (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 12 horas, el suero se retiró del medio de cultivo durante 24 horas antes de añadir $5\mu\text{M}$ de compuestos a ensayar o, como control, de DMSO al 10% (v/v) durante 3 horas a 37°C y el 5% de CO_2 . Entonces, se añade el 10% de suero de nuevo durante 1 hora a 37°C y 5% el CO_2 . Las proteínas totales se purificaron con un tampón de lisis que comprende 8M urea, un 2% CAPS y 40mM Tris base. La migración en la primera dimensión se efectuó según el protocolo descrito por AMERSHAM-BIOSCIENCES para la electroforesis en 2D con un pH Gradiente inmovilizado. Se utilizó la Immobiline™ DriStrip pH 3-10 (18 cm) para separar las proteínas según su punto isoeléctrico. Entonces, se efectuó la segunda dimensión cargando la primera dimensión en un gel SDS-PAGE al 10%. Finalmente, las proteínas se transfieren en una membrana de nitrocelulosa antes de su incubación con un anticuerpo anti-FLAG (SIGMA-ALDRIC) en TBS que contiene el 0,05% TWEEN durante una noche a 4°C , seguida de una incubación con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (PIERCE). Las proteínas se detectan entonces utilizando el sustrato "SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate" (PIERCE).

I-8 Determinación de la etapa de bloqueo de NMD

Este experimento se realiza como se ha descrito anteriormente (Hosoda *et al.*, 2005).

I-9 Inmunofluorescencia, ensayo FISH y análisis de imagen

Unas células HeLa se han cultivado en láminas de vidrio de 12 mm en DMEM al 10% (v/v) FBS. Las células (10^5) se transfectaron de manera transitoria con 500 ng de plásmidos pGFP-GE1 (Iu *et al.*, 2005), pYFP-hSmg5, pYFP-hSmg6, YFP-hSmg7 (Unterholzner y Izaurralde, 2004), pGFP-CCR4, pCFP-DCP1a (Cougot *et al.*, 2004), pCI-neo-FLAG-hUpf1 (Sun *et al.*, 1998), pcDNA3-hUpf3a-FLAG, pcDNA3-hUpf3b-FLAG (Likke-Andersen *et al.*, 2000), pmCMV-GI (Norm o 39Ter) (Sun *et al.*, 1998) o pmCMV-GPx1 (Norm o 46Ter) (Moriarti *et al.*, 1998). 24 horas después de la transfección, las células se tratan con $5\mu\text{M}$ de compuestos a ensayar o de DMSO al 0,001% (v/v) como control. Después de 20 horas, las células se fijaron utilizando una solución de formalina (SIGMA-ALDRIC) durante 10 min. a temperatura ambiente y permeabilizadas con una solución de etanol al 70% durante una noche a 4°C .

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células fijadas se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-FLAG (SIGMA-ALDRIC) durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron tres veces en PBS y después se incubaron con un anticuerpo de ratón conjugado con Cy3 o con FITC (JACKSON IMMUNORESEARCH) durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron tres veces en PBS antes de ser incubadas en Hoechst (2 ng/ μl) (SIGMA-ALDRIC) durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Para los experimentos de FISH, las células fijadas se incubaron en un tampón de pre-hibridación (ARNt 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ADN de arenque 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BSA 1 mg/ml, dextran sulfato 0,1 g/ml, el 50% formamida, 2X tampón SSC) a 37°C durante 1 hora en un incubador de cultivo de tejido. Después, las células fijadas se incuban durante la noche en un incubador de cultivo de tejido con el tampón de hibridación (tampón de prehibridación con sondas marcadas con Cy3), se lavan tres veces en un tampón 2X SSC a 37°C , tres veces en un tampón 1X SSC a temperatura ambiente y finalmente se incuban con Hoechst (2ng/ μl) (SIGMA-ALDRIC) durante dos minutos a temperatura ambiente. La sonda 5'CGATCTGCGTTCTACGGTGGT3' (SEQ ID nº 3) marcada con Cy3 en los extremos 5' y 3' se ha utilizado para detectar los ARNm G1 Ter o GPX1 Ter.

Las células fijadas se observaron con un microscopio DMRA (Leica), un objetivo de aceite PL APO 63x (NA 1.32) con unos filtros A4 (para hoechst), GFP y Y3 (para Cy3).

I-10 Inmunopurificación y análisis por transferencia Western

La inmunopurificación de hUPF1 y el análisis por transferencia Western se efectuaron según un protocolo descrito anteriormente (Lejeune y Maquat, 2004) utilizando un anticuerpo anti-hUPF1 (Ohnishi *et al.*, 2003). Los análisis por transferencia Western se realizaron utilizando una dilución al 1/250 de anticuerpo de conejo anti-hUPF1, anti-hSMG5, anti-hSMG6 o anti-hSMG7 (Ohnishi *et al.*, 2003), una dilución al 1/1000 de anticuerpos de conejo anti-hUPF3/3X (Ishigaki *et al.*, 2001) o de anticuerpos de ratón anti-TUBULIN (SIGMA-ALDRIC). Las proteínas se detectaron utilizando el sustrato «SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate» o «SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate» (PIERCE).

II-RESULTADOS

II-1 Identificación de nuevos inhibidores de NMD:

Se han transfectado unas células Hela mediante dos plásmidos ensayos que codifican para los ARN de la β -globina (G1) y de la glutatona peroxidasa 1 (GPx1), y que presentan un codón de terminación prematura (Ter) o no (Norm). El ARNm G1 está sujeto a un NMD asociado al núcleo en las células no eritroides (Termann *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998) mientras que el ARNm GPx1 está sujeto a un NMD citoplásmico (Moriarti *et al.*, 1998). Además, un plásmido de referencia que codifica para el ARNm de una proteína urinaria principal (MUP) también se ha introducido en las células (Ishigaki *et al.*, 2001).

24 horas después de la transfección, las células se incuban durante 20 horas con DMSO(-) como control, o con 5 μ M de los compuestos indoles presentes en la tabla I. Después de 20 horas, los ARN totales se purificaron finalmente y se analizaron por RT-PCR.

Los resultados para los diferentes compuestos ensayados se resumen en la tabla II.

Tabla II

Compuestos	Estabilización del ARNm G1 Ter	Estabilización del ARNm GPx1 Ter
13	-	-
15	-	-
17	-	-
29	-	-
35	-	-
37	-	-
39	-	-
70	+++	++
71	+++	++
72	+++	++
81	-	-
497	+++	++
500	+++	++

Los resultados han mostrado que, entre los 30 compuestos ensayados, cinco de ellos permiten estabilizar tanto el nivel de ARNm G1 Ter como de GPx1 Ter y esto de manera dosis dependiente. Este resultado se ha podido confirmar mediante la técnica de RPA. Estos resultados permiten concluir que los compuestos 70, 71, 72, 497 y 500 constituyen unos inhibidores del NMD y esto tanto a nivel nuclear como citoplásmico. Cabe señalar que el nivel de inhibición observado para estos compuestos era similar a los obtenidos con otros inhibidores de NMD tales como la cicloheximida o la inactivación por siRNA de la expresión de los genes que codifican para hDCP2 o hPARN (Ishigaki *et al.*, 2001; Lejeune *et al.*, 2003) y que estos compuestos no mostraban ninguna toxicidad celular en las condiciones experimentales (concentración máxima ensayada de 125 μ M).

A este nivel, la especificidad de los compuestos identificados se ha ensayado en diferentes sistemas (ausencia de inhibición del corte y empalme, ausencia de la inhibición de la traducción y ausencia de formación de gránulos de estrés) y ha permitido poner en evidencia que estos compuestos constituyen nuevos inhibidores específicos de NMD.

II-2 Inhibición del NMD secuencia arriba de hUPF1:

Con el objetivo de identificar el modo de inhibición de los compuestos identificados, dichos compuestos se han ensayado en un sistema que mimetiza el reclutamiento secuencial de los factores de NMD en un ARNm (Kim *et al.*, 2005; Likke-Andersen *et al.*, 2000). Para ello, se han transfectado unas células con dos tipos de construcciones de las cuales una codificaba para el ARNm de la *Firefly Luciferasa (Fluc)* mRNA que contiene 8 sitios de unión para la proteína MS2 sobre su 3'UTR, y la segunda codificaba bien para la proteína MS2, o bien para una de las proteínas de fusión siguiente: MS2-hUPF1, MS2-hUPF2 o MS2-hUPF3X. Además, las células HeLa también se transfectaron con una construcción que codifica para el ARNm de la *Renilla Luiferasa (Rluc)* a fin de normalizar el nivel de ARN analizado.

Las células se incubaron después durante 20 horas con el compuesto 70 o DMSO (-) como control negativo. El nivel

de los ARNm *Rluc* y *Fluc* se midió entonces como se ha descrito anteriormente (Hosoda *et al.*, 2005). A título de control, la expresión de cada una de las proteínas de fusión MS2 se ha determinado por transferencia Western.

Los resultados han mostrado que, en cada caso, el compuesto 70 no afectaba el nivel de expresión de las proteínas de fusión MS2, el cual nunca era superior al nivel de expresión de las proteínas endógenas. Como se espera y en presencia de DMSO, el nivel de expresión de los ARNm *Fluc* era inferior en las células que expresan una de las proteínas de fusión MS2-hUPF fusión con respecto a las células que expresan únicamente MS2. Sin embargo, los resultados han revelado que el compuesto 70 interfiere con la degradación inducida por MS2-hUPF2 o MS2-hUPF3X, pero no tiene efecto sobre la degradación inducida por MS2-hUPF1. Cabe señalar que la relación de los ARNm *FLuc/RLuc* y el nivel de inhibición inducido por el compuesto 70 son muy similares a los observados en respuesta a una inactivación por siRNA de la expresión del gen que codifica para hCBP80 (Hosoda *et al.*, 2005).

Finalmente, los resultados indican que la inhibición del NMD por el compuesto 70 secuencia abajo del reclutamiento de hUPF3X o de hUPF2 y secuencia abajo de las funciones de hUPF1.

II-3 El compuesto 70 no previene la interacción entre hUPF1 y hUPF3X:

Frente a los resultados anteriores, se ha considerado que el compuesto 70 podía prevenir el reclutamiento de hUPF1 a EJC por medio de su interacción con otras proteínas hUPF. Con ese objetivo, la proteína hUPF1 se ha inmunoprecipitado a partir de extractos de células HeLa en condiciones que preservan la integridad de los mRNP (Lejeune and Maquat, 2004).

El compuesto 70 o DMSO (-) se añadió a los cultivos de células 20 horas antes de la inmunoprecipitación (IP). En la medida en la que se ha demostrado que la proteína hUPF2 no era esencial en algunos casos de NMD (Gehring *et al.*, 2005), el análisis se focalizó en presencia de la proteína hUPF3X en cada inmunoprecipitación. Como control de especificidad, se ha demostrado la ausencia de proteína tubulina en cada una de las inmunoprecipitaciones y se ha realizado una inmunoprecipitación no específica con suero de conejo normal en la que no se ha detectado ninguna proteína.

Los resultados han mostrado que la proteína hUPF3X estaba presente en las inmunoprecipitaciones de hUPF1 incluso cuando las células estaban previamente incubadas con el compuesto 70.

En consecuencia, la interacción entre hUPF1 y hUPF3X no es suprimida por el compuesto 70, lo que sugiere que este compuesto no inhibe el reclutamiento de hUPF1 a EJC.

II-4 El compuesto 70 estabiliza las formas hiperfosforiladas de hUPF1:

En la medida en la que hUPF1 requiere un ciclo de fosforilación y de desfosforilación durante el NMD (Ohnishi *et al.*, 2003), se ha ensayado el nivel de fosforilación en respuesta a la presencia del compuesto 70. Para ese fin, el nivel de fosforilación de hUPF1 se ha detectado en células incubadas con el compuesto 70 o con DMSO (-) por un análisis en gel 2D. En la medida en la que la fosforilación de hUPF1 está influenciada por el suero (Pal *et al.*, 2001), se han utilizado unas células 293T en lugar de HeLa debido a su capacidad para bloquear su división celular en la misma etapa del ciclo celular en ausencia de suero. Las células se han transfectado por el vector de expresión pCIneo-FLAG-hUpfl (Sun *et al.*, 1998), sincronizados en ausencia de suero 12 horas después de la transfección durante 24 horas. Finalmente, se ha añadido DMSO o 5 μ m del compuesto 70 durante 3 horas antes de añadir suero durante una hora.

Los resultados han mostrado que, sin adición de suero, la proteína FLAG-hUPF1 migra formando sólo un punto que corresponde a la proteína no fosforilada (Pal *et al.*, 2001). Después de la adición de suero, se observa una fosforilación intermedia de la proteína FLAG-hUPF1 cuando las células se han incubado con DMSO y la estabilización de isoformas fosforiladas suplementarias de FLAG-hUPF1 cuando las células se han incubado con el compuesto 70.

En consecuencia, el compuesto 70 permite por lo tanto estabilizar unas isoformas hiperfosforiladas de la proteína hUPF1.

En la medida en la que se ha propuesto que la proteína hUPF1 se localizaría a nivel de los "P-bodies" cuando está hiperfosforilada (Unterholzner y Izaurralde, 2004), se ha ensayado la localización celular de la proteína GLAF-hUPF1 en células HeLa en presencia y en ausencia del compuesto 70.

Los resultados muestran que la proteína hUPF1 exógena está distribuida de manera igual en el citoplasma cuando las células se han incubado con DMSO, como se ha demostrado anteriormente para unas células no tratadas (Mendell *et al.*, 2002), salvo en experimentos de coexpresión con la proteína hSMG7, la cual induce el reclutamiento de la proteína hUPF1 a nivel de los "P-bodies" (Unterholzner y Izaurralde, 2004). Sin embargo, y cuando las células se han tratado previamente con el compuesto 70, se observan unas concentraciones citoplásmicas de FLAG-hUPF1 en unas estructuras que colocalizan con GFP-GE1, YFP-hSMG7 o CFP-hDCP1a, los cuales constituyen unos

marcadores comunes de los "P-bodies".

En consecuencia, el compuesto 70 induce la acumulación de las isoformas hiperfosforiladas de hUPF1 a nivel de los "P-bodies", bien por la estimulación de la fosforilación, o bien por la inhibición de la desfosforilación.

5 A fin de determinar cual de estos dos mecanismos sería inducido por los compuestos identificados, se ha efectuado un análisis complementario de los inmunoprecipitados de la proteína hUPF1 a partir de células HeLa incubadas o no en presencia del compuesto 70.

10 En una primera fase, se ha efectuado el análisis de hUPF1 con su complejo de desfosforilación. Los resultados han mostrado que hSMG5, hSMG6 y hSMG7 pueden ser detectados en las células tratadas con el DMSO, pero que hSMG5 era, no obstante, indetectable cuando las células HeLa se incubaban previamente con el compuesto 70.

15 En consecuencia, los resultados muestran que el compuesto 70 desestabiliza la interacción entre hUPF1 y hSMG5. Finalmente, la presencia de hSMG1 y de hUPF3X en las inmunoprecipitaciones efectuadas sobre las células incubadas o no con el compuesto 70 sugiere en gran medida que los compuestos identificados no tienen influencia sobre la interacción entre hUPF1 y su complejo de fosforilación (figura 3A). Los resultados obtenidos abogan por el hecho de que el estado de hiperfosforilación de hUPF1 observado estaría relacionado con un defecto de desfosforilación, debido a la ausencia de interacción entre hUPF1 y hSMG5, más que para una activación de la fosforilación. Esta conclusión está finalmente en acuerdo con la identificación de hSMG5 como componente esencial para la desfosforilación de hUPF1 (Ohnishi *et al.*, 2003).

II-5 hSMG5 está excluido de los "P-bodies" en presencia del compuesto 70:

25 Se sabe que hSMG5 y hSMG7 están localizados en el citoplasma y más específicamente a nivel de los "P-bodies" (Unterholzner y Izaurralde, 2004).

30 Se han transfectado unas células HeLa con los vectores de expresión que codifican para YFP-hSMG5, YFP-hSMG6 o YFP-hSMG7 (Unterholzner y Izaurralde, 2004) y CFP-hDCP1a como marcador de los "P-bodies". Después de 24 horas, las células se incubaron en presencia de DMSO o de 5 μ M del compuesto 70.

35 Como se ha demostrado anteriormente, en ausencia de los inhibidores, YFP-hSMG5, YFP-hSMG6 e YFP-hSMG7 están concentrados en los foci citoplásmicos (Fukuhara *et al.*, 2005; Unterholzner y Izaurralde, 2004), foci que se han identificado como principalmente unos "P-bodies" cuando CFP-DCP1a se utiliza como marcador de los "P-bodies".

40 En presencia del compuesto 70, los foci citoplásmicos que contienen YFP-hSMG6 o YFP-hSMG7 colocalizan con el marcador de los "P-bodies" CFP-DCP1a. Sin embargo, hSMG5 no se observa ya en los foci citoplásmicos, pero presenta una amplia distribución citoplásmica en las células tratadas con el compuesto 70.

45 En la medida en la que se ha demostrado que el compuesto 70 inhibe el NMD e induce la concentración de hUPF1 en los P-bodies, como se demuestra con la proteína hUPF1 exógena o endógena, se ha ensayado la localización de las tres proteínas hSMG endógenas a nivel de los foci citoplásmicos. Esta localización no se había observado nunca debido a una expresión demasiado baja de estas proteínas. Tratando las células con el compuesto 70, era previsible obtener una estabilización de estos factores dentro de los P-bodies.

50 Los resultados han mostrado que las proteínas endógenas no son detectadas a nivel de los foci citoplásmicos para las células tratadas con el DMSO. Por el contrario, y cuando las células se incuban con el compuesto 70, los resultados muestran una concentración de las proteínas hSMG6 y hSMG7 a nivel de los "P-bodies" mientras que hSMG5 no es detectado a nivel de los foci citoplásmicos, lo que confirma los resultados obtenidos con las proteínas exógenas.

55 Finalmente, los resultados muestran que el compuesto 70 modifica la localización celular de hSMG5 excluyendo los "P-bodies". Esta observación es consistente con la pérdida de interacción entre UPF1 y SMG5 cuando las células son incubadas con el compuesto 70.

II-6 hUPF3 y hUPF3X localizan a nivel de los "P-bodies" cuando el NMD está bloqueado por el compuesto 70

60 Ya que algunos factores del NMD, como hUPF1, hSMG5, hSMG6 o hSMG7 se localizan a nivel de los "P-bodies" (Unterholzner y Izaurralde, 2004), se ha considerado que otros factores de NMD puedan pasar en los "P-bodies" de manera transitoria al menos. Como el compuesto 70 bloquea el NMD a una etapa en la que hUPF1 está confinado a nivel de los "P-bodies", se ha ensayado la localización celular de hUPF3 y de hUPF3X en las células tratadas y no tratadas. Se ha demostrado que estas dos proteínas son principalmente unas proteínas nucleares en las células no tratadas (Serin *et al.*, 2001).

65 Unas células HeLa se transfectaron con unos vectores de expresión que codifican para hUPF3-FLAG o hUPF3X-FLAG, y con uno de los marcadores de "P-bodies" siguiente: YFP-hSMG6, YFP-hSMG7, GFP-GE1 y CFP-hDCP1a.

Las células se han tratado con DMSO o el compuesto 70 antes de realizar unos experimentos de inmunofluorescencia. Como para las células no tratadas (Serin *et al.*, 2001), hUPF3 o hUPF3X se localizan esencialmente a nivel del núcleo cuando las células son incubadas con DMSO (-). Por el contrario, y después de la incubación de las células en presencia del compuesto 70, los resultados han mostrado una localización citoplásmica de hUPF3 y de hUPF3X con acumulaciones en foci, que corresponde a unos "P-bodies".

II-7 los ARNm que contienen PTC se acumulan en los "P-bodies" en presencia del compuesto 70:

En la medida en la que los factores del NMD se acumulan a nivel de los "P-bodies" en presencia del compuesto 70, se ha estudiado la localización de los sustratos de NMD. En la levadura, en efecto, se ha puesto en evidencia recientemente que cuando los factores de NMD se acumulaban en los "P-bodies", los ARNm que contienen unas PTC se acumulaban también en los "P-bodies" cuando el NMD estaba bloqueado (Shet and Parker, 2006).

Unas células HeLa se transfectaron con los vectores pmCMV-GI Ter o pmCMV-GPx1 Ter, y la localización de los ARNm resultante se analizó con los marcadores de "P-bodies" siguientes: GFP-GE1, YFP-hSMG6, YFP-hSMG7, CFP-hDCP1a, GFP-hCCR4, FLAG-hUPF1, hUPF3-FLAG y hUPF3X-FLAG.

Los resultados han mostrado que en ausencia de inhibidores, no se ha podido detectar ningún ARNm que contiene PTC, probablemente debido a su degradación rápida por el NMD. Por el contrario, y después del tratamiento con el compuesto 70, los ARNm que contienen unos PTC son estabilizados y detectados esencialmente a nivel de agregados citoplásmicos que co-localizan con cada una de las proteínas de fusión de hUPF ensayadas.

Finalmente, los resultados han mostrado que los ARNm que contienen unas PTC estaban presentes en los "P-bodies" o adyacentes a estos últimos cuando el NMD estaba inhibido por el compuesto 70.

La acumulación de los ARNm que contienen unos PTC a nivel de los "P-bodies" cuando el NMD está bloqueado en unas células de mamífero también se ha confirmado mediante un enfoque más resolutivo. En este último, los ARNm están marcados con 24 repeticiones MS2, lo que permite la detección de moléculas de ARNm únicas por hibridación *in situ* (Fusco *et al.*, 2003).

Los resultados han mostrado que, en las células control, los ARN que contienen unas PTC son detectados esencialmente a nivel del núcleo, y las moléculas citoplásmicas detectadas no se acumulan a nivel de los "P-bodies". Cuando el NMD está inhibido por el compuesto 70, los resultados han mostrado una acumulación de los ARNm que contienen unos PTC a nivel del citoplasma y, más específicamente, en unas estructuras que co-localizan con los "P-bodies".

En consecuencia, estos resultados confirman que los ARNm sujetos a NMD se acumulan a nivel de los "P-bodies" cuando la degradación está inhibida, y esta conclusión no parece ser específica de las células.

Finalmente, los resultados han mostrado que no se detecta ningún ARNm salvaje en los "P-bodies" después de la incubación con el compuesto 70, lo que confirma una función de inhibidor específica de NMD de los compuestos identificados más que una función general de inhibición de la degradación de los ARNm.

II-8 Estabilización de ARNm de distrofina que presenta un codón de terminación prematura:

El gen de la distrofina está compuesto de 79 exones, de los cuales los exones 70 a 79 codifican para una parte de la proteína que no es esencial para la función de esta proteína en el músculo.

Entre los pacientes que padecen distrofia muscular de Duchenne (DMD), existen unos pacientes que llevan una mutación no sentido en uno de los exones 70 a 79. Por lo tanto, estos pacientes no expresan la proteína distrofina debido a la degradación del ARNm por el NMD, y esto aunque la proteína troncada sea funcional. En consecuencia, una inhibición de NMD en estos pacientes permitiría sintetizar esta proteína troncada pero funcional.

Se han utilizado dos líneas celulares procedentes de pacientes que padecen DMD debido, respectivamente, a una retención del intrón 70 que aporta un codón de terminación y de una delección de los exones 75 a 76 que provoca un desplazamiento del marco de lectura y, por lo tanto, la aparición de un codón de terminación precoz que activa el NMD sobre este ARNm.

Estas dos líneas celulares se han tratado durante 48 horas con el compuesto 70, 71 o 72, o en presencia de DMSO. Los ARN se extrajeron después y se realizó una RT-PCR en condición cuantitativa.

Los resultados han mostrado una estabilización del ARNm distrofina de un factor 4 aproximadamente, tras el tratamiento con los compuestos 70, 71 o 72.

II-9 Inhibición de NMD *in vivo*:

Se han utilizado dos modelos murinos para el mecanismo de NMD para estudiar el efecto *in vivo* del compuesto 70. El primer modelo se denomina ratón mdx. Estos ratones llevan una mutación no sentido en el exón 23 del gen de la distrofina. Este codón no sentido induce la degradación del ARNm distrofina por el NMD. Estos ratones han recibido en el músculo una inyección de DMSO (50 (μl), 20, 200 o 2000 nmoles de compuesto 70. Después de 6, 24 y 32 horas, se han sacrificado unos ratones, el músculo inyectado se extrajo a fin de extraer los ARN y las proteínas. Los resultados preliminares muestran una estabilización del ARNm distrofina en los ratones inyectados por el compuesto 70 y no en los ratones inyectados por el DMSO. Además, la proteína distrofina truncada es ella misma detectada en estos ratones inyectados por el compuesto 70 y no en los ratones que han recibido el DMSO.

El segundo modelo murino que ha sido utilizado se define por la presencia de una mutación no sentido en el exón 3 del gen μ del receptor a los opiáceos (MOR). Este codón de terminación activa el NMD sobre este ARNm MOR. El gen MOR está expresado sólo en el sistema nervioso central que hace de este modelo una herramienta muy interesante a fin de estudiar la posibilidad, para un compuesto químico, de atravesar la barrera hemato-encefálica. Se ha seguido el mismo procedimiento que para los ratones mdx, salvo que la inyección se realiza por vía subcutánea a nivel del cuello de los ratones y el cerebro se ha extraído en las diferentes fases del experimento. De nuevo, los primeros resultados muestran una estabilización del ARNm MOR en los ratones inyectados por el compuesto 70 y no en los ratones inyectados sólo con DMSO. El análisis por transferencia Western de la proteína MOR muestran la presencia de la proteína truncada en estos mismos ratones inyectados por el compuesto 70 y no en los ratones que han recibido sólo DMSO. Estos resultados muestran que el compuesto 70 es activo *in vivo* y que puede atravesar la barrera hemato-encefálica, lo que hace de este compuesto un potencial agente terapéutico para unas enfermedades que afectan al sistema nervioso central y relacionadas con el NMD.

III- Discusión

Este estudio ha permitido poner en evidencia la capacidad de inhibición de NMD de derivados indoles. Estos compuestos actúan impidiendo la interacción entre hUPF1 y hSMG5, lo que llega a la exclusión de hSMG5 de los p-bodies y a la estabilización de las formas hiperfosforiladas de hUPF1.

Finalmente, los resultados han permitido poner en evidencia que estos derivados indoles son capaces de inhibir el NMD *in vivo* y pasar la barrera hematoencefálica, lo que hace de ellos buenos candidatos en el tratamiento de numerosas patologías asociadas a NMD.

Estos compuestos, además, resultan ser excelentes herramientas para estudiar el mecanismo de NMD por un enfoque que jamás ha sido posible debido a la falta de herramienta para inhibir específicamente este proceso. Por lo tanto, es perfectamente concebible una ventaja para los laboratorios que trabajan sobre este mecanismo de NMD.

Referencias:

Balkan, F.; Elmes, B.C.; Loder, J. W. Australian Journal of Chemistry 1969, 22, 2489.

Bashkurov, V.I., H. Scherthan, J.A. Solinger, J.M. Buerstedde, and W.D. Heyer. 1997. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. J Cell Biol. 136:761-73.

Belgrader, P., y L.E. Maquat. 1994. Nonsense but not missense mutations can decrease the abundance of nuclear mRNA for the mouse major urinary protein, while both types of mutations can facilitate exon skipping. Mol Cell Biol. 14:6326-36.

Bregues, M., D. Teixeira, y R. Parker. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. Science. 310:486-9.

Bisagni, E., Rautureau, M., Huel, C. Heterocycles 1988, 27, 1671-1678

Chen, C.Y., y A.B. Shyu. 2003. Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. Mol Cell Biol. 23:4805-13.

Chiu, S.Y., G. Serin, O. Ohara, y L.E. Maquat. 2003. Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upfl. Rna. 9:77-87.

Conti, E., y E. Izaurralde. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. Curr Opin Cell Biol. 17:316-25.

Cougot, N., S. Babajko, y B. Seraphin. 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. J Cell Biol. 165:31-40.

Couttet, P., y T. Grange. 2004. Premature termination codons enhance mRNA decapping in human cells. Nucleic Acids Res. 32:488-94.

- Czaplinski, K., M.J. Ruiz-Echevarria, S.V. Paushkin, X. Han, Y. Weng, H.A. Perlick, H.C. Dietz, M.D. Ter-Avanesyan, y S.W. Peltz. 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12:1665-77.
- 5 Ducrocq, C., Bisagni, E., Rivalle, C., Lhoste, J.M. *Tetrahedron* 1979, 35, 142
- Fenger-Gron, M., C. Fillman, B. Norrild, y J. Lykke-Andersen. 2005. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell.* 20:905-15.
- 10 Fukuhara, N., J. Ebert, L. Unterholzner, D. Lindner, E. Izaurralde, y E. Conti. 2005. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell.* 17:537-47.
- 15 Fusco, D., N. Accornero, B. Lavoie, S.M. Shenoy, J.M. Blanchard, R.H. Singer, y E. Bertrand. 2003. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol.* 13:161-7.
- Frishmeyer, P.A. y Dietz, H.C. 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 8(10):1893-1900.
- 20 Gehring, N.H., J.B. Kunz, G. Neu-Yilik, S. Breit, M.H. Viegas, M.W. Hentze, y A.E. Kulozik. 2005. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol Cell.* 20:65-75.
- 25 He, F., X. Li, P. Spatrick, R. Casillo, S. Dong, y A. Jacobson. 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell.* 12:1439-52.
- Hosoda, N., Y.K. Kim, F. Lejeune, y L.E. Maquat. 2005. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol.* 12:893-901.
- 30 Ingelfinger, D., D.J. Arndt-Jovin, R. Luhmann, y T. Achsel. 2002. The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *Rna.* 8:1489-501.
- Ishigaki, Y., X. Li, G. Serin, y L.E. Maquat. 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell.* 106:607-17.
- 35 Kashima, I., A. Yamashita, N. Izumi, N. Kataoka, R. Morishita, S. Hoshino, M. Ohno, G. Dreyfuss, y S. Ohno. 2006. Binding of a novel SMG-1-Upfl-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20:355-67.
- 40 Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fitzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, y P. Anderson. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* 169:871-84.
- 45 Kim, Y.K., L. Furic, L. Desgroseillers, y L.E. Maquat. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell.* 120:195-208.
- Kuzmiak, H.A., y L.E. Maquat. 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med.*
- 50 Lejeune, F., X. Li, y L.E. Maquat. 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell.* 12:675-87.
- Lejeune, F., y L.E. Maquat. 2004. Immunopurification and analysis of protein and RNA components of mRNP in mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 257:115-24.
- 55 Lejeune, F., y L.E. Maquat. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 17:309-15.
- 60 Lykke-Andersen, J., M.D. Shu, y J.A. Steitz. 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell.* 103:1121-31.
- Maquat, L.E. 2004a. Nonsense-Mediated mRNA Decay: A Comparative Analysis of Different Species. *Current Genomics.* 5:175-190.
- 65 Maquat, L.E. 2004b. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:89-99.

- Mendell, J.T., C.M. ap Rhys, y H.C. Dietz. 2002. Separable roles for rentl/hUpfl in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science*. 298:419-22.
- 5 Mendell, J.T., N.A. Sharifi, J.L. Meyers, F. Martinez-Murillo, y H.C. Dietz. 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet*. 36:1073-8.
- Moriarty, P.M., C.C. Reddy, y L.E. Maquat. 1998. Sélénium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol*. 18:2932-9.
- 10 Ohnishi, T., A. Yamashita, I. Kashima, T. Schell, K.R. Anders, A. Grimson, T. Hachiya, M.W. Hentze, P. Anderson, y S. Ohno. 2003. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell*. 12:1187-200.
- 15 Page, M.F., B. Carr, K.R. Anders, A. Grimson, y P. Anderson. 1999. SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upfl of yeast. *Mol Cell Biol*. 19:5943-51.
- Pal, M., Y. Ishigaki, E. Nagy, y L.E. Maquat. 2001. Evidence that phosphorylation of human Upf1 protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. *Rna*. 7:5-15.
- 20 Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, y W. Filipowicz. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 309:1573-6.
- 25 Rehwinkel, J., I. Letunic, J. Raes, P. Bork, y E. Izaurralde. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *Rna*. 11:1530-44.
- Rivallé, C., Ducrocq, C., Lhoste, J. M., Wendling, F., Bisagnie, E., Chermann, J. C. *Tetrahedron* 1981; 37, 2097-2103
- 30 Rivallé, C., Wendling, F., Tambourin, P., Lhoste, J. M., Bisagni, E. *J. Med. Chem.* 1983, 26, 181-185 Serin, G., A. Gersappe, J.D. Black, R. Aronoff, and L.E. Maquat. 2001. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol Cell Biol*. 21:209-23.
- 35 Sheth, U., y R. Parker. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300:805-8.
- Sheth, U., y R. Parker. 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell*. 125:1095-109.
- 40 Soret, J., N. Bakkour, S. Maire, S. Durand, L. Zekri, M. Gabut, W. Fic, G. Divita, C. Rivallé, D. Dauzonne, C.H. Nguyen, P. Jeanteur, y J. Tazi. 2005. Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8764-9.
- Sun, X., H.A. Perlick, H.C. Dietz, y L.E. Maquat. 1998. A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 :10009-14.
- 45 Sureau, A., R. Gattoni, Y. Dooghe, J. Stevenin, y J. Soret. 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J*. 20:1785-96.
- 50 Teixeira, D., U. Sheth, M.A. Valencia-Sanchez, M. Brengues, y R. Parker. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna*. 11:371-82.
- Thermann, R., G. Neu-Yilik, A. Deters, U. Frede, K. Wehr, C. Hagemeier, M.W. Hentze, y A.E. Kulozik. 1998. Binary spécification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *Embo J*. 17:3484-94.
- 55 Tourriere, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J.M. Blanchard, E. Bertrand, y J. Tazi. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol*. 160:823-31.
- 60 Unterholzner, L., y E. Izaurralde. 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell*. 16:587-96.
- van Dijk, E., N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle, y B. Seraphin. 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J*. 21:6915-24.
- 65

Wollerton, M.C., C. Gooding, E.J. Wagner, M.A. Garcia-Blanco, y C.W. Smith. 2004. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell*. 13:91-100.

5 Yamashita, A., T. Ohnishi, I. Kashima, Y. Taya, y S. Ohno. 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the régulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*. 15:2215-28.

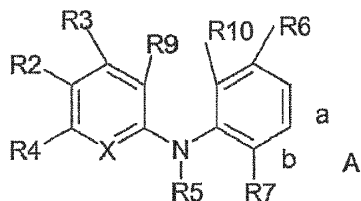
10 Yu, J.H., W.H. Yang, T. Gulick, K.D. Bloch, y D.B. Bloch. 2005. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *Rna*. 11:1795-802.

Zhang, J., X. Sun, Y. Qian, y L.E. Maquat. 1998. Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *Rna*. 4:801-15.

15

REIVINDICACIONES

1. Compuesto derivado de indol que corresponde a la fórmula II siguiente:



Fórmula II

en la que:

- X representa N o el anhidro base N⁺R8,

en el que R8 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o alquilo o metoxi eventualmente sustituido con un grupo fenilo, preferentemente R8 representa un átomo de hidrógeno,

- R2, R3 y R4 representan independientemente, un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno o un grupo alquilo de C1-C4,

- R5 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, saturado o insaturado,

- R6 representa un grupo alquilo de C1-C3, preferentemente un grupo metilo o etilo y de manera particularmente preferida R6 representa un grupo metilo,

- R7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C3,

- R9 y R10 representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo R11, OR11 o SR11,

en los que R11 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de oxígeno, un grupo alquilo de C1-C3 saturado o insaturado, que puede contener uno o varios átomos de azufre, de oxígeno o de nitrógeno;

- A representa un anillo en la posición a y que corresponde a

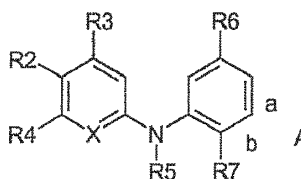


en la que:

- R1 representa un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno o un grupo alquilo o amina lineal o ramificado y/o insaturado,

- R13 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C4, y/o unas sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

2. Un compuesto derivado de indol según la reivindicación 1, de fórmula la siguiente



Fórmula Ia

en la que R2, R3, R4, R5, R6, R6, X y el anillo A son tales como se han definido en la reivindicación 1.

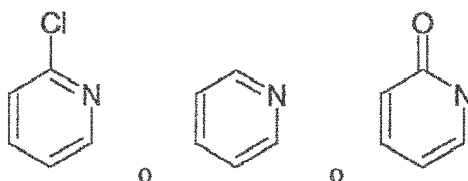
3. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que R2, R3 y R4 representan independientemente los unos de los otros un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno.

4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que R5 representa un grupo metilo, etilo, propilo o butilo y, preferentemente R5 representa un átomo de hidrógeno.

5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que R7 representa un grupo metilo o etilo y preferentemente R7 representa un grupo metilo.

6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que R1 es un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno.

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que A se selecciona del grupo que comprende



8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el compuesto se selecciona del grupo que comprende:

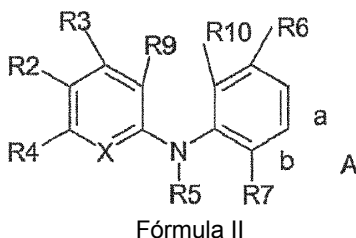
- 5,8-Dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona;

- 5,8-Dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-isoquinolin-1-ona; y

- 5,8-dimetil-6-(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina, y preferentemente dicho compuesto es la 5,8-dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona;

9. Composición farmacéutica que comprende al menos un derivado de indol tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, eventualmente un soporte farmacéuticamente aceptable.

10. Compuesto derivado de indol que corresponde a la fórmula II siguiente:



en la que:

- X representa N, CR8 o el anhidro base N⁺R8,

en el que R8 representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o alquilo o metoxi eventualmente sustituido con un grupo fenilo, preferentemente R8 representa un átomo de hidrógeno,

- R2, R3 y R4 representan independientemente, un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno o un grupo alquilo de C1-C4,

- R5 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, saturado o insaturado,

- R6 representa un grupo alquilo de C1-C3, preferentemente un grupo metilo o etilo y de manera particularmente preferida R6 representa un grupo metilo,

- R7 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C3,

- R9 y R10 representan juntos un enlace carbono o representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo R11, OR11 o SR11,

en los que R11 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de oxígeno, un grupo alquilo de C1-C3 saturado o

insaturado, que puede contener uno o varios átomos de azufre, de oxígeno o de nitrógeno;

- A representa un anillo en la posición a y que corresponde a



5

en la que:

10 - R1 representa un átomo de hidrógeno, de oxígeno o de halógeno o un grupo alquilo o amina lineal o ramificado y/o insaturado,

- R13 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C1-C4, y/o unas sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos,

15 para su utilización para tratar, en un sujeto, una enfermedad genética seleccionada del grupo que comprende la β -talasemia, el síndrome de Marfan, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la distrofia muscular de Becker (BMD), la enfermedad de Ullrich, el síndrome de Hurler y la fibrosis quística (CF).

20 11. Utilización de un compuesto según la reivindicación 10, caracterizada por que dicho compuesto se selecciona del grupo que comprende:

- 6-Cloro-5,10-dimetil-11H-pirido[3',2']:4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina;

25

- 5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina;

- 5,8-Dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2*H*-isoquinolin-1-ona;

- 5,8-dimetil-6-(3-metoxi-piridin-2-ilamino)-isoquinolin-1-ona; y

30

- 5,8-dimetil-6(5-metil-piridin-2-ilamino)-isoquinolina.