

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 052**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4184 (2006.01) **A61K 31/713** (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 31/166 (2006.01)

A61K 31/4412 (2006.01)

A61K 31/16 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/EP2012/059685**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12160130**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12723198 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2714037**

54 Título: **Inhibidores de ERK para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal**

30 Prioridad:

25.05.2011 US 201161489721 P

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

13.01.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (50.0%)
12, Rue de l'Ecole de Médecine
75006 Paris 6, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHARBONNIER, FRÉDÉRIC y
BIONDI, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 597 052 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

Inhibidores de ERK para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un inhibidor de ERK, tal como selumetinib, para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal en un sujeto en necesidad del mismo.

10 **Estado de la técnica**

La atrofia muscular espinal (SMA) es una enfermedad neurodegenerativa recesiva caracterizada por la pérdida selectiva de neuronas motoras espinales¹. La SMA es causada por la mutación del gen de supervivencia de las neuronas motoras 1 (*SMN1*)² y deficiencia de la expresión de proteínas de la supervivencia de las neuronas motoras (SMN). Todos los pacientes retienen una o más copias del gen *SMN2*, que modula la gravedad de la enfermedad produciendo una pequeña cantidad de transcritos de SMN de longitud completa y, por consiguiente, de la proteína SMN estable³. Como la SMA es causada por cantidades insuficientes de proteína SMN, un objetivo principal de la estrategia terapéutica para SMA es aumentar los niveles de proteína SMN activando la expresión del gen *SMN2*. Sin embargo, hoy en día no hay terapia disponible para SMA, que representa la principal causa genética de muerte en la infancia.

El modo de acción de las moléculas terapéuticas para el tratamiento de SMA puede incluir el aumento de la expresión de SMN, particularmente en neuronas motoras mediante la activación del promotor de *SMN2*, aumentando la inclusión del exón-7 en transcritos de SMN, o prolongando la semivida de ARNm o proteína de SMN.

También puede incluir la promoción de la supervivencia de neuronas motoras mediante la activación de vías antiapoptóticas. Con los años, varios grupos han identificado compuestos inductores del gen *SMN2* usando fibroblastos cultivados derivados de pacientes con SMA, y cuyos beneficios fueron frecuentemente adicionalmente probados *in vivo* en modelos de ratón con SMA⁵. Entre aquellos, se identificaron compuestos inductores de SMN basándose en su supuesta capacidad para aumentar la expresión génica general, tal como los inhibidores de histona desacetilasa^{6,7,8}, o por cribados de alto rendimiento, tales como derivados de quinazolina^{9,10}. Desafortunadamente, hasta la fecha, muchos de estos compuestos fueron decepcionantes en ensayos clínicos sin beneficio clínico sustancial demostrado^{11,12,13}. Por último lugar, ninguno de estos compuestos proporciona posibilidades antiapoptóticas eficientes de las neuronas motoras.

Un desarrollo terapéutico prometedor hasta ahora inexplorado para SMA podría implicar la corrección farmacológica de mecanismos moleculares, específicamente alterados en el sistema neuromuscular de SMA, posiblemente capaces de modular tanto la expresión de SMN como la supervivencia de neuronas motoras, o ambas.

Sin embargo, todavía existe una necesidad de entender las vías moleculares implicadas en la modulación de la expresión de SMN o la supervivencia de neuronas motoras e identificar estrategias eficientes para tratar SMA.

Constitutivamente regulada por disminución en médula espinal de ratón con SMA, la vía AKT/CREB es capaz de aliviar sorprendentemente los síntomas de SMA en ratones en tanto que sea reactivada¹⁴. En cada ratón similar a SMA grave¹⁵, la reactivación de la vía AKT/CREB por NMDA produjo un aumento en la cantidad total de transcritos de SMN en la médula espinal con SMA sin modificar su patrón de corte y empalme, sugiriendo una regulación del gen *SMN2* al nivel transcripcional¹⁴. Además, considerada como una vía antiapoptótica común y poderosa¹⁶ en particular para las neuronas motoras espinales¹⁷, la activación de la vía AKT/CREB probablemente representa una pista importante para la resistencia de las neuronas motoras a la muerte celular en médula espinal con SMA. Así, se ha sugerido identificar agentes terapéuticos que podrían conducir a la reactivación de la vía AKT/CREB en médula espinal con SMA como un posible enfoque para tratar SMA.

La publicación de patente internacional N.º WO2010/148249 (Isis Pharmaceuticals, Genzyme Corp, Cold Spring Harbor Laboratory) describe métodos y composiciones para modular el corte y empalme de ARNm de *SMN2* en un sujeto, para el tratamiento de atrofia muscular espinal.

De forma interesante, el perfil de activación de otra vía de señalización intracelular importante en neuronas¹⁸, concretamente la vía de señalización de ERK1/2, fue por el contrario opuesto al de AKT en médula espinal con SMA. Constitutivamente activado en exceso en la médula espinal de dos modelos de SMA de ratón grave diferentes, caracterizados por una débil expresión de SMN, ERK1/2 se inhibió cuando AKT se reactiva y este cambio en el equilibrio de activación de ERK/AKT se correlacionó con un aumento en la expresión de SMN¹⁴. Sin embargo, estos datos dejaron de mostrar un enlace directo entre una modulación de la vía de señalización de ERK 1/2 y la regulación del gen *SMN2*.

Se han descrito en la materia inhibidores de ERK, tales como selumetinib, para su uso en el tratamiento de trastornos por cáncer (véase, por ejemplo, Adjei et al. J Clin Oncol 2008 26(13):2139-2146; Board et al. Br J Cancer

2009 101(10):1724-30; Kolb et al. *Pediatr Blood Cancer* 2010 55(4):668-677). A conocimiento de los solicitantes, estas moléculas nunca han sido descritas para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal o trastornos relacionados.

5 Así, es mérito de los inventores haber proporcionado nuevos datos que muestren que la inhibición farmacológica de la vía de ERK, en particular mediante el uso de selumetinib o inhibidores de ERK relacionados, podría ser un tratamiento eficiente para aliviar síntomas de SMA o trastornos relacionados asociados a la deficiencia de SMN que produce pérdida de la función motora en pacientes.

10 **Objeto de la invención**

Por tanto, es un objetivo de la presente divulgación proporcionar métodos de tratamiento de un trastorno neuromuscular asociado a una deficiencia de SMN que produce pérdida de la función motora, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de ERK en un sujeto en necesidad del mismo.

Un trastorno neuromuscular que puede tratarse con el método de la divulgación es atrofia muscular espinal resultante de una mutación genética en el gen SMN1.

20 La invención se refiere a inhibidores de Erk para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal, según las reivindicaciones.

Los inhibidores de ERK para su uso según la invención pueden seleccionarse de inhibidores de MEK1/2, preferentemente aquellos inhibidores de MEK1/2 conocidos con una CI50 de al menos 1 μ M, o menos.

25 Ejemplos típicos de tales inhibidores de MEK1/2 conocidos incluyen, sin limitación, selumetinib (también conocido como AZD6244), U0126, PD98059, PD0325901, AZD8330 (ARRY-42704), CI-1040 (PD184352), PD318088.

30 En una realización preferida, dichos inhibidores de ERK para su uso según la invención están seleccionados de selumetinib o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, los inhibidores de ERK para su uso según la invención están seleccionados del grupo que consiste en moléculas de ácidos nucleicos tales como ARNip, ARNhp, y oligonucleótidos antisentido, siendo dichas moléculas de ácidos nucleicos capaces de reducir la expresión de MEK1, MEK2, ERK1 y/o ERK2.

35 Preferentemente, dichos inhibidores de ERK para su uso según la invención se administran por vía oral a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar atrofia muscular espinal.

40 La divulgación se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de ERK en combinación con otro componente de principio activo para el tratamiento de atrofia muscular espinal y un farmacéuticamente aceptable. El otro componente de principio activo está seleccionado del grupo que consiste en ARNip, ARNhp o compuestos antisentido dirigidos contra el ácido nucleico que codifica un producto deficiente en el gen SMN1 que produce pérdida de la función motora.

45 **Descripción detallada de la invención**

Inhibidores de ERK para su uso en el tratamiento de atrofas musculares espinales o trastornos neuromusculares relacionados

50 La divulgación se refiere más específicamente a inhibidores de ERK para su uso como un fármaco en el tratamiento de un trastorno neuromuscular asociado a una deficiencia de SMN que produce la pérdida de la función motora. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a cualquier método apropiado para curar, mejorar, estabilizar y/o prevenir una enfermedad o uno o más de los síntomas de tal enfermedad.

55 El término "inhibidores de ERK", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos capaces de prevenir, o reducir o inhibir completa o parcialmente, la actividad de señalización de MEK ERK1/2.

60 La inhibición puede ser eficaz al nivel transcripcional, por ejemplo, previniendo o reduciendo o inhibiendo la síntesis de ARNm de miembros clave de la vía de señalización de MEK ERK1/2, tales como ARNm de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2, por ejemplo, ARNm que codifica MEK1 humano (referencia de NCBI NP-002746), MEK2 humano (referencia NCBI de NP109587), ERK1 humano (referencia de NCBI NP-002737) o ERK2 humano (referencia de NCBI NP-620407).

65 Como se usa en el presente documento, el término "vía de señalización" o "actividad de señalización" se refiere a una relación causal bioquímica generalmente iniciada por una interacción proteína-proteína tal como la unión de un factor de crecimiento a un receptor, produciendo la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra

porción de una célula. En general, la transmisión implica fosforilación específica de uno o más restos de tirosina, serina o treonina en una o más proteínas en las series de reacciones que causan la transducción de señales. Los penúltimos procesos normalmente incluyen eventos nucleares, produciendo un cambio en la expresión génica.

5 Vía de señalización de MEK ERK1/2 se refiere a la vía de señalización que implica a proteínas cinasas selectivas de serina/treonina MEK y ERK (que representan cinasa regulada por señales extracelulares). Las cinasas específicas de receptor se activan mediante diversos estímulos extracelulares y así reclutan a proteínas G pequeñas de la familia Ras, que conducen a la activación secuencial de Raf (cinasa MAPK cinasa), MEK (cinasa MAPK) y ERK (MAPK). La actividad de MAPK/ERK requiere fosforilación en tanto la treonina (T185) como la tirosina (Y187).

10 El término "inhibidor de ERK" pretende referirse a una sustancia que reduce, disminuye y/o inhibe la actividad de señalización de MEK ERK1/2 como se mide por la cantidad relativa de proteínas ERK fosforiladas o proteína Elk1 fosforilada. Métodos de detección y medición de la cantidad relativa de proteínas ERK fosforiladas o proteína Elk1 fosforilada se describen en los ejemplos.

15 En una realización específica, dichos inhibidores de ERK son inhibidor de compuestos que inhiben la actividad de cinasas MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2. La inhibición específica puede medirse como CI50 en un ensayo funcional para la actividad de señalización de MEK ERK1/2 y los inhibidores seleccionados pueden tener una CI50 de 100 μ M o menos, 10 μ M o menos, 1 μ M o menos, 100 nM o menos, 10 nM o menos o 1 nM o menos. Ensayos para medir la actividad de la cinasa MEK1/2 están comercialmente disponibles.

Tales inhibidores pueden así seleccionarse entre molécula pequeña, ARNip, ARNhp, ADN antisentido y similares.

25 En una realización, un inhibidor de ERK para su uso según la presente invención es una molécula pequeña. En otra realización, dicho inhibidor de ERK está seleccionado del grupo que consiste en ARNip, ARNhp, oligonucleótidos antisentido y ácidos nucleicos relacionados capaces de inhibir la expresión génica de MEK1, MEK2, ERK1 y/o ERK2.

Inhibidores de ERK de molécula pequeña

30 En una realización, un inhibidor de ERK para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal o trastornos relacionados es un inhibidor de ERK de molécula pequeña.

35 Como se usa en el presente documento, el término "molécula pequeña" se refiere a un compuesto orgánico de bajo peso molecular que no es un polímero. Preferentemente, tiene un peso molecular no superior a 800 Daltons de manera que pueda difundir rápidamente a través de membranas celulares de manera que puedan llegar a sitios de acción intracelular.

40 Se ha descrito en la materia una variedad de inhibidores de ERK de molécula pequeña, en particular inhibidores de MEK tales como inhibidores de MEK1 y/o MEK2, también denominados inhibidores de MEK1/2.

45 Tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a, inhibidores tipo cromona y flavona. Otros ejemplos de inhibidores de ERK de molécula pequeña adecuados incluyen, pero no se limitan a, PD 98059, un inhibidor de MEK1 y MEK2 altamente selectivo con valores de CI50 de 4 μ M y 50 μ M, respectivamente (Runden E et al., J Neurosci 1998, 18(18) 7296-305), PD0325901 (Pfizer), selumetinib, un inhibidor selectivo de MEK (AstraZeneca/Array BioPharma, también conocido como AZD6244), ARRY-438162 (Array BioPharma), PD198306 (Pfizer), PD0325901 (Pfizer), AZD8330 (AstraZeneca/Array Biopharma, también llamado ARRY-424704), PD184352 (Pfizer, también llamado CI-1040), PD 184161 (Pfizer), α -[amino[(4-aminofenil)tio]metilen]-2-(trifluorometil)bencenoacetnitrilo (SL327), 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)butadieno (DeSilva, D.R., et al. 1998. J. Immunol. 160, 4175. 165. Duncia, J.V., et al. 1998. Biorg. Med. Chem. Lett. 8, 2839. 166. Favata, M.F., et al. 1998. J. Biol. Chem. 273, 18623. 167. Ahn et al. (1999) Promega Notes. 71 : 4), U0126 (Kohn & Pouyssegur (2003) Prog. Cell. Cyc. Res. 5: 219-224), GW 5074 (Santa Cruz Biotechnology), BAY 43-9006 (Bayer, Sorafenib), Ro 09-2210 (Roche, Williams et al., Biochemistry. 1998 Jun 30;37(26):9579-85), FR 1 80204 (Otori, M. et al. (2005) Biochem. Biophys. Res. Comm. 336: 357-363), 3-(2-aminoetil)-5-(4-etoxifenil)metilen)-2,4-tiazolidindiona (PKI-ERK-005) (Chen, F. et al. (2006) Bioorg. Med. Chem. 16:6281-6288. 171. Hancock, CN. et al. (2005) J. Med. Chem. 48: 4586-4595), CAY10561 (CAS 933786-58-4; Cayman Chemical), GSK 120212, RDEA1 19 (Ardea Biosciences), XL518 y ARRY-704 (AstraZeneca).

60 Otros inhibidores de ERK y sus métodos de síntesis se han descrito en los documentos US 5.525.625, WO 98/43960, WO 99/01426, WO 00/41505, WO 00/42002, WO 00/42003, WO 00/41994, WO 00/42022; WO 00/42029, WO 00/68201; WO 01/68619; WO 02/06213; WO 03/077855 y WO 2005/23251.

65 Tales inhibidores de ERK incluyen adicionalmente, sin limitación, un inhibidor peptídico correspondiente a los 13 aminoácidos del extremo amino de MEK1 (MPKKKPTPIQLNP) (Kohn & Pouyssegur (2003) Prog. Cell. Cyc. Res. 5: 219-224). Los inhibidores peptídicos pueden obtenerse usando métodos de síntesis química usual de péptidos o ingeniería genética. Tal inhibidor peptídico puede fusionarse adicionalmente a secuencias de péptidos adicionales, por ejemplo, a secuencias de conectores, señal o conductoras. Una marca se refiere a una secuencia de

aminoácidos distinta que puede usarse para detectar o purificar la secuencia de péptidos, pero no contribuye a la función esencial de la inhibición de ERK. Tales inhibidores peptídicos pueden ligarse adicionalmente a péptidos de internalización o dominio de transducción de proteínas tal como el dominio de transactivación de TAT del VIH, antenapedia y transportan que pueden dirigir fácilmente moléculas diana y péptidos pequeños a través de la membrana plasmática dentro de la célula (Schwarze et al., Science. 1999 285(5433): 1569-72).

También se ha desarrollado una serie de 3-ciano-4-(fenoxianilo)-quinolinas con actividad inhibidora de MEK por Wyeth-Ayerst (Zhang N. et al., Bioorg Med. Chem. Lett., 2000, 10: 2825-2828).

Se han aislado varias lactonas del ácido resorcíclico que tienen actividad inhibidora hacia MEK de extractos microbianos. Por ejemplo, Ro 09-2210, aislado de caldo fúngico FC2506, y L-783.277, purificado de extractos orgánicos de *Phoma* sp., son competitivos con ATP, y la inhibición de MEK1 es reversible (Williams D.H. et al., Biochemistry, 1998, 37: 9579-9585; y Zhao A. et al., J. Antibiot., 1999, 52: 1086-1094).

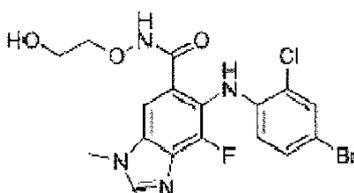
También se ha mostrado que purvalanol, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclina (CDK), se dirige ERK1 y ERK2 (Knockhaert M. et al., Oncogene, 2002, 21: 6413-6424).

Otros inhibidores de ERK que pueden usarse según la presente invención incluyen los desvelados en la publicación de patente de EE.UU. 2003/0060469, la publicación de patente de EE.UU. 2004/0048861 y la publicación de patente de EE.UU. 2004/0082631.

En una realización preferida, dicho inhibidor de ERK es un inhibidor de cinasas MEK1 y/o MEK2 seleccionadas del grupo que consiste en selumetinib, U0126, PD98059, PD0325901, AZD8330 (ARRY-42704), CI-1040 (PD184352), PD318088.

Preferentemente, dicho inhibidor de ERK está seleccionado del grupo que consiste en selumetinib y sus derivados, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Selumetinib, también conocido como AZD6244, es un inhibidor de MEK1/2 que tiene la siguiente fórmula (I):



(I)

6-(4-bromo-2-cloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hidroxi-etoxi)-3-metilbencimidazol-5-carboxamida

Métodos de síntesis de selumetinib y otros derivados de selumetinib o sus sales farmacéuticamente aceptables que pueden usarse como inhibidores de ERK según la presente invención también se han descrito en los documentos EP2275102 (véase en particular la fórmula I como se desvela en el documento EP2275102), WO 03/077855 y WO 03/077914.

ARNip

Los ARN interferentes pequeños (ARNip) pueden funcionar de inhibidores de la expresión génica de un componente de la señalización de MEK/ERK1/2, actuando así de inhibidores de ERK. Por ejemplo, puede reducirse la expresión génica de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2 poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbp), o un vector o construcción que cause la producción de un ARN bicatenario pequeño, de forma que dicha expresión génica sea específicamente inhibida (es decir, interferencia por ARN o iARN). Métodos de selección de un ARNbp apropiado o vector que codifica ARNbp son muy conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase, por ejemplo, Tuschl, T. et al. Genes Dev. 1999 Dec 15;13(24):3191-7; Elbashir, S. M. et al Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8; Hannon, G.J. Nature. 2002 Jul 11;418(6894):244-51; McManus, M.T. et al. J Immunol 169, 5754-5760 (2002); Brummelkamp, T.R. et al. Science. 2002 Apr 19; 296(5567):550-3; las patentes de EE.UU. N.º 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de patente internacional N.º WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836). Todos los medios y métodos que producen una disminución en la expresión de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2, en particular aprovechando ARNip específicos de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2 (es decir, ARNip que se dirigen específicamente a ARNm de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2), pueden usarse en la presente invención. También se describen métodos de generación y preparación de ARNip(s), además del método de inhibición de la expresión de un gen diana, por ejemplo, en el documento WO02/055693.

Pueden prepararse ARNip o ácidos nucleicos relacionados útiles como inhibidores de la expresión génica de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2, tales como oligonucleótidos antisentido, por métodos conocidos. Éstos incluyen técnicas para la síntesis química tal como, por ejemplo, por síntesis química de fosforamidito en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de ARN antisentido por transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones a los oligonucleótidos como un medio de aumentar la estabilidad intracelular y semivida. Posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de enlaces fosforotioato o 2'-O-metilo en vez de fosfodiesterasa dentro del esqueleto del oligonucleótido. Aquella modificación incluye el uso de nucleósidos con restos de azúcar modificados, que incluyen, sin limitación, grupos sustituyente de 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃ y 2'-O(CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también puede seleccionarse de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C₁-C₁₀, OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N(R_m)(R_n) y O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), en las que cada R_m y R_n es, independientemente, H o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o sin sustituir.

Oligonucleótidos antisentido y ARNip o ácidos nucleicos relacionados útiles como inhibidores de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2 pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido o ARNip o ácidos nucleicos relacionados a las células diana, preferentemente aquellas con expresión deficiente del gen SMN, tal como células musculares. Preferentemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida relativa hasta el punto de degradación que produciría la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, vectores basados en transposón u otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que han sido manipulados por la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido o ARNip o secuencias de ácidos nucleicos relacionadas. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos de los siguiente virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociados; virus tipo SV40; virus del polio; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la variolovacuna; virus de la poliomielitis; y virus de ARN tales como un retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no nombrados, pero conocidos en la técnica.

Vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que genes no esenciales se han sustituido con el gen de interés. Virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo vital implica transcripción inversa de ARN viral genómico en ADN con posterior integración proviral en ADN celular del huésped. Los retrovirus han sido autorizados para ensayos de terapia de genes humanos. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de alta eficiencia de genes *in vivo*. Protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno dentro de un plásmido, transfección de una línea celular de encapsidación con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de encapsidación, recogida de partículas virales de medios de cultivo de tejido, e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en Varmus, Harold; Coffin, John M.; Hughes, Stephen H., ed (1997). "Principles of Retroviral Vector Design". Retroviruses. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-571-4.

Virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adeno-virus y virus adeno-asociados o vectores retrovirales tales como lentivirus, que son virus de ADN bicatenario que ya han sido autorizados para uso humano en terapia génica. Ejemplos de tales vectores virales incluyen vectores originados a partir de retrovirus tales como VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VLM (virus de la leucemia murina), ASLV (sarcoma aviar/virus de la leucosis), SNV (virus de la necrosis del bazo), RSV (virus del sarcoma de Rous), MMTV (virus del tumor mamario de ratón), etc., lentivirus, virus adeno-asociados y virus del herpes simple, pero no se limitan a éstos.

Estos vectores virales pueden manipularse para ser deficientes en la replicación y ser capaces de infectar una amplia variedad de tipos de células y especies. Tiene además ventajas tales como estabilidad al calor y disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, que incluyen células hemopoyéticas; y carecen de inhibición de la superinfección, permitiendo así múltiples series de transducciones.

Otros vectores incluyen vector plasmídico, vector de cósmido, vector de cromosoma artificial bacteriano (BAC), vector basado en transposón. Los plásmidos pueden administrarse mediante una variedad de vías parenteral, mucosa y tópica. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vías intramuscular, ocular, intradérmica, subcutánea, u otras vías. También puede administrarse por esprays o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. También puede administrarse en la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola de genes. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secos sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN que incluye, pero no se limita a, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhp o secuencia de ácidos nucleicos relacionada está bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo, un promotor heterólogo. Un promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor viral, tal como el promotor del CMV o cualquier promotor sintético.

5 El ARNip también puede conjugarse directamente con una entidad molecular diseñada para ayudar en la administración elegida como diana. Ejemplos de conjugados son conjugados lipófilos tales como colesterol, o conjugados basados en aptámeros. También se usan péptidos y proteínas catiónicas para formar complejos con un esqueleto de fosfato negativamente cargado del ARNip.

10 Método de tratamiento y composiciones farmacéuticas

Otro objetivo de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de atrofia muscular espinal o trastornos neuromusculares relacionados asociados a una deficiencia de SMN que produce la pérdida de la función motora, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto que es un inhibidor de ERK como se ha descrito anteriormente, a un sujeto en necesidad del mismo.

15 En un aspecto, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de atrofia muscular espinal que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de ERK, tal como selumetinib o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables como se ha descrito anteriormente.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona inhibidores de ERK como se han descrito anteriormente, que pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de atrofia muscular espinal o trastornos neuromusculares relacionados asociados a una deficiencia de SMN que produce la pérdida de la función motora.

Los inhibidores de ERK pueden administrarse en forma de una composición farmacéutica, como se define más adelante.

30 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se indica una cantidad suficiente de inhibidor de ERK para tratar y/o para prevenir, reducir y/o aliviar uno o más de los síntomas de atrofia muscular espinal o trastornos neuromusculares relacionados.

35 En un aspecto, dicho trastorno neuromuscular relacionado está seleccionado del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como enfermedad de Charcot o enfermedad de Lou Gehrig o enfermedad motoneuronal).

40 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones para su uso según la presente invención será decidido por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, vía de administración y velocidad de eliminación del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares muy conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, es muy conocido dentro de la experiencia de la materia 45 empezar la dosis del compuesto a niveles más bajos que aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que va a tratarse. Un medicamento normalmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra generalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

55 Por tanto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz de inhibidor de ERK tal como, por ejemplo, selumetinib o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables, para su uso según la invención.

60 Cualquier agente terapéutico para su uso según la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

65 El agente terapéutico, es decir, los inhibidores de ERK, pueden combinarse con otros principios activos, por ejemplo, ARNip, ARNhp o compuestos antisentido dirigidos contra el ácido nucleico que codifica un producto deficiente en el gen SMN1 que produce la pérdida de la función motora.

En un aspecto específico, tales inhibidores de ERK pueden combinarse con composiciones para modular el corte y empalme del ARNm de SMN2, que incluyen, sin limitación, los desvelados en el documento WO2010/148249.

5 En otro aspecto específico, los inhibidores de ERK pueden combinarse con el inhibidor de la cinasa del extremo NH2 c-Jun (JNK), tales como aquellos descritos en el documento WO 2010/151638.

10 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según convenga. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulamiento o auxiliar de formulación sólido, semi-sólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

15 Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes (tales como tampones de solución salina tamponada con fosfato, agua, solución salina), medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción y similares. Las formulaciones se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science (Martin E.W. (1995) Easton Pa., Mack Publishing Company, 19th ed.)

20 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y la pauta naturalmente dependen de la afección que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas para su uso según la invención pueden formularse para una administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea, y similares.

25 Método de cribado de agentes para tratar atrofia muscular espinal o trastornos relacionados

30 Una función para la vía de MEK ERK1/2 en trastornos neuromusculares asociados a deficiencias de SMN nunca ha sido descrita ni propuesta en el estado de la técnica. Por tanto, es lo más sorprendente que inhibiendo la vía de señalización de MEK ERK1/2, la expresión del gen SMN2 aumente significativamente. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de cribado de agentes para tratar atrofia muscular espinal o trastornos relacionados, comprendiendo dicho método el cribado de inhibidores de ERK.

35 En una realización específica, la divulgación proporciona métodos de cribado de agentes para tratar atrofia muscular espinal o trastornos relacionados que comprenden (i) seleccionar compuestos que se unen a cinasas MEK1 o MEK2 con alta afinidad en un ensayo de unión primaria y (ii) seleccionar de aquellos compuestos de unión los compuestos que inhiben específicamente la señalización de MEK ERK1/2 en un ensayo funcional secundario.

40 Los métodos de cribado de la divulgación generalmente comprenden un primer ensayo de cribado de unión primaria, generalmente llevado a cabo como un ensayo de cribado de alto rendimiento, diseñado para identificar compuestos que se unen con alta afinidad a la proteína MEK1 o MEK2 o proteína ERK1 o ERK2. En una realización, "alta afinidad" se refiere a compuestos que se unen a la proteína diana con una constante de disociación K_D de 100 μM o menos, 10 μM o menos, 1 μM o menos, 100 nM o menos, 10 nM o menos, o 1 nM o menos. La afinidad K_D puede medirse, por ejemplo, usando resonancia de plasmones superficiales, tal como el ensayo Biacore® (Biacore Life Sciences).

45 Pueden probarse compuestos de grandes bibliotecas de moléculas pequeñas, productos naturales, péptidos, peptidomiméticos, polipéptidos, proteínas o una combinación de los mismos o cualquier biblioteca de compuestos apropiada para el descubrimiento de fármacos. Bibliotecas de compuestos sintéticos están comercialmente disponibles de Maybridge Chemical Co (Trevillet, Cornwall, RU), Comgenex (Princeton, N.J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H) y Microsource (New Milford, Conn.). También pueden cribarse compuestos de derivados de inhibidores de ERK conocidos.

50 Ejemplos de tales ensayos de unión primaria para identificar ligantes de MEK1 o MEK2 incluyen, sin limitaciones, los ensayos de FRET o TR-FRET (en "A homogeneous time resolved fluorescence method for drug discovery" en: High Throughput screening: the discovery of bioactive substances. Kolb (1997) J. Devlin. NY, Marcel Dekker 345-360).

55 Una vez se han seleccionado moléculas diana o compuestos de unión del ensayo de cribado primario, generalmente se someten a un ensayo funcional secundario para probar la inhibición específica de las vías de señalización de MEK ERK1/2. En otro aspecto, tal ensayo funcional secundario se usa como ensayo primario para el cribado directo de compuesto inhibidores.

60 Como se usa en el presente documento, el término "inhibición específica" se refiere a una inhibición que depende de la presencia de un activador de dicha vía de señalización de MEK ERK1/2, preferentemente dependiente de la dosis. La intensidad de la inhibición puede referirse como CI_{50} , es decir, la concentración de los inhibidores requerida para obtener el 50 % de la inhibición en un ensayo determinado. En un aspecto, inhibidores específicos tienen una CI_{50} de 100 μM o menos, 10 μM o menos, 1 μM o menos, 100 nM o menos, 10 nM o menos o 1 nM o menos, como se

mide en el ensayo funcional secundario.

El cribado secundario puede ser, por ejemplo, un ensayo bioquímico o ensayo basado en células para detectar la inhibición de la señalización de MEK ERK1/2.

El ensayo bioquímico puede, por ejemplo, incluir un sustrato para cinasas MEK1 y MEK2 (por ejemplo, una proteína ERK1 o ERK2 recombinante y cinasa MEK1 o MEK2 purificada o una enzima con actividad relacionada) y medios para detectar el sustrato fosforilado (P-ERK, por ejemplo). Tales medios pueden ser anticuerpo específico por sustrato fosforilado. El ensayo consiste en medir la cantidad de sustrato fosforilado después de la incubación con la enzima purificada en ausencia o presencia del compuesto probado. La inhibición se detecta como una disminución significativa y dependiente de la dosis de sustrato fosforilado.

El ensayo basado en células incluye ensayos que permiten la determinación del perfil de activación de dianas moleculares conocidas de la vía de MEK ERK1/2, que incluye, sin limitación, el factor de transcripción Elk1 como se describe en los ejemplos más adelante.

Compuestos que presentan una o más propiedades de inhibición, las moléculas "cabeza de serie", pueden entonces modificarse químicamente, por ejemplo, para mejorar sus propiedades de unión, sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (por ejemplo, solubilidad y propiedades de ADME).

Usando los ensayos descritos en la presente divulgación y la materia relacionada con inhibidores de ERK conocidos, el experto es así capaz de identificar inhibidores de ERK novedosos, para su uso según la presente invención.

A continuación, la invención se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos, además de las figuras.

Descripción de las figuras

FIGURA 1:

A. Secuencia del sitio 1 del promotor de *Smn*

B. Secuencia del sitio 2 del promotor de *Smn*

C y D. Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína Elk-1 en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con NMDA a los 6 días de edad (n=2). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

E y F. Análisis de ChIP de fosfo-Elk-1 en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con NMDA a los 6 días de edad (n=9). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real para detectar el sitio 1 (**E**) y el sitio 2 (**F**) del promotor de *SMN2*. Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

G y H. Análisis de ChIP de fosfo-CREB en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con NMDA a los 6 días de edad (n=9). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real para detectar el sitio 1 (**G**) y el sitio 2 (**H**) del promotor de *SMN2*. Las barras de error indican EEM. (**, p<0,01; ***, p<0,001).

I y J. Análisis de ChIP de la acetilación de histona H3 en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con NMDA a los 6 días de edad (n=9). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real para detectar el sitio 1 (**I**) y el sitio 2 (**J**) del promotor de *SMN2*. Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001).

K y L. Análisis de ChIP de la acetilación de histona H4 en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con NMDA a los 6 días de edad (n=9). Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real para detectar el sitio 1 (**K**) y el sitio 2 (**L**) del promotor de *SMN2*. Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05; ***, p<0,001).

FIGURA 2:

A y B. Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína Elk-1 en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de

ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con U0126 a los 6 días de edad (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

5 **C y D.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la expresión de proteínas SMN en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con U0126 a los 6 días de edad (n=2). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

10 **E.** Análisis cuantitativo del número de GEMS por neurona motora en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con U0126 a los 6 días de edad (n=2).

15 **F y G.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína AKT en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con U0126 a los 6 días de edad (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

20 **H y I.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína CREB en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y con NMDA a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con U0126 a los 6 días de edad (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

25 **J y K.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la expresión de proteínas SMN en miotubos y mioblastos cultivados con SMA humana tratados con vehículo y U0126 (n=2). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

FIGURA 3:

30 **A y B.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína ERK en los explantes de médula espinal de control y de SMA en presencia o no de NMDA y del inhibidor de CREB KG501 (n=2). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

35 **C y D.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína Elk-1 en los explantes de médula espinal de control y de SMA en presencia o no de NMDA y del inhibidor de CREB KG501 (n=2). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

40 **E y F.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de la proteína AKT en los explantes de médula espinal de control y de SMA en presencia o no de NMDA y del inhibidor de CREB KG501 (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

45 **G y H.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de SMN expresión de proteínas en los explantes de médula espinal de control y de SMA en presencia o no de NMDA y del inhibidor de CREB KG501 (n=2). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

FIGURA 4:

50 **A.** Esperanza de vida de ratones parecidos a SMA tratados con U0126 (n=15) en comparación con tratados con vehículo (n=10).

B. Curva de peso en ratones parecidos a SMA tratados con U0126 (n=15) y tratados con vehículo (n=10) en comparación con control tratado con U0126 (n=15) y tratado con vehículo (n=15).

55 **C-F.** Inmunodetección de neuronas motoras positivas para ChAT en la médula espinal lumbar (L1-L5) de ratones de control tratados con vehículo (**C**) y con U0126 (**D**) de 6 días de edad, y ratones parecidos a SMA tratados con vehículo (**E**) de 2 días de edad y con U0126 de 6 días de edad (**F**).

60 **G y H.** Análisis cuantitativo del número (**G**) y el área corporal celular (**H**) de las neuronas motoras por asta ventral en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y U0126 a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con U0126 a los 6 días de edad (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

65 **I y J.** Análisis de transferencia Western y cuantificación de la expresión de proteínas SMN en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y AZD6244 a los 6 días de edad, ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con AZD6244 a los 6 días de edad (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

K y L. Análisis de transferencia Western y cuantificación de la fosforilación de proteínas AKT en la médula espinal lumbar ventral de ratones de control tratados con vehículo y AZD6244 a los 6 días de edad, de ratones parecidos a SMA con vehículo a los 2 días de edad y ratones parecidos a SMA tratados con AZD6244 a los 6 días de edad (n=3). Las barras de error indican EEM. (*, p<0,05).

M. Esperanza de vida de ratones parecidos a SMA tratados con AZD6244 (n=10) en comparación con tratados con vehículo (n=10).

N. Curva de peso en ratones parecidos a SMA tratados con AZD6244 (n=10) y tratados con vehículo (n=10) en comparación con control tratado con AZD6244 (n=10) y tratado con vehículo (n=10).

Ejemplos

Materiales y métodos

Ratones y tratamientos

Se compraron ratones parecidos a SMA transgénicos inactivados (Snm^{-/-}, SMN2^{+/+}) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se genotificaron como se ha descrito previamente¹⁵. Se constituyeron al azar el grupo tratado con vehículo, grupo tratado con NMDA, grupo tratado con U0126 y grupo tratado con AZD6244 de ratones parecidos a SMA tipo 1 en un modo sistemático cegado para minimizar el sesgo. Los ratones de control fueron heterocigóticos inactivados para Smn con el transgén SMN2 humano (Snm^{+/-}, SMN2^{+/+}).

Con el fin de evaluar la función de fosfo-Elk-1 y fosfo-CREB sobre el promotor Smn2, ratones de control neonatales P1 y similares a SMA se inyectaron ambos por vía intratecal con 5 pmol de ácido N-metil-D-aspartico 100 μ M (NMDA, Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia) en 0,5 μ l/g de NaCl al 0,9 % teñido en azul de Evans por gramo. Estos ratones se compararon con ratones de control y similares a SMA inyectados a partir de P1 con 0,5 μ l/g de NaCl al 0,9 % teñido en azul de Evans.

Con el fin de evaluar los beneficios de la inhibición de fosfo-ERK, ratones de control neonatal P1 y similares a SMA tipo 1 se inyectaron ambos por vía intratecal con 0,5 pmol de monoetanolato de 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(o-aminofenilmercapto)butadieno 10 μ M (U0126, Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia) en 0,5 μ l/g de NaCl al 0,9 % en DMSO al 1 % teñido en azul de Evans por gramo, o por vía oral con 0,5 pmol de selumetinib 10 μ M (AZD6244, Selleck chemicals, Houston, TX) en 2 μ l/g de NaCl al 0,9 % en DMSO al 1 %. Estos ratones se compararon con ratones de control y similares a SMA tanto inyectados a partir de P1 con 0,5 μ l/g de NaCl al 0,9 % en DMSO al 1 % teñido en azul de Evans como tratados por vía oral con 2 μ l/g de NaCl al 0,9 % en DMSO al 1 %. Los registros del peso corporal y la esperanza de vida se realizaron cada día hasta la muerte del animal. Los animales se consideraron como muertos cuando los ratones ya no fueron capaces de mantenerse 20 s después de haberse puesto sobre sus costados.

El cuidado y el tratamiento de los animales siguió las pautas de la autoridad nacional (Ministère de la Recherche et de la Technologie, Francia) para la detención, uso y el tratamiento ético de animales de laboratorio.

Cultivos celulares de ratón y tratamientos

Se realizaron co-cultivos de explantes de médula espinal (aproximadamente 1 mm³) y células de músculo como se describe por Kobayashi et al.²⁵ con las siguientes modificaciones. Se obtuvieron explantes de médula espinal de ratones embrionarios de control y con SMA grave. Se dispusieron explantes de las rebanadas transversales completas de médulas espinales de embriones de ratón de 10,5 días de edad que incluyen ganglios de la raíz dorsal (DRG) sobre la monocapa de músculo. Los DRG son esenciales para garantizar una buena relación de inervación²⁵. El cultivo de músculo se estableció a través de la diferenciación de la línea de células de músculo no mutante C2C12. Se cultivaron células de mioblasto sobre placa de Petri de 35 mm a 37 °C en 5 % de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con glutamina 2 mM, 20 % de suero bovino fetal, 2 % de penicilina/estreptomicina (5000 U). Todos los reactivos del medio de cultivo se compraron de Invitrogen Life Technologies (Cergy-Pontoise, Francia). Se diferenciaron mioblastos confluentes en miotubos en DMEM complementado con glutamina 2 mM, 5 % de suero de caballo, 2 % de penicilina/estreptomicina (5000 U) (medio de diferenciación, DM). Después de 5-7 días en DM, se añadieron explantes de la médula espinal sobre las células de músculo en contracción cultivadas. Después del co-cultivo con médula espinal, el cultivo se mantuvo en DM. Todos los co-cultivos se alimentaron tres veces a la semana y se examinaron diariamente por microscopía invertida de contraste de fases para comprobar la aparición de la inervación.

La estimulación de los NMDAR se logró exponiendo células a NMDA 100 μ M, como se ha descrito previamente¹⁴. Para evaluar la dependencia de CREB, se añadió KG-501 (10 μ M, Sigma) al cultivo. Después de 5 días de tratamiento, los explantes se eliminaron mecánicamente de la capa de músculo, y las proteínas se purificaron y analizaron por transferencia Western como se describe más adelante.

Cultivo primario humano de células precursoras miogénicas de biopsias de pacientes con SMA

Se obtuvieron biopsias de músculo de BTR (Bank of Tissues for Research, un socio en la red de EU EuroBioBank) según recomendaciones europeas y la legislación francesa. Se aislaron células satélite de biopsias y se cultivaron como se ha descrito previamente²⁶ en medio de crecimiento que consiste en 1 vol de medio 199 / 4 vol de DMEM (Invitrogen Life Technologies) complementado con 20 % de suero bovino fetal (Invitrogen Life Technologies), 2,5 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Invitrogen Life Technologies) y 50 µg/ml de gentamicina (Invitrogen Life Technologies). La expansión adicional se hizo en medio de crecimiento sin HGF. La pureza miogénica de las poblaciones se monitorizó por inmunocitoquímica usando desmina como marcador. Se indujo diferenciación en la confluencia reemplazando el medio de crecimiento con DMEM complementado con 4 % de suero de caballo y 50 µg/ml de gentamicina (Sigma). Se logró el bloqueo específico de la fosforilación de MEK durante 5 días usando 10 µM de U0126 (Sigma).

Análisis histológico e inmunohistoquímico.

Se diseccionaron médulas espinales y se incubaron durante la noche en 4 % de solución de PFA-PBS, y se lavaron dos veces durante 2 h con PBS. Las médulas espinales lumbares (L1 a L5) se incorporaron en solución al 4 % de agarosa en agua esterilizada durante 30 min a 4 °C. Entonces se realizaron secciones de 50 µm usando un vibratomo sobre la longitud completa de la muestra. Se procesó una de cada cinco secciones para análisis inmunohistoquímico. Las secciones de tejido se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de bloqueo (10 % de suero de burro normal con 0,5 % de Triton X-100 y 1 % de Tween en solución de tampón Tris (TBS)). Se realizaron la inmunodetección de neuronas motoras y de géminis de los cuerpos enrollados usando un anticuerpo primario anti-colina acetiltransferasa policlonal de cabra (ChAT) (1 : 400; Chemicon, Inc., Temecula, CA) y un anticuerpo primario anti-SMN monoclonal de ratón (1 : 200; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY) durante 4 días a 4 °C en 3,5 % de suero de burro con 0,1 % de Tween TBS. Las secciones se lavaron entre cada etapa posterior con 0,1 % de Tween en TBS. Las secciones se incubaron posteriormente con anticuerpos anti-cabra policlonales de burro conjugados con CyTM3 (1 : 400; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y anticuerpos anti-ratón policlonales de burro conjugados con CyTM2 (1 : 400; Jackson ImmunoResearch) durante 1 h a temperatura ambiente en 3,5 % de suero de burro con 0,1 % de Tween TBS. Las secciones se lavaron tres veces durante 10 min en 0,1 % de Tween TBS y se montaron en medio de montaje Fluoromount GTM (SouthernBiotech, Birmingham, AL). La especificidad de la tinción se comprobó en incubaciones de control realizadas en ausencia del anticuerpo primario.

Todos los recuentos se realizaron usando el software ImageJ v1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Las imágenes de color se tiñeron usando el software Imagen Pro-Plus, donde se aplicaron ajustes de brillo, contraste y equilibrio de color idénticos a todos los grupos.

Microscopía

Se recogieron todas las imágenes de inmunofluorescencia con una cámara CCD (QImaging Retiga 2000R Fast, Cooled Mono 12 bit) montada en un microscopio Olympus (BX51) usando el software Imagen Pro-Plus v6.0 (MediaCybernetics Inc., Bethesda, MD) con aumentos de x40 (objetivo 4X Olympus UPlan FL N 0.13), 100 (objetivo 10X Olympus UPlan FL N 0.3), 200 (objetivo 20X Olympus FL N 0.5), 400 (objetivo 40X Olympus UPlan FL N 0.75), 600 (objetivo 60X Olympus UPlanS Apo 1.35 oil) y 1000 (objetivo 100X Olympus UPlanS Apo 1.4 oil).

Análisis de proteína y de transferencia Western

Se homogeneizaron muestras de médula espinal lumbar ventral (2 a 5 mg) en 100 µl/5 mg de tejidos de tampón RIPA frío en hielo (Tris HCl 50 mM a pH=8,0, NaCl 150 mM, 0,1 % de SDS, 0,5 % de desoxicolato de sodio, 1 % de NP40, EDTA 5 mM a pH 8,0, PMSF 2 mM (fluoruro de fenil-metilsulfonilo, Sigma-Aldrich), 50 µg/ml de leupeptina, 50 µg/ml de pepstatina A y 50 µg/ml de aprotinina). La concentración de proteína de los homogeneizados clarificados (4 °C, 15 min, 13.500 rev.min⁻¹) se determinó en todas las muestras usando el ensayo de proteínas de Bradford (Biorad Laboratories, CA). Se sometieron 10 µg de muestras de proteína para análisis de SMN y 30 µg de muestras para otros análisis de cada homogeneizado a electroforesis en 12,5 % de SDS-PAGE (Tris 1,5 M a pH 8,3, 12,5 % de acrilamida, 0,07 % de Bis, 0,1 % de SDS, 0,05 % de APS, 0,06 % de TEMED). Las proteínas separadas se transfirieron sobre membranas de PVDF (Biorad) según Towbin et al.²⁷. Se comprobó la carga igual de muestras por tinción con colorante de Ponceau de los geles transferidos. El análisis de transferencia Western se realizó sobre membranas durante la noche a 4 °C en 4 % de BSA, 0,05 % de Tween 20, TBS a pH 7,4. Se incubó cada uno de los siguientes anticuerpos primarios, que incluyen anti-SMN monoclonal de ratón (1 : 5.000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-Ser473 fosfo-AKT policlonal de conejo (1 : 1000; Cell Signaling Technology, Inc, Boston, MA), anti-fosfo-ERK1/2 policlonal de conejo (1 : 500; Cell Signaling, Inc.), anti-Ser133 fosfo-CREB policlonal de conejo (1 : 1.000; Millipore), anti-Ser183 fosfo-Elk-1 monoclonal de ratón (1 : 1.000; Santa Cruz Biotechnology, Inc) durante la noche a 4 °C en el medio de bloqueo anterior. Las membranas se aclararon en 0,1 % de Tween 20 en TBS durante 3 x 10 min a temperatura ambiente y luego se incubaron en anticuerpo secundario de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra inmunoglobulinas de ratón (1 : 5.000; Biorad Laboratories, CA) y en anticuerpo secundario de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra inmunoglobulinas de conejo (1 :

10.000; Jackson ImmunoResearch) en 0,1 % de Tween 20 en TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Los complejos unidos a anticuerpo se desarrollaron usando el sistema ECL (Amersham Biotech., Saclay, Francia) y se expusieron a película de rayos X Hyperfilm ECL-Plus (Amersham Biotech).

5 En algunos casos, las membranas se separaron después de la inmunotransferencia con fosfo-AKT, fosfo-ERK1/2, fosfo-CREB y fosfo-Elk-1 por incubación en tampón de separación (β -mercaptoetanol 100 mM, 2 % de SDS, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7) durante 30 min a 55 °C con agitación, y entonces las membranas se bloquearon y se volvieron a sondear con anti-AKT policlonal de conejo (1 : 1.000; Cell Signaling, Inc.), anti-ERK1/2 policlonal de conejo (1 : 500; Cell Signaling, Inc.), anti-CREB policlonal de conejo (1 : 1.000; Millipore), anti-Elk-1 monoclonal de ratón (1 : 1.000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anticuerpo anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa monoclonal de ratón (GAPDH) (1 : 5.000; Chemicon). Las películas se cuantificaron con ImageJ v1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) y los resultados se informaron como medias \pm EEM.

15 *Inmunoprecipitación de cromatina*

Se cortaron en trozos pequeños con un bisturí muestras de la médula espinal lumbar ventral y se fijaron durante 15 min con 1 % de formaldehído. Los tejidos se lavaron 3 veces en PBS frío que contenía inhibidores de la proteasa (PMSF 2 mM, 50 μ g/ml de leupeptina, 50 μ g/ml de pepstatina A y 50 μ g/ml de aprotinina) y se recogieron por centrifugación. Se resuspendió el sedimento de células y se incubó sobre hielo durante 10 min en 300 μ l de tampón de lisis (ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico) 5 mM (PIPES) a pH 8,0, KCl 85 mM, 0,5 % de NP-40) e inhibidores de la proteasa. Las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en 300 μ l de 1 % de SDS, EDTA 10 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía inhibidores de la proteasa. Después de la incubación sobre hielo durante 10 min, las células se sonicaron 6 veces durante 30 s usando Bioruptor (Diagenode, Filadelfia, PA). Los lisados se aclararon por centrifugación y se determinó la concentración de ADN usando un espectrofotómetro NanoDrop. Se incubaron perlas ChIP-Adem (Ademtech SA, Pessac, Francia) durante 15 min a temperatura ambiente con tampón de bloqueo en una rueda giratoria. Las perlas se resuspendieron en 125 μ l de tampón de dilución ChIP (0,01 % de SDS, 1 % de Triton X100, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM (pH 8,1)) y después de una incubación de 1 h, se añadieron cantidades iguales de ADN diluidas 10 veces en tampón de dilución. El ADN se incubó durante la noche a 4 °C en una rueda giratoria con 1 μ g de los siguientes anticuerpos: anti-Ser133 fosfo-CREB policlonal de conejo (Millipore), anti-Ser183 fosfo-Elk-1 monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-acetil-histona H3 Lys9 policlonal de conejo (Millipore) y anti-acetil-histona H4 Lys 8 policlonal de conejo (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY). Las perlas se lavaron secuencialmente en TSE (0,1 % de SDS, 1 % de Triton X100, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,1) con NaCl 150 mM, TSE con NaCl 500 mM, tampón A (LiCl 0,25 M, 1 % de NP-40, 1 % de desoxicolato, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,1), y 2 veces con tris-EDTA y luego se eluyeron con 200 μ l de 1 % de SDS y NaHCO₃ 0,1 M. Las reticulaciones se invirtieron calentando a 65 °C durante 4 h después de añadir NaCl hasta la concentración final de 200 mM. Después del tratamiento con proteinasa K (50 μ g/ml) durante 1 h a 37 °C, se purificó ADN usando el kit GeneClean Turbo (Q-Biogene, MP Biomedicals, Illkirch, Francia). Se realizó el análisis por PCR en tiempo real de entradas o ADN inmunoprecipitados.

40 *Análisis por PCR en tiempo real cuantitativa*

Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real con protocolos convencionales usando SYBR®Green ROX Mix (ABgene, Courtaboeuf, Francia) como colorante de detección fluorescente en ABI PRISM® 7000 en un volumen final de 10 μ l que también contenía 300 nM de cebadores (Operon, Cologne, Alemania).

45 Las cantidades relativas de ADN en muestras se determinaron basándose en el ciclo umbral para cada producto de PCR (Ct).

50 *Análisis estadístico.*

Todos los valores se presentan como medias y error estándar de la media (EEM) en cada grupo (Systat v 8.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Se realizó el análisis estadístico y la comparación entre grupos se hizo usando ANOVA y prueba a posteriori LSD. El análisis de supervivencia se realizó usando análisis de Kaplan-Meier.

55 *Resultados*

El modo de acción de las moléculas terapéuticas para el tratamiento de SMA puede incluir el aumento de la expresión de SMN, particularmente en las neuronas motoras mediante la activación del promotor de SMN2, aumentando la inclusión del exón-7 en transcritos de SMN, o prolongando la semivida de ARNm o proteína de SMN. También puede incluir la promoción de la supervivencia de neuronas motoras mediante la activación de vías anti-apoptóticas. Con los años, varios grupos han identificado compuestos inductores del gen *SMN2* usando fibroblastos cultivados derivados de pacientes con SMA, y cuyos beneficios fueron frecuentemente adicionalmente probados *in vivo* en modelos de ratón con SMA⁵. Entre aquellos, se identificaron compuestos inductores de SMN basándose en su supuesta capacidad para aumentar la expresión génica general, tal como los inhibidores de histona desacetilasa^{6, 7, 8}, o por cribados de alto rendimiento, tales como derivados de quinazolina^{9, 10}. Desafortunadamente, hasta la fecha, muchos de estos compuestos fueron decepcionantes en ensayos clínicos sin beneficio clínico sustancial

demostrado^{11, 12, 13}. Por último lugar, ninguno de estos compuestos proporciona posibilidades antiapoptóticas eficientes de las neuronas motoras.

Un desarrollo terapéutico prometedor hasta ahora inexplorado para SMA podría implicar la corrección farmacológica de mecanismos moleculares, específicamente alterados en el sistema neuromuscular de SMA, posiblemente capaces de modular tanto la expresión de SMN como la supervivencia de neuronas motoras, o ambas. En este contexto, los inventores prestaron atención adicional al patrón de activación de la vía de señalización AKT/CREB. Constitutivamente regulada por disminución en médula espinal de ratón con SMA, la vía AKT/CREB es capaz de aliviar sorprendentemente los síntomas de SMA en ratones en tanto que sea reactivada¹⁴. En cada ratón similar a SMA grave¹⁵, la reactivación de la vía AKT/CREB por NMDA produjo un aumento en la cantidad total de transcritos de SMN en la médula espinal con SMA sin modificar su patrón de corte y empalme, sugiriendo una regulación del gen SMN2 al nivel transcripcional¹⁴. Además, considerada como una vía antiapoptótica común y poderosa¹⁶ en particular para las neuronas motoras espinales¹⁷, la activación de la vía AKT/CREB probablemente representa una pista importante para la resistencia de las neuronas motoras a la muerte celular en médula espinal con SMA. Así, el identificar agentes terapéuticos que podrían conducir a la reactivación de la vía AKT/CREB en médula espinal con SMA es de importancia primordial.

De forma interesante, el perfil de activación de otra vía de señalización intracelular importante en neuronas¹⁸, concretamente la vía de señalización de ERK1/2, fue por el contrario opuesto al de AKT en médula espinal con SMA. Constitutivamente activado en exceso en la médula espinal de dos modelos de SMA de ratón grave diferentes, caracterizados por una débil expresión de SMN, ERK1/2 se inhibió cuando AKT se reactiva y este cambio en el equilibrio de activación de ERK/AKT se correlacionó con un aumento en la expresión de SMN¹⁴. Estos datos plantearon cuestiones importantes referentes a 1) las funciones respectivas de las vías de ERK y AKT en la modulación de la expresión del gen SMN2 y 2) las posibles relaciones cruzadas en el perfil de activación de estas dos vías de señalización en médula espinal con SMA.

De forma interesante, el análisis de secuencias del promotor de SMN humano (acceso de GenBank AF187725) reveló que varios sitios de unión de CREB están flanqueados por elementos de respuesta putativos para factores de transcripción que son la diana directa de ERK^{19, 20, 21}, concretamente los factores de transcripción de la familia de ETS Elk-1 (Fig. 1a-b). Aún, el sitio de unión 2 de CREB (+244 a +248 pb), considerado un regulador positivo de la expresión del gen SMN²², también contiene elementos de respuesta putativos para Elk-1 (+356 a +429 pb), que incluyen un sitio de unión para el factor de respuesta del suero (SRF). Los presentes inventores identificaron un sitio de CRE putativo adicional, que los presentes inventores llamaron el sitio 1, que incluye dos sitios de unión de CREB putativos (-2572 a -2569 pb y -2525 a -2522 pb) que también contienen el sitio de unión de SRF putativo (-2556 a -2548 pb). Los experimentos de ChIP mostraron que los dos factores de transcripción se unieron eficazmente a los dos sitios de CRE, pero con una eficacia que se correlacionó con sus niveles de activación. Elk-1, activado por exceso en la médula espinal de ratones parecidos a SMA tipo 1 (Fig. 1c-d), como era de esperar para una diana directa de ERK, presentó una elevada unión sobre los dos sitios de CRE en médula espinal con SMA en comparación con controles (Fig. 1e-f). A diferencia, los experimentos de ChIP revelaron una dramática disminución en la unión de CREB a los dos sitios de CRE (Fig. 1g-h). De forma interesante, la relación de la unión de CREB y Elk-1 sobre los sitios de CRE se invirtió completamente en médula espinal con SMA cuando la expresión de SMN se promueve, es decir, después de una activación directa del receptor de NMDA (Fig. 1e-h). Para conocer más sobre la posible función de Elk-1 en el control de la expresión del gen SMN2, los presentes inventores analizaron por ChIP los perfiles de acetilación de histonas H3 y H4 en los dos sitios de CRE en la médula espinal de ratones con SMA y de control. El reclutamiento de Elk-1 a los dos sitios de CRE se correlacionó con una marcada disminución de la acetilación de H3 y H4, en comparación con controles, mientras que el reclutamiento de CREB indujo un marcado aumento de la acetilación de H3 y H4 (Fig. 1i-l). Tomados conjuntamente, estos resultados sugirieron que la activación de la vía ERK/Elk-1 produjo la represión de la expresión del gen SMN2 en médula espinal con SMA, contrastando con los resultados encontrados en un contexto neuronal de SMA²³.

Por tanto, podría especularse que la inhibición de la vía de ERK anularía la inhibición inducida por Elk-1 de la transcripción del gen SMN2 y, por consiguiente, conduciría a un aumento de la expresión de SMN en la médula espinal con SMA. Para probar esta hipótesis, una población de ratones parecidos a SMA tipo 1 se trató diariamente desde el nacimiento por inyección intratecal de U0126, un inhibidor específico de MAPK cinasa (MEK). La inhibición de ERK *in vivo*, que indujo una marcada disminución de la activación de Elk-1 en SMA (Fig. 2a-b), produjo un aumento sorprendente en la concentración de proteína SMN en la médula espinal de ratones parecidos a SMA tipo 1 (Fig. 2c-d). Estos datos se enfatizan adicionalmente por el aumento significativo de géminis de los cuerpos enrollados (gems) en los núcleos de las neuronas motoras de ratones parecidos a SMA tratados con U0126 (datos no mostrados y Fig. 2e). Inesperadamente, la inhibición de ERK produjo una activación significativa de AKT (Fig 2f-g) y CREB (Fig 2h-i) en médula espinal con SMA, que probablemente actúa sinérgicamente con la inhibición de Elk-1 para aumentar la expresión de SMN. De acuerdo con los hallazgos de los inventores en ratones parecidos a SMA, la inhibición de la vía de ERK por U0126 en cultivo de miotubos de músculos paravertebrales de pacientes con SMA tipo 2 produjo un aumento significativo de la expresión de SMN (Fig. 2j-k).

Con el fin de confirmar esta hipótesis de comunicación cruzada al nivel de las cinasas ERK y AKT en las cascadas de señalización, los presentes inventores probaron *in vitro* los efectos de la inhibición de CREB sobre el perfil de

activación de la vía ERK/Elk-1 en un contexto de SMA en el que la vía de AKT se activó significativamente, es decir, tras la activación del receptor de NMDA. Los presentes inventores encontraron que la inhibición de CREB produjo la activación de ERK1/2 (Fig. 3a-b) y Elk-1 (Fig. 3c-d) como se supuso. Más sorprendentemente, la inhibición de CREB produjo una inhibición significativa de AKT (Fig. 3e-f), sugiriendo una retroalimentación negativa del factor de transcripción a su cinasa activante. La activación concomitante de la vía ERK/Elk-1 y la inhibición de la vía AKT/CREB produjo de forma esperada una disminución significativa en la expresión de SMN (Fig. 3g-h). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren encarecidamente la existencia de un equilibrio dinámico entre las vías de ERK y AKT en médula espinal con SMA. Este equilibrio podría ser desplazado por bloqueos recíprocos, abriendo así una forma prometedora para reactivar la vía AKT/CREB en médula espinal con SMA.

Finalmente, la inhibición de ERK *in vivo* produjo una mejora sorprendente en el fenotipo y la supervivencia de ratones parecidos a SMA graves en comparación con los homólogos tratados con vehículo. La supervivencia media aumentó de $1,60 \pm 0,48$ días para los ratones parecidos a SMA tratados con vehículo a $4,13 \pm 1,07$ días para los ratones tratados con U0126 (Fig. 4a), representando un aumento de 2,5 veces en la esperanza de vida ($p < 0,01$), que sigue siendo, hasta la fecha, el mejor tratamiento farmacológico nunca informado en este modelo de ratón con SMA. Además, el tratamiento con U0126 condujo a un aumento significativo y progresivo en el peso corporal de ratones parecidos a SMA, hasta la muerte (Fig. 4b). Estos beneficios se asociaron al significativo aumento en el número y la superficie de neuronas motoras en la médula espinal lumbar de ratones parecidos a SMA tratados con U0126 en comparación con placebos (Fig. 4c-h).

Estos resultados dieron pie a los presentes inventores a probar si un inhibidor de MEK previamente autorizado podría proporcionar los mismos efectos de U0126 sobre la expresión de SMN y la esperanza de vida similar a SMA grave. Los presentes inventores eligieron probar un nuevo fármaco, selumetinib (AZD6244), un inhibidor específico de MEK muy conocido, que está actualmente en ensayo clínico de fase II⁴, probado satisfactoriamente en Pediatric Preclinical Testing²⁴. De forma esperada, el tratamiento con selumetinib oral reprodujo los efectos obtenidos con U0126, que incluye una activación de la expresión de SMN en la médula espinal de ratones con SMA (Fig. 4i-j), una activación de AKT (Fig. 4k-l) y un aumento sorprendente en la esperanza de vida de ratones con SMA (Fig. 4m) asociada a un aumento progresivo de peso corporal (Fig. 4n).

Tomados conjuntamente, todos estos resultados indican que la inhibición farmacológica de la vía de ERK, en particular mediante el uso de selumetinib, podría considerarse un tratamiento eficaz para aliviar los síntomas de SMA en pacientes.

Referencias

- 1- Crawford, T.O. & Pardo, C.A. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 3, 97-110 (1996).
- 2- Lefebvre, S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155-165 (1995).
- 3- Lorson, C.L. & Androphy, E.J. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.* 9, 259-265 (2000).
- 4- Board, R.E. et al. Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study. *Br. J. Cancer* 101, 1724-1730 (2009).
- 5- Lorson, C.L., Rindt, H. & Shababi, M. Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Hum. Mol. Genet.* 19, R111-118 (2010).
- 6- Chang, J.G. et al. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9808-9813 (2001).
- 7- Avila, A.M. et al. Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 659-671 (2007).
- 8- Tsai, L.K., Tsai, M.S., Ting, C.H. & Li, H. Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J. Mol. Med.* 86, 1243-1254 (2008).
- 9- Thurmond, J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy. *J. Med. Chem.* 51, 449-469 (2008).
- 10- Butchbach, M.E. et al. Effect of diet on the survival and phenotype of a mouse model for spinal muscular atrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 835-840 (2010).
- 11- Mercuri, E. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* 68, 51-55 (2007).
- 12- Swoboda, K.J. et al. Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 4, e5268. (2009).
- 13- Swoboda, K.J. et al. Project Cure Spinal Muscular Atrophy Investigators Network. SMA CARNI-VAL trial part I: double-blind, randomized, placebo-controlled trial of L-carnitine and valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 5, e12140 (2010).
- 14- Biondi, O. et al. *In vivo* NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J. Neurosci.* 30, 11288-11299 (2010).
- 15- Monani, U.R. et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality

- in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9, 333-339 (2000).
- 16- Dudek, H. et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT. *Science* 275, 661-665 (1997).
- 5 17- Soler, R.M. et al. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J. Neurosci.* 19, 9160-9169 (1999).
- 18- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331 (1995).
- 10 19- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D. & Davis, R.J. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269, 403-407 (1995).
- 20- Yang, S.H., Shore, P., Willingham, N., Lakey, J.H. & Sharrocks, A.D. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* 18, 5666-5674 (1999).
- 21- Zhang, H.M. Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic Acids Res.* 36, 2594-2607 (2008).
- 15 22- Majumder, S. et al. Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J. Biol. Chem.* 279, 14803-14811 (2004).
- 23- Demir, O. et al. ETS-domain transcription factor Elk-1 mediates neuronal survival: SMN as a potential target. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 652-662. (2011).
- 20 24- Kolb, E.A, et al. Initial testing (stage 1) of AZD6244 (ARRY-142886) by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr. Blood Cancer* 55, 668-677 (2010).
- 25- Kobayashi, T., Askanas, V. & Engel, W.K. Human muscle cultured in monolayer and cocultured with fetal rat spinal cord: importance of dorsal root ganglia for achieving successful functional innervation. *J. Neurosci.* 7, 3131-3141 (1987).
- 25 26- Bigot, A. et al. Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am. J. Pathol.* 174, 1435-1442 (2009).
- 27- Towbin, H., Schoenenberger, C., Ball, R., Braun, D.G. & Rosenfelder, G. Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J. Immunol. Methods.* 72, 471-479 (1984).

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université Paris Descartes

35 <120> Inhibidores de ERK para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal

<130> UPD 0001

<160> 4

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 393

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 597 052 T3

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15

Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30

Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45

Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60

Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95

Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110

Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125

Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140

His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160

Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175

Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190

ES 2 597 052 T3

Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
 195 200 205

Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
 210 215 220

Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
 225 230 235 240

Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
 245 250 255

Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
 260 265 270

Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
 275 280 285

Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
 290 295 300

Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
 305 310 315 320

Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
 325 330 335

Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
 340 345 350

Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
 355 360 365

Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
 370 375 380

Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
 385 390

<210> 2
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Leu Ala Arg Arg Lys Pro Val Leu Pro Ala Leu Thr Ile Asn Pro
 1 5 10 15

5

10

ES 2 597 052 T3

Thr Ile Ala Glu Gly Pro Ser Pro Thr Ser Glu Gly Ala Ser Glu Ala
 20 25 30
 Asn Leu Val Asp Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu
 35 40 45
 Gln Gln Lys Lys Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Ala Lys Val
 50 55 60
 Gly Glu Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Arg Ile Ser Glu Leu Gly Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Val Val Thr Lys Val Gln His Arg Pro Ser Gly Leu
 85 90 95
 Ile Met Ala Arg Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg
 100 105 110
 Asn Gln Ile Ile Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro
 115 120 125
 Tyr Ile Val Gly Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser
 130 135 140
 Ile Cys Met Glu His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Arg Ile Pro Glu Glu Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala
 165 170 175
 Val Leu Arg Gly Leu Ala Tyr Leu Arg Glu Lys His Gln Ile Met His
 180 185 190
 Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile
 195 200 205
 Lys Leu Cys Asp Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala
 210 215 220
 Asn Ser Phe Val Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ala Pro Glu Arg Leu Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr His Tyr Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser
 245 250 255
 Leu Val Glu Leu Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala
 260 265 270
 Lys Glu Leu Glu Ala Ile Phe Gly Arg Pro Val Val Asp Gly Glu Glu

ES 2 597 052 T3

	275		280		285														
Gly	Glu	Pro	His	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro				
290						295					300								
Val	Ser	Gly	His	Gly	Met	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Met	Ala	Ile	Phe	Glu				
305					310					315					320				
Leu	Leu	Asp	Tyr	Ile	Val	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly				
				325					330					335					
Val	Phe	Thr	Pro	Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Val	Asn	Lys	Cys	Leu	Ile	Lys				
			340					345					350						
Asn	Pro	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Leu	Lys	Met	Leu	Thr	Asn	His	Thr	Phe				
		355					360					365							
Ile	Lys	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Gly	Trp	Leu	Cys				
	370					375					380								
Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Asn	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Thr	Arg	Thr	Ala	Val				
385					390					395					400				

- <210> 3
- <211> 379
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 3

ES 2 597 052 T3

Met Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Gly Gly Gly Glu Pro Arg Arg
 1 5 10 15

Thr Glu Gly Val Gly Pro Gly Val Pro Gly Glu Val Glu Met Val Lys
 20 25 30

Gly Gln Pro Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Gln Leu Gln Tyr Ile
 35 40 45

Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Ser Ser Ala Tyr Asp His Val Arg
 50 55 60

Lys Thr Arg Val Ala Ile Lys Lys Ile Ser Pro Phe Glu His Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Leu Arg Phe Arg
 85 90 95

His Glu Asn Val Ile Gly Ile Arg Asp Ile Leu Arg Ala Ser Thr Leu
 100 105 110

ES 2 597 052 T3

Glu Ala Met Arg Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp
 115 120 125

Leu Tyr Lys Leu Leu Lys Ser Gln Gln Leu Ser Asn Asp His Ile Cys
 130 135 140

Tyr Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
 145 150 155 160

Asn Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile Asn Thr
 165 170 175

Thr Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ile Ala Asp
 180 185 190

Pro Glu His Asp His Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg
 195 200 205

Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys
 210 215 220

Ser Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser
 225 230 235 240

Asn Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His
 245 250 255

Ile Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile
 260 265 270

Ile Asn Met Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Gln Ser Leu Pro Ser Lys Thr
 275 280 285

Lys Val Ala Trp Ala Lys Leu Phe Pro Lys Ser Asp Ser Lys Ala Leu
 290 295 300

Asp Leu Leu Asp Arg Met Leu Thr Phe Asn Pro Asn Lys Arg Ile Thr
 305 310 315 320

Val Glu Glu Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro
 325 330 335

Thr Asp Glu Pro Val Ala Glu Glu Pro Phe Thr Phe Ala Met Glu Leu
 340 345 350

Asp Asp Leu Pro Lys Glu Arg Leu Lys Glu Leu Ile Phe Gln Glu Thr
 355 360 365

ES 2 597 052 T3

Ala Arg Phe Gln Pro Gly Val Leu Glu Ala Pro
370 375

5 <210> 4
<211> 360
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 597 052 T3

Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Glu Met Val Arg Gly
1 5 10 15

Gln Val Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Asn Leu Ser Tyr Ile Gly
20 25 30

Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Cys Ser Ala Tyr Asp Asn Val Asn Lys
35 40 45

Val Arg Val Ala Ile Lys Lys Ile Ser Pro Phe Glu His Gln Thr Tyr
50 55 60

Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Ile Leu Leu Arg Phe Arg His
65 70 75 80

Glu Asn Ile Ile Gly Ile Asn Asp Ile Ile Arg Ala Pro Thr Ile Glu
85 90 95

Gln Met Lys Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp Leu
100 105 110

Tyr Lys Leu Leu Lys Thr Gln His Leu Ser Asn Asp His Ile Cys Tyr
115 120 125

Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn
130 135 140

Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Leu Asn Thr Thr
145 150 155 160

Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp Pro
165 170 175

Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp
180 185 190

Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Ser
195 200 205

Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser Asn
210 215 220

ES 2 597 052 T3

Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile
 225 230 235 240

 Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile
 245 250 255

 Asn Leu Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His Lys Asn Lys
 260 265 270

 Val Pro Trp Asn Arg Leu Phe Pro Asn Ala Asp Ser Lys Ala Leu Asp
 275 280 285

 Leu Leu Asp Lys Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Glu Val
 290 295 300

 Glu Gln Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Ser
 305 310 315 320

 Asp Glu Pro Ile Ala Glu Ala Pro Phe Lys Phe Asp Met Glu Leu Asp
 325 330 335

 Asp Leu Pro Lys Glu Lys Leu Lys Glu Leu Ile Phe Glu Glu Thr Ala
 340 345 350

 Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser
 355 360

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de ERK para su uso en el tratamiento de atrofia muscular espinal asociada a una deficiencia en un gen de supervivencia de las neuronas motoras (SMN), produciendo dicha deficiencia la pérdida de la función motora, en el que dicho inhibidor de ERK es un compuesto que inhibe la actividad de señalización de MEK ERK1/2 como se mide por la cantidad relativa de proteínas ERK o proteína Elk1 fosforiladas.
- 10 2. El inhibidor de ERK para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha deficiencia que produce la pérdida de la función motora es una mutación genética en el gen SMN1.
3. El inhibidor de ERK para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho inhibidor de ERK es un inhibidor de MEK1/2, preferentemente con una CI50 de al menos 1 μ M, o menos.
- 15 4. El inhibidor de ERK para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho inhibidor de MEK1/2 está seleccionado del grupo que consiste en selumetinib, U0126, PD98059, PD0325901, AZD8330, CI-1040 y PD318088.
5. El inhibidor de ERK para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho inhibidor de ERK está seleccionado del grupo que consiste en selumetinib y sus derivados y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 20 6. El inhibidor de ERK para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho inhibidor de ERK está seleccionado del grupo que consiste en molécula de ácido nucleico tal como ARNip, ARNhp y oligonucleótido antisentido, siendo dicha molécula de ácido nucleico capaz de reducir la expresión de MEK1, MEK2, ERK1 o ERK2.
- 25 7. El inhibidor de ERK para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho inhibidor de ERK se administra por vía oral a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar atrofia muscular espinal.
- 30 8. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de ERK, en combinación con otro componente de principio activo seleccionado del grupo que consiste en ARNip, ARNhp o compuestos antisentido dirigidos contra el ácido nucleico que codifica un producto deficiente en el gen SMN1 que produce la pérdida de la función motora, en el que dicho inhibidor de ERK es un compuesto que inhibe la actividad de señalización de MEK ERK1/2 como se mide por la cantidad relativa de proteínas ERK o proteína Elk1 fosforiladas.



Figura 1

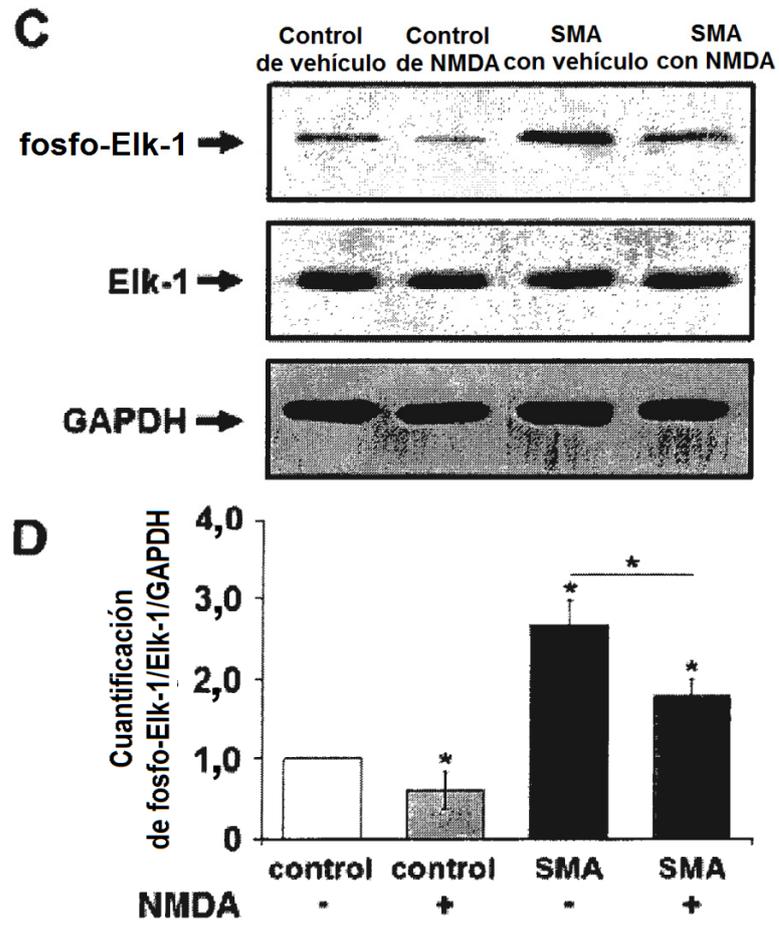


Figura 1

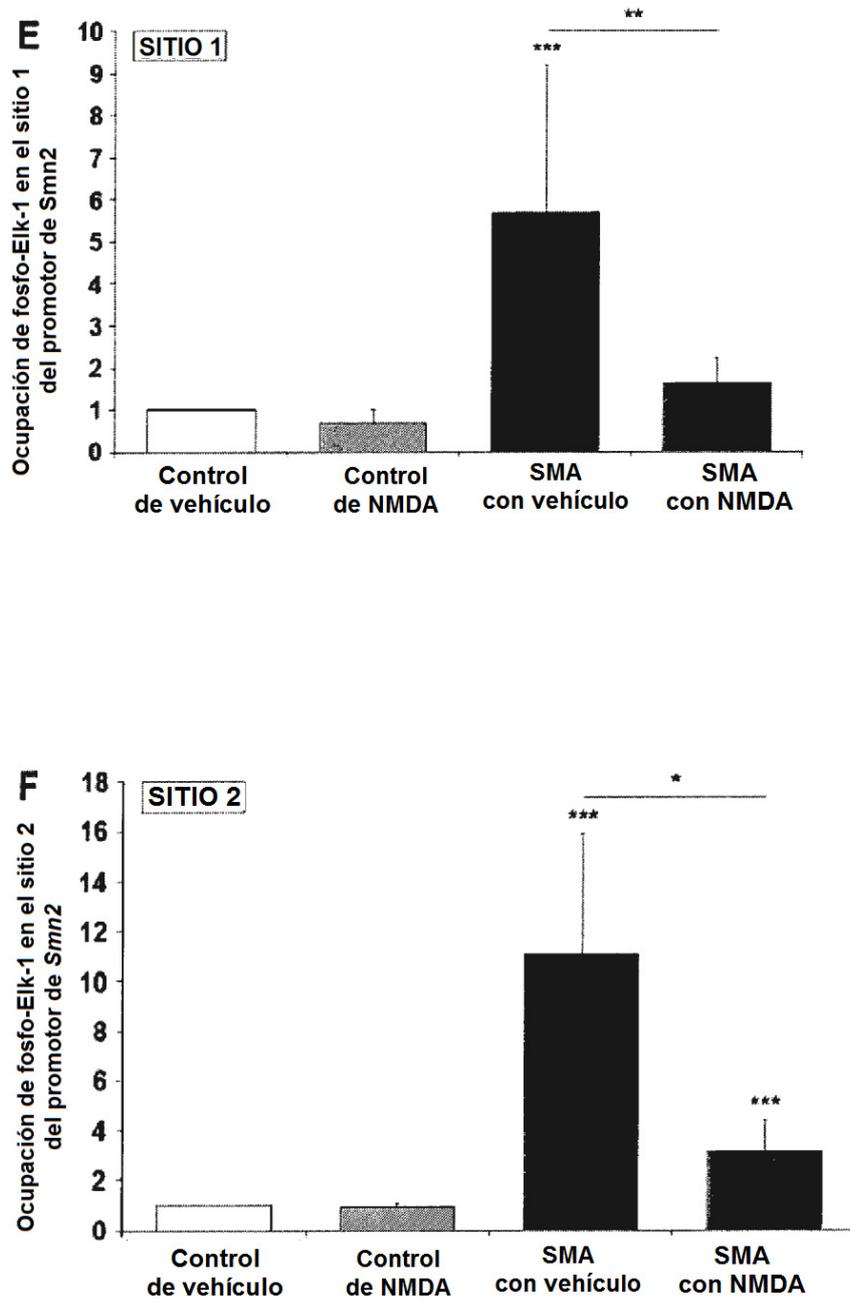


FIGURA 1

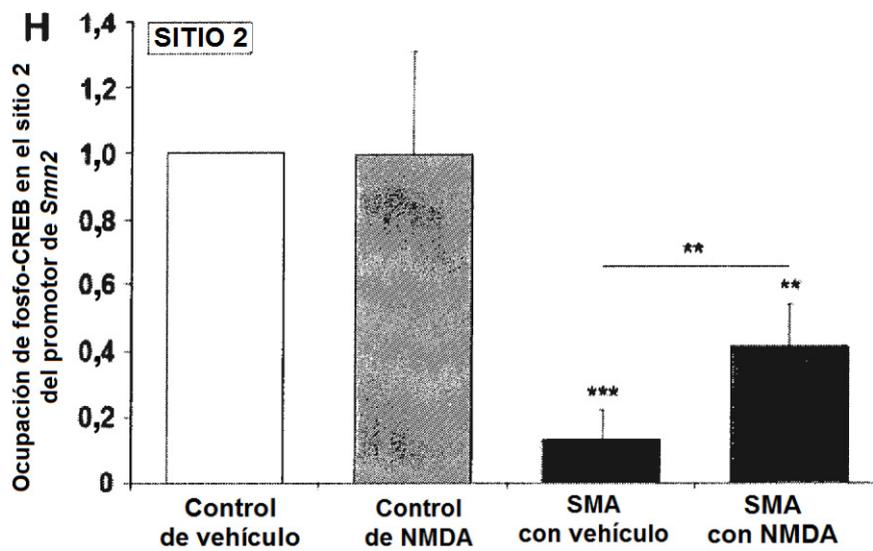
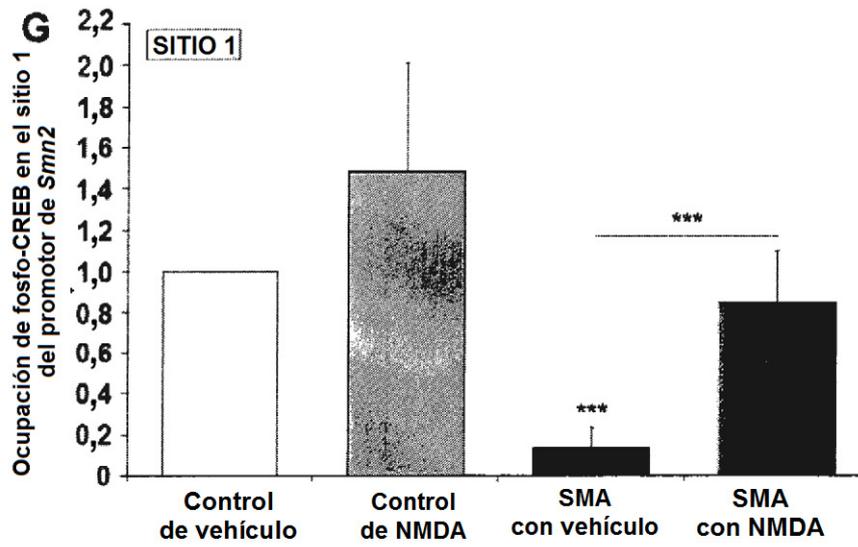


FIGURA 1

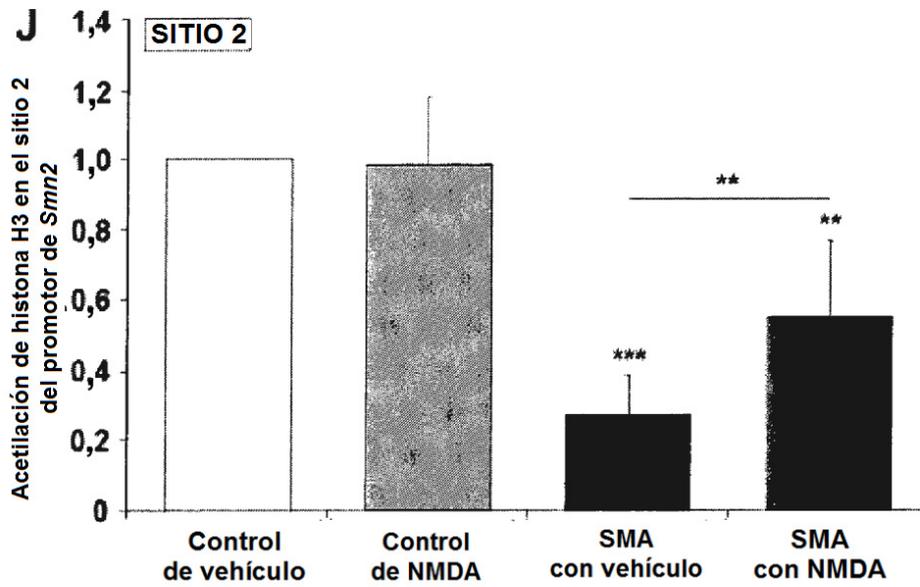
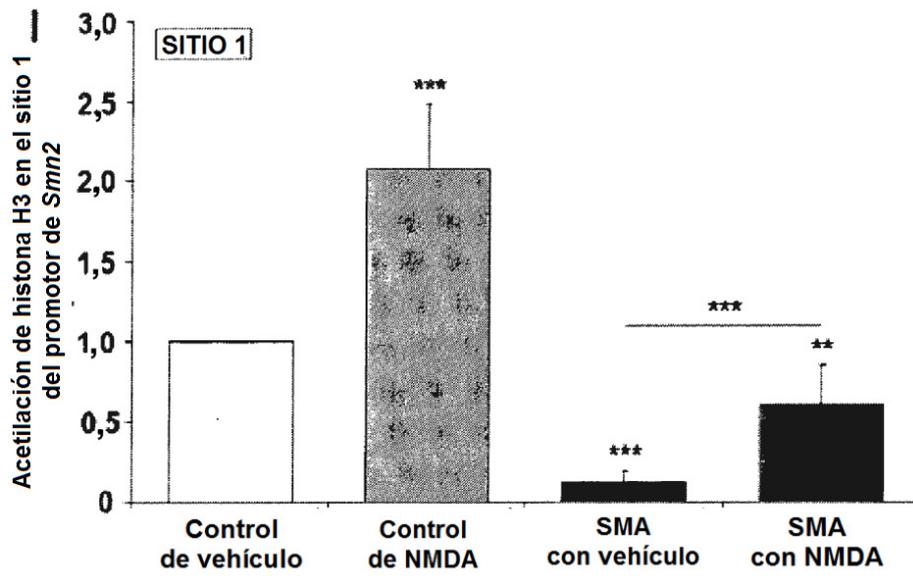


FIGURA 1

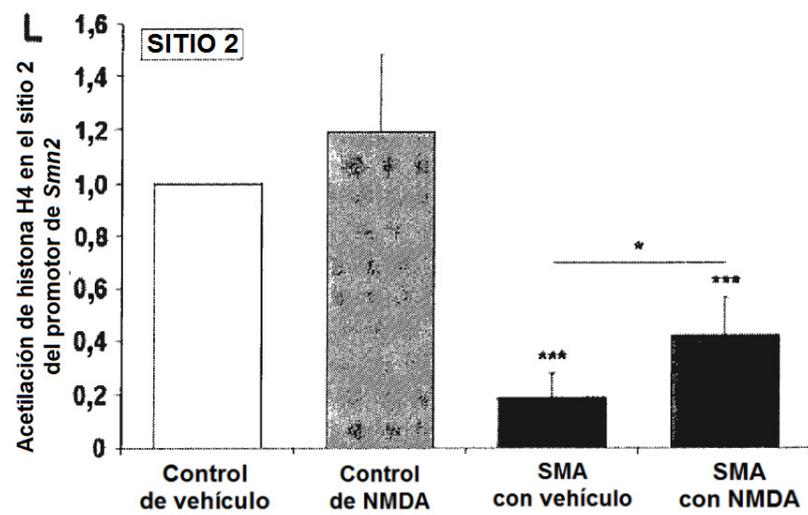
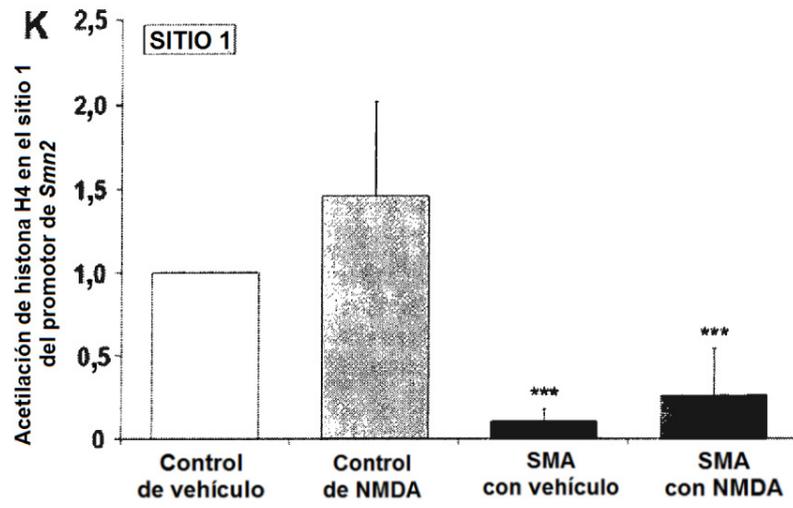


FIGURA 1

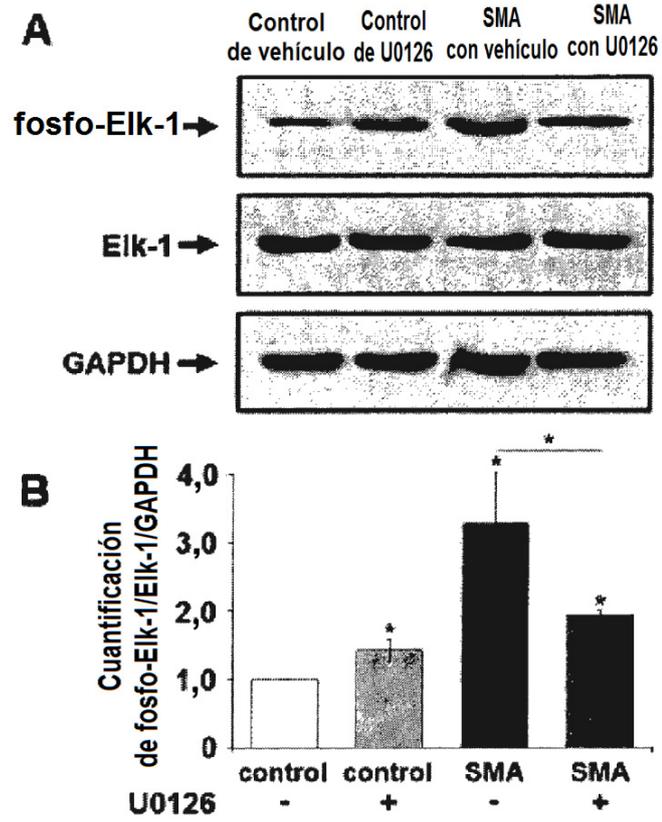


Figura 2

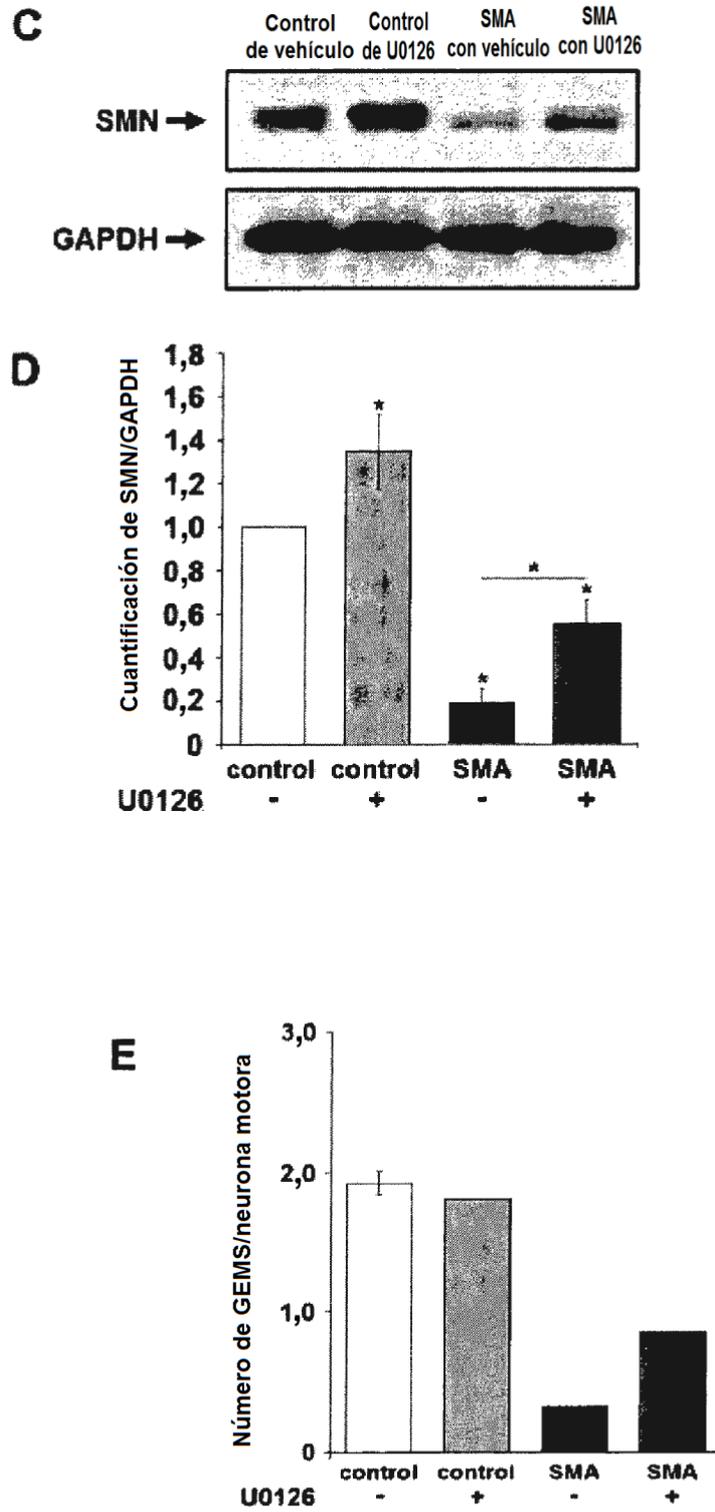


FIGURA 2

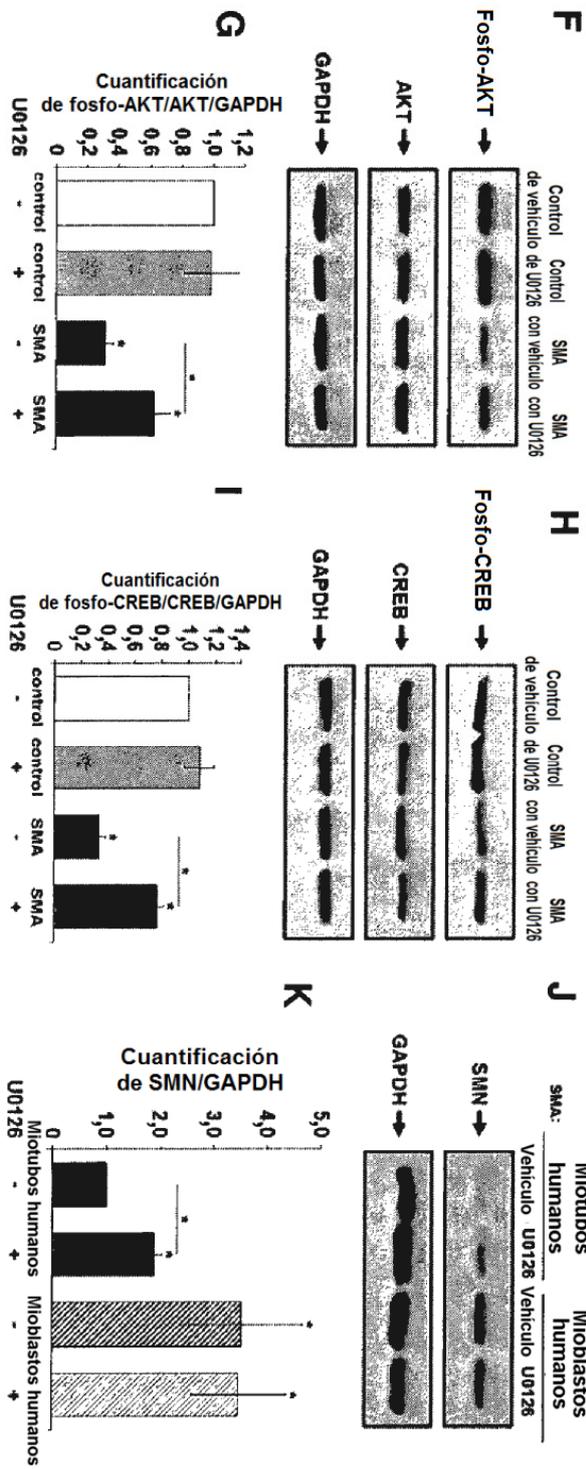


Figura 2

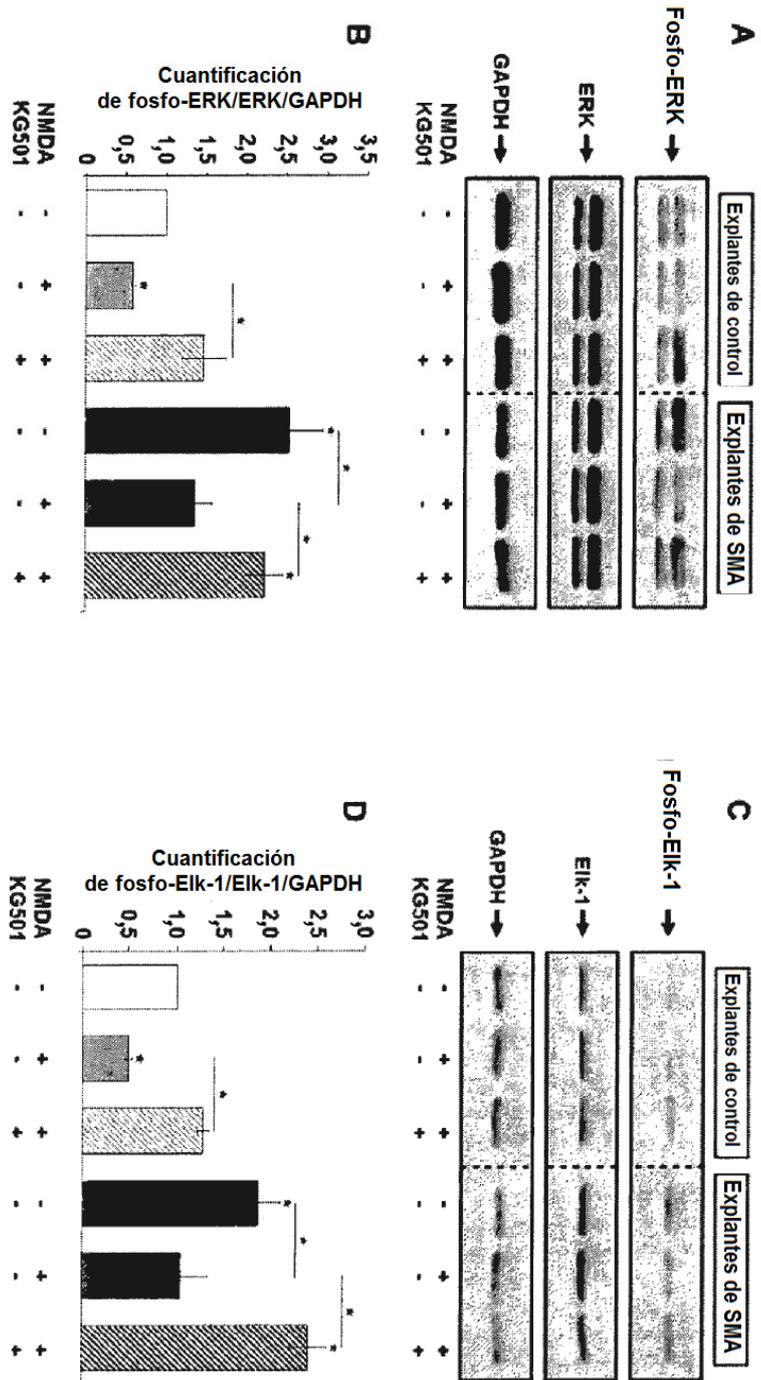


Figura 3

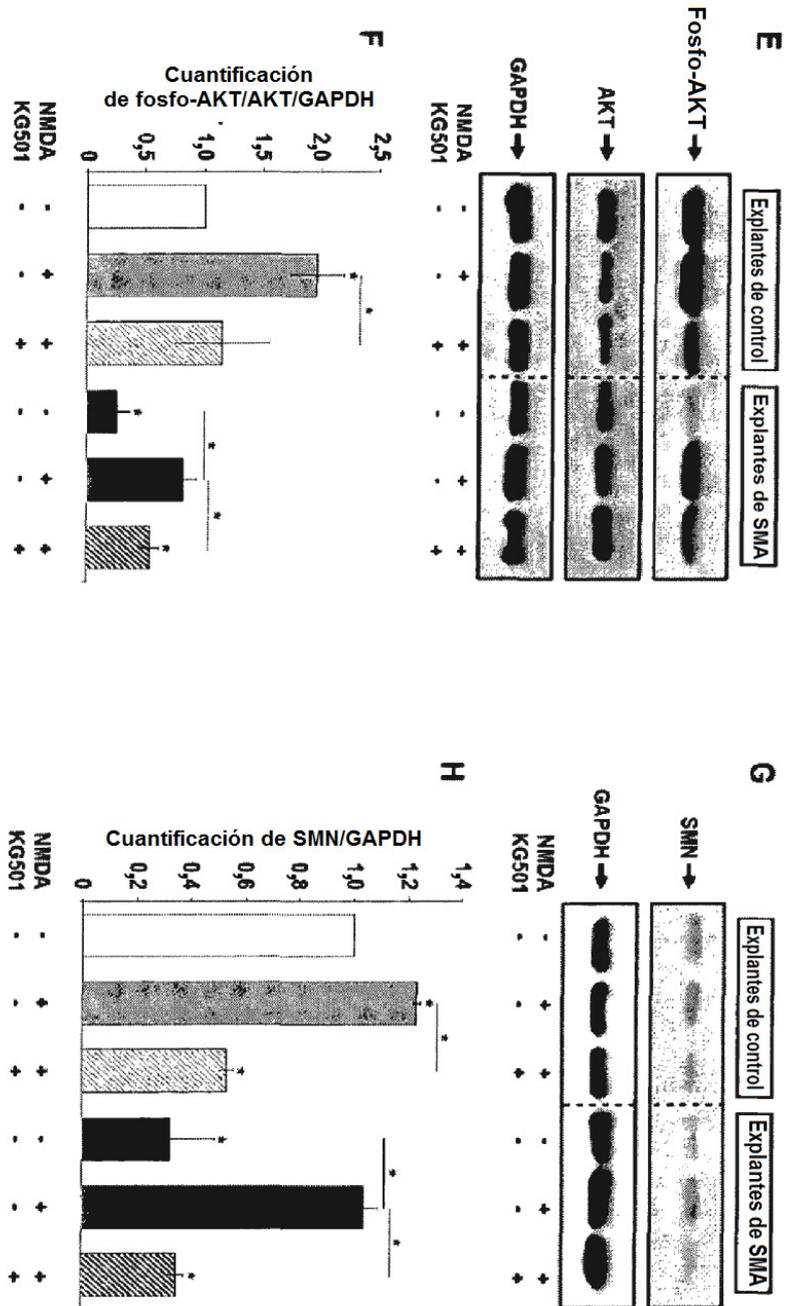


Figura 3

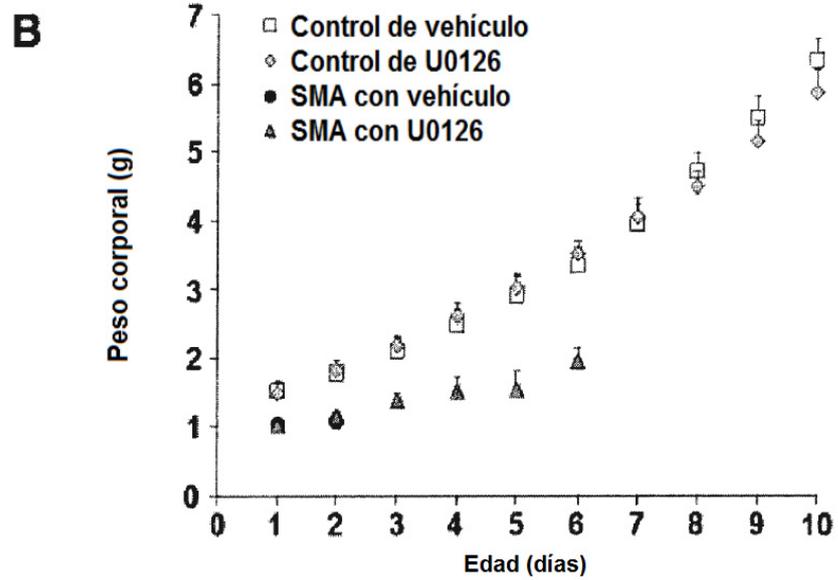
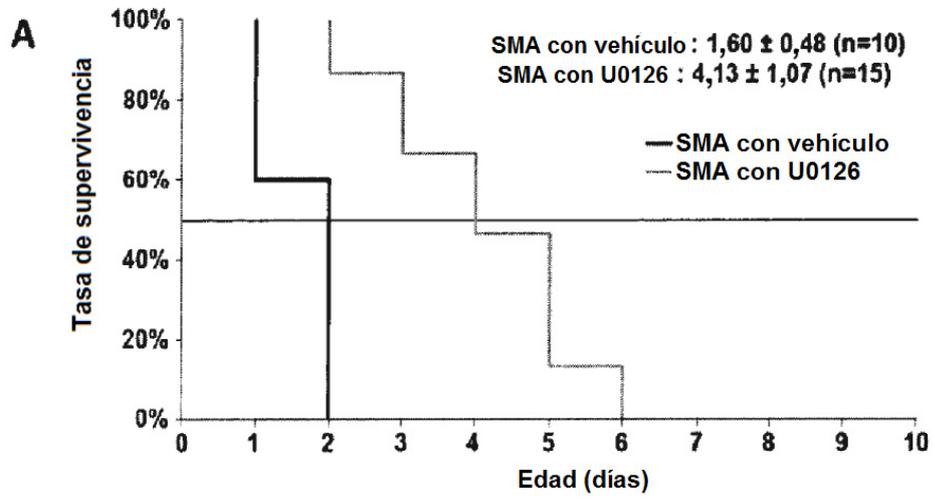


FIGURA 4

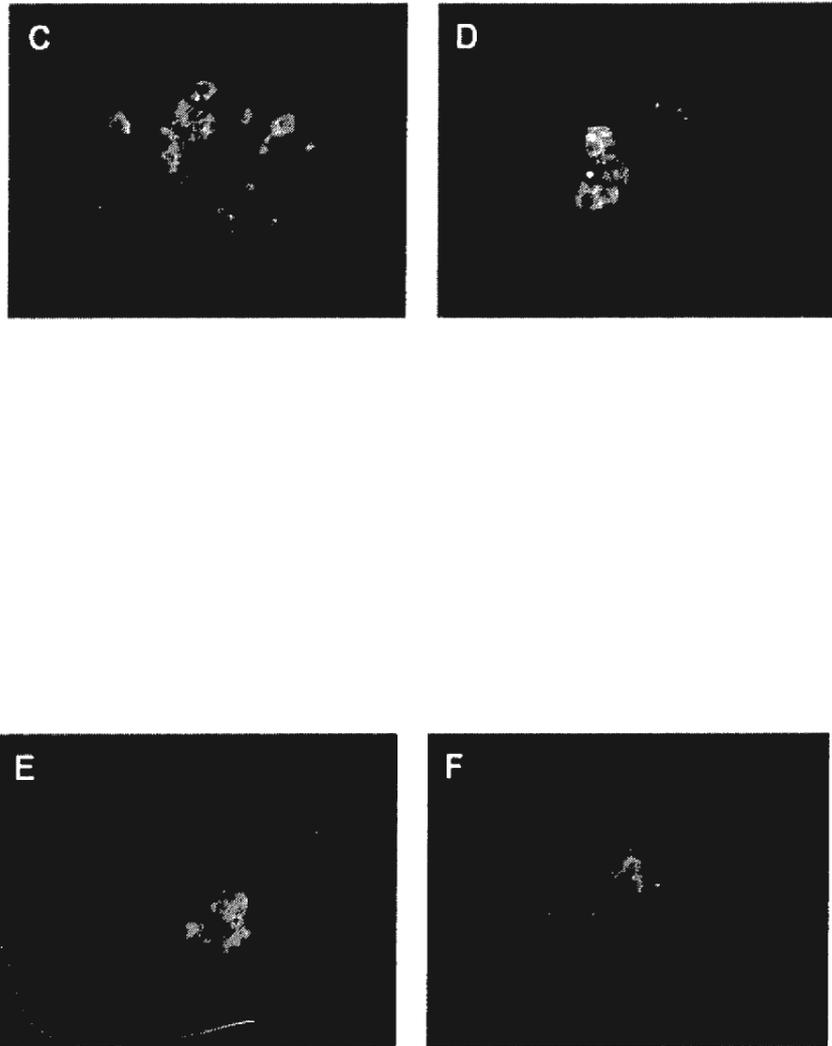


FIGURA 4

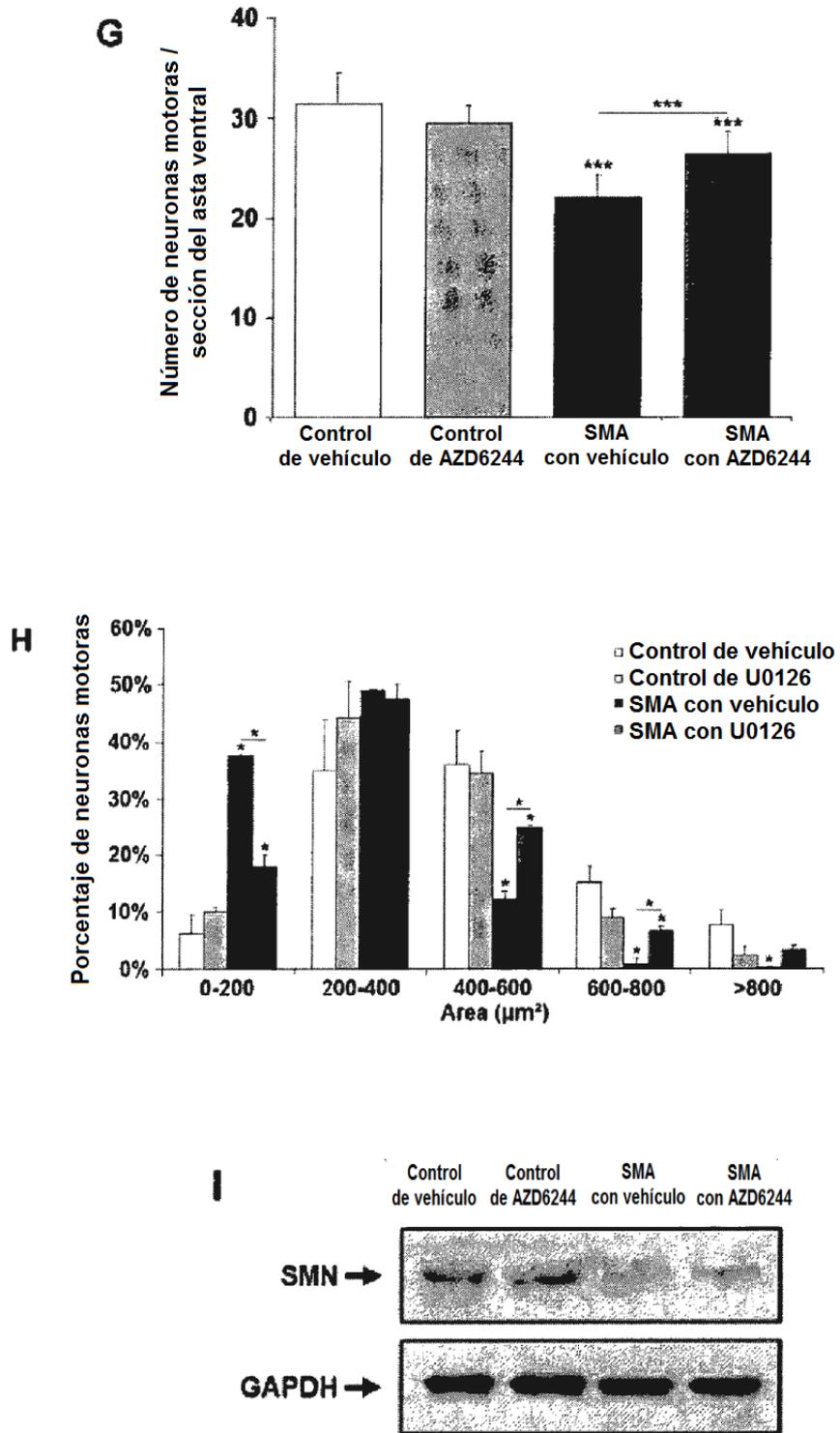


FIGURA 4

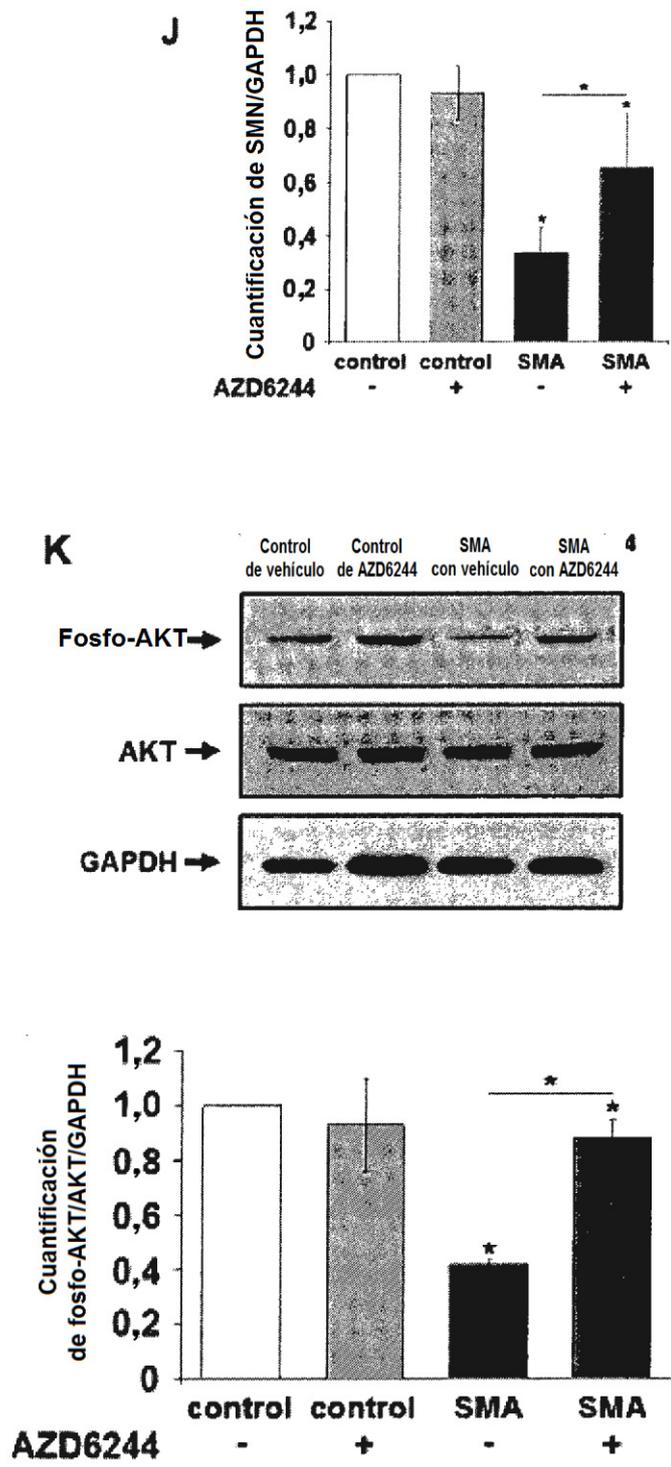


FIGURA 4

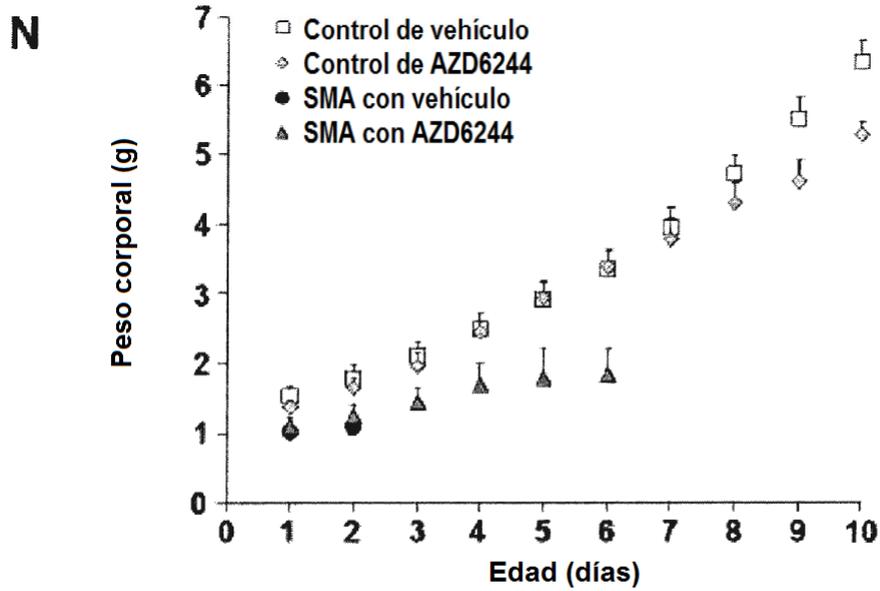
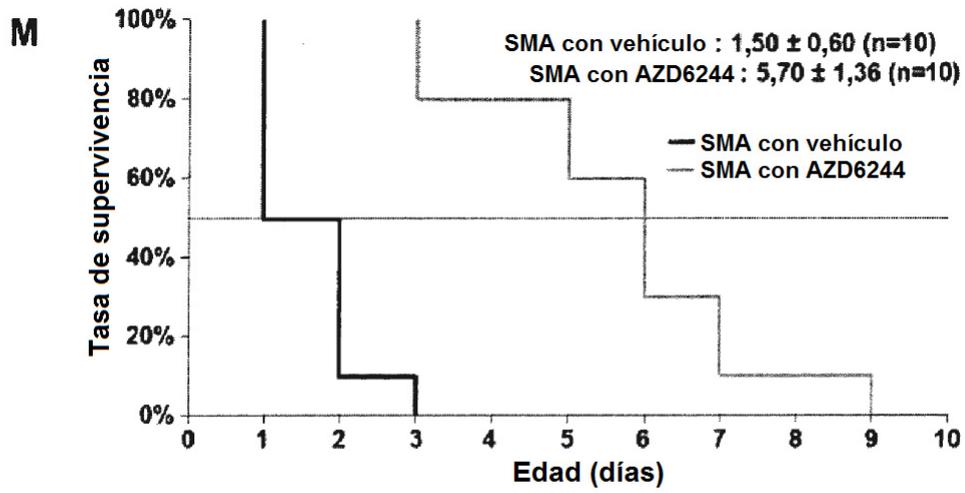


FIGURA 4