

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 587**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 31/444 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2014 PCT/IB2014/063708**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2014 E 14780581 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3030902**

54 Título: **Nuevo método de cribado para el tratamiento de la ataxia de Friedreich**

30 Prioridad:

07.08.2013 EP 13179587

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

20.05.2020

73 Titular/es:

**FRIEDRICH MIESCHER INSTITUTE FOR
BIOMEDICAL RESEARCH (33.3%)**

Maulbeerstrasse 66

4058 Basel, CH;

NOVARTIS AG (33.3%) y

IRM LLC (33.3%)

72 Inventor/es:

BUEHLER, MARC;

MIRAGLIA, LOREN;

MONOVICH, LAUREN GILCHRIST;

ORTH, ANTHONY y

TU, BUU

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 761 587 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

Nuevo método de cribado para el tratamiento de la ataxia de Friedreich

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona un método de cribado y un método para el tratamiento de la ataxia de Friedreich.

10 Antecedentes de la invención

15 La ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa recesiva autosómica causada por la deficiencia de la proteína frataxina mitocondrial (FXN) que da como resultado la represión de la proteína frataxina de unión a hierro (Pandolfo. *J Neurol* 256 Supl 1, 3-8 (2009)). Esta deficiencia es el resultado una hiperexpansión de una repetición de trinucleótidos GAA en el primer intrón del gen FXN, Gottesfeld, J. M. *Pharmacol. Ther.* 116, 236-248 (2007). La expresión reducida de FXN provoca un espectro de defectos patofisiológicos, que incluyen desmielinación y pérdida de la coordinación motora. La FRDA es la causa más común de las ataxias recesivas heredadas en toda Europa y varios estudios epidemiológicos han estimado la prevalencia de la FRDA en 2-3 casos por 100 000 personas en poblaciones caucásicas (/Campuzano, V. *et al. Science* 271, 1423-1427 (1996); Schulz, J.B. *et al. Nat Rev Neurol* 5, 222-234 (2009); Durr, A. *et al. N Engl J Med* 335, 1169-1175 (1996)). A pesar de años de investigación, los mecanismos precisos de la regulación génica de FXN aún se entienden poco y las opciones de tratamiento para la FRDA son limitadas. Las largas repeticiones del triplete GAA no codificante observadas en el intrón 1 del gen FXN en pacientes de FRDA impide la elongación de la transcripción. Por lo tanto, el hecho de superar este bloqueo y reactivar la expresión de FXN es una estrategia terapéutica particularmente atractiva. Además, también se cree que las estrategias que aumentan las tasas de transcripción o aumentan la estabilidad de la proteína FXN son capaces de corregir la deficiencia de proteína FXN en los pacientes de FRDA (Kumari, D., Biacsi, R.E. & Usdin, K. R *The Journal of biological chemistry* 286, 4209-4215 (2011); Tsou, A.Y., Friedman, L.S., Wilson, R.B. & Lynch, D.R. *CNS Drugs* 23, 213-223 (2009); Sturm, B. *et al. Eur J Clin Invest* 35, 711-717 (2005)).

30 Los ensayos basados en células son esenciales para la identificación de reguladores de la expresión génica de FXN susceptibles de ser modulados por fármacos y compuestos de bajo peso molecular que mitigan la deficiencia de FXN. Los intentos anteriores para desarrollar ensayos compatibles con HTS han utilizado secuencias intrónicas artificiales con tramos de GAA extendidos o fusiones indicadoras de FXN (Sarsero, J.P. *et al. J Gene Med* 5, 72-81 (2003); Sarsero, J.P. *et al. Mamm Genome* 16, 228-241 (2005); Grant, L. *et al. FEBS letters* 580, 5399-5405 (2006); Soragni, E. *et al. Nucleic Acids Res* (2008)). Un inconveniente principal de estos sistemas es que no evalúan la actividad del gen FXN endógeno en contextos cromosómicos nativos y relevantes para la enfermedad. Esto limita la identificación de moduladores de la expresión de FXN, debido a que la estructura de la cromatina endógena y/o la organización nuclear del genoma humano son determinantes principales de la actividad del gen FXN (Herman, D. *et al. Nat Chem Biol* 2, 551-558 (2006); Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. & Festenstein, R. *Nature* 422, 909-913 (2003); Castaldo, I. *et al. Journal of medical genetics* 45, 808-812 (2008)). Por tanto, había una necesidad en la técnica de una plataforma para el descubrimiento de fármacos que combine sistemas indicadores precisos desde un punto de vista genético, modelos relevantes para la enfermedad y biología de alto rendimiento.

45 M. Lufino ("Drug screening based on FRDA genomic-reporter fusion vectors identifies two candidate molecules able to up-regulate FXN expression", 4.ª Conferencia científica sobre la ataxia de Friedreich internacional, 5-7 de mayo de 2011, 5 de mayo de 2011 (05-05-2011), URL:[http://www.curefa.org/pdf/4th International FAConferenceAbstracts.pdf](http://www.curefa.org/pdf/4th%20International%20FAConferenceAbstracts.pdf)) proporciona un ensayo de cribado basado en células de alto rendimiento basado en un modelo celular que recapitula la represión de la expresión de frataxina mediada por GAA asociada con la ataxia de Friedreich. Las líneas celulares clonales humanas comprenden un vector de fusión indicador genómico de FRDA, donde se insertó un gen de Luciferasa en fase en el extremo 3' del gen FRDA (FRDA-Luc). Las líneas celulares permiten una rápida cuantificación de la expresión de frataxina mediante un ensayo de Luciferasa. El cribado identificó siete compuestos que aumentaban la expresión de FRDA-Luciferasa.

55 SARSERO JOSEPH P ET AL ("UPREGULATION OF EXPRESSION FROM THE FRDA GENOMIC LOCUS FOR THE THERAPY OF FRIEDREICH ATAXIA", JOURNAL OF GENE MEDICINE, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 5, n.º 1, 1 de enero de 2003 (01-01-2003), páginas 72-81) divulga un ensayo celular sensible para la expresión de frataxina a partir del locus funcional de FRDA humano completo que para la identificación de agentes farmacológicos potencialmente terapéuticos para tratar la ataxia de Friedreich. Se utilizaron casetes constituidos por el gen que codifica EGFP asociado a una resistencia a kanamicina/neomicina como genes indicadores. Se construyeron dos fusiones en fase entre el gen FRDA y un gen que codifica la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP). Una fusión se encuentra dentro del exón 2 del gen FRDA. La otra se encuentra en el extremo del exón 5a, que contiene la proteína frataxina completa fusionada a EGFP. Se mostró que ambos constructos controlaban la expresión de EGFP a partir de los elementos reguladores del locus FRDA, con las proteínas de fusión de frataxina-EGFP dirigidas a la mitocondria. Se produjeron líneas celulares

estables que contenían la fusión de EGFP en el exón 5a. Se demostró el aumento de la expresión del gen FRDA con hemina y ácido butírico.

5 HEBERT ET AL ("Targeting the gene in Friedreich ataxia", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 90, n.º 8, 1 de agosto de 2008 (01-08-2008), páginas 1131-1139) revisa las opciones terapéuticas para dirigirse al gen FTX (su expresión) en la ataxia de Friedreich. Se discuten las opciones de tratamiento potenciales que implicaban compuestos de bajo peso molecular que se dirigían al gen con GAA expandido mediante el aumento del nivel de mensaje y proteína de frataxina.

10 WO 2011/119842 A1 (DAVID GLADSTONE INST [US]; FINKBEINER STEVEN M [US]; RAO VIKRAM RAMNAT) 29 de septiembre de 2011 (2011-09-29) divulga agentes para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico o una enfermedad neurodegenerativa tal como epilepsia, isquemia, ataxia cerebelar en un individuo, donde el agente modula la actividad de la proteína cinasa D1 (P[R]KD1). El agente se selecciona entre el grupo de una molécula de bajo peso molecular, un ácido nucleico inhibidor (tal como ARNpi) o un anticuerpo que se une a proteína cinasa D1.

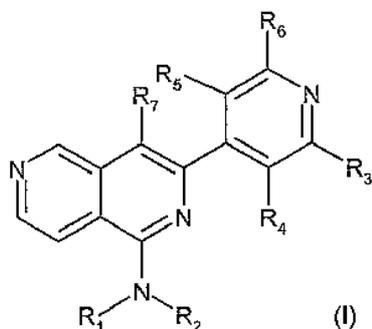
15 WO 2008/122615 A1 (NOVARTIS AG [CH]; DOBLER MARKUS ROLF [US]; JEWELL CHARLES FRANCIS JR) 16 de octubre de 2008 (16-10-2008) describe la [2,6] naftiridina de fórmula (I) como inhibidores de PRKD1.

Compendio de la invención

20 Con el fin de abordar las necesidades en la técnica, los inventores de la presente generaron una línea celular indicadora de origen humano, caracterizada por que un gen indicador se ha fusionado al extremo 3' del gen de frataxina (FTX) endógeno, donde dicha línea celular indicadora es compatible con una biología de alto rendimiento y permite la monitorización precisa de la expresión del gen de FXN endógeno. Utilizando esta línea celular, los inventores de la presente han podido identificar una nueva conexión relevante desde un punto de vista fisiológico entre PKD y FRDA y mostraron por primera vez que los inhibidores de PKD son agentes que se pueden utilizar para tratar FRDA capaz.

25 Por tanto, la presente invención engloba un agente que modula la actividad del producto génico *PRKD1*, proteína cinasa D1, para su uso en el tratamiento de la ataxia de Friedreich tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína cinasa D1 es una [2,6] naftiridina de fórmula (I):

30



donde

35 R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con de uno a dos R₈, donde R₈ es hidrógeno, halógeno, alquilo, R₉-O-, (R₁₀)(R₁₁)N-, (R₁₂)(R₁₃)N-C(O)-, arilo, o heterociclilo o heteroarilo, dicho heterociclilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo;

40 R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 4-7 miembros;

R₃ es (R₁₄)(R₁₅)N-, o halógeno;

45 R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo (C₃-C₇), aril-alquilo, arilo o alcoxi;

R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son independientemente hidrógeno, alquil-O-C(O)-, alquil-NH-C(O)-, alquil-C(O)-NH-C(O)-, cicloalquilo, cicloalquil-alquil-, R₁₆-SO₂-, R₁₇-C(O)-, heterociclilo o alquilo, dicho heterociclilo está además opcionalmente sustituido con uno o dos grupos cicloalquil-alquilo-, y dicho alquilo está además opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre hidroxí, alcoxi, alquilamina, dialquilamina o heteroarilo;

50

R₁₀ y R₁₁ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

R₁₂ y R₁₃ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

R₁₄ y R₁₅ son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, aril-alquil-, heterociclilo o heteroarilo, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo están además opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos seleccionados entre alquilo, alcoxi, hidroxí, halógeno, haloalquilo, ciano o R₁₈-NH-C(O)-;

R₁₆ es arilo o heteroarilo;

R₁₇ es heterociclilo o alquilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre H₂N-, aril-alquil-, o alquil-C(O)-NH-;

R₁₈ es heterocicilil-alquil-; o

una sal farmacéuticamente aceptable de este; o un isómero óptico de este; o una mezcla de isómeros ópticos.

El agente de la invención puede ser una [2,6] naftiridina de acuerdo con la Fórmula I, donde

R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₇), cicloalquilo (C₃-C₇), heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con de uno a dos R₈, donde R₈ es hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₇), R₉-O-, (R₁₀)(R₁₁)N-, (R₁₂)(R₁₃)N-C(O)-, arilo (C₆-C₁₀) o heterociclilo o heteroarilo, dicho heterociclilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo (C₁-C₇);

R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 4-7 miembros;

R₃ es (R₁₄)(R₁₅)N;

R₄, R₅, R₆ son H; y

R₇ es independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₇), cicloalquilo (C₃-C₇), aril (C₆-C₁₀)-alquilo (C₁-C₇), arilo (C₆-C₁₀) o alcoxi (C₁-C₇);

R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son independientemente hidrógeno, alquil (C₁-C₇)-O-C(O)-, alquil (C₁-C₇)-NH-C(O)-, alquil (C₁-C₇)-C(O)-NH-C(O)-, cicloalquilo (C₃-C₇), cicloalquil (C₃-C₇)-alquil (C₁-C₇)-, R₁₆-SO₂-, R₁₇-C(O)-, heterociclilo o alquilo (C₁-C₇), dicho heterociclilo está opcionalmente sustituido además con uno o dos grupos cicloalquil (C₃-C₇)-alquil (C₁-C₇)-, y dicho alquilo está opcionalmente sustituido además con uno o dos grupos seleccionados entre hidroxí, alcoxi (C₁-C₇), alquilamina (C₁-C₇), di-(C₁-C₇)alquilamina o heteroarilo;

R₁₀ y R₁₁ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

R₁₂ y R₁₃ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

R₁₄ y R₁₅ son independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₇), arilo (C₆-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₇), aril (C₆-C₁₀)-alquil (C₁-C₇)-, heterociclilo o heteroarilo, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos además con uno o dos grupos seleccionados entre alquilo (C₁-C₇), alcoxi (C₁-C₇), hidroxí, halógeno, haloalquilo (C₁-C₇), ciano o R₁₈-NH-C(O)-;

R₁₆ es arilo o heteroarilo;

R₁₇ es heterociclilo o alquilo (C₁-C₇) opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre H₂N-, aril (C₆-C₁₀)-alquilo (C₁-C₇)-, o alquil (C₁-C₇)-C(O)-NH-;

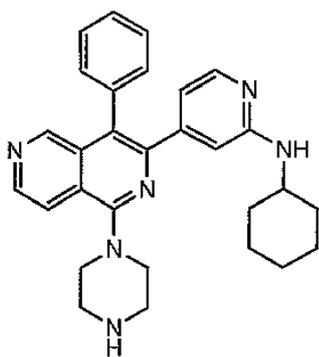
R₁₈ es heterocicilil-alquilo (C₁-C₇); o

donde heterociclilo se refiere a un anillo o sistema anular no aromático saturado o insaturado opcionalmente sustituido, que es monocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros; y

heteroarilo se refiere a un sistema anular aromático monocíclico o bicíclico o policíclico de 5-14 miembros, que tiene de 1 a 8 heteroátomos seleccionado entre N, O o S;

una sal farmacéuticamente aceptable de este; o un isómero óptico de este; o una mezcla de isómeros ópticos.

En algunas realizaciones, el inhibidor es el ciclohexil-[4-(4-fenil-1-piperazin-1-il-[2,6]naftiridin-3-il)piridin-2-il]amina de fórmula (II):



(II)

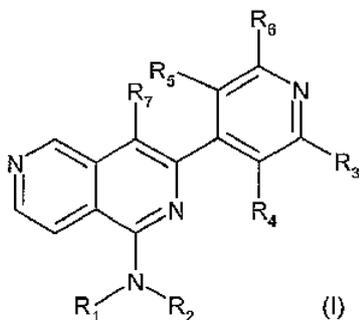
Descripción de las figuras

Fig. 1: La exposición de neuronas derivadas de FRDA-iPSC a [2,6] Naftiridina es la ciclohexil-[4-(4-fenil-1-piperazin-1-il-[2,6]naftiridin-3-il)piridin-2-il]amina, un inhibidor químico de PRKD1, da lugar a un aumento en la expresión de FXN, mientras que un compuesto de control no tiene efecto. Los cultivos de neuronas se trataron durante 3 semanas con cinco concentraciones diferentes del inhibidor de PRKD1 (activo) o un análogo inactivo (inactivo) tal como se describe en los Ejemplos. El experimento se llevó a cabo en duplicados biológicos y no se observó toxicidad del compuesto con las concentraciones utilizadas. Los niveles de ARNm de FXN se determinaron mediante RT-PCR en tiempo real, normalizada respecto a los niveles de ARNm de RPL13A. *P = 0,03.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de abordar las necesidades en la técnica, los inventores de la presente generaron una línea celular indicadora de origen humano, caracterizada por que un gen indicador se ha fusionado al extremo 3' del gen de frataxina (FTX) endógeno, donde dicha línea celular indicadora es compatible con una biología de alto rendimiento y permite la monitorización precisa de la expresión del gen de FXN endógeno. Utilizando esta línea celular, los inventores de la presente han podido identificar una nueva asociación relevante desde un punto de vista fisiológico entre PKD y FRDA y mostraron por primera vez que los inhibidores de PKD son agentes que se pueden utilizar para tratar la FRDA capaz.

Por tanto, la presente invención engloba un agente que modula la actividad del producto génico *PRKD1*, proteína cinasa D1, para su uso en el tratamiento de la ataxia de Friedreich tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el inhibidor de proteína cinasa D1 es una [2,6] naftiridina de fórmula (I):



(I)

donde

- R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con de uno a dos R₈, donde R₈ es hidrógeno, halógeno, alquilo, R₉-O--, (R₁₀)(R₁₁)N--, (R₁₂)(R₁₃)N-C(O)--, arilo, o heterociclilo o heteroarilo, dicho heterociclilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo;
- 5 R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 4-7 miembros;
- R₃ es (R₁₄)(R₁₅)N--, o halógeno;
- 10 R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo (C₃-C₇), aril-alquilo, arilo o alcoxi;
- R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son independientemente hidrógeno, alquil-O-C(O)--, alquil-NH-C(O)--, alquil-C(O)-NH-C(O)--, cicloalquilo, cicloalquil-alquil--, R₁₆-SO₂--, R₁₇-C(O)--, heterociclilo o alquilo, dicho heterociclilo está además opcionalmente sustituido con uno o dos grupos cicloalquil-alquilo-- , y dicho alquilo está además opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre hidroxil, alcoxi, alquilamina, dialquilamina o heteroarilo;
- 15 R₁₀ y R₁₁ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;
- R₁₂ y R₁₃ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;
- 20 R₁₄ y R₁₅ son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, aril-alquil--, heterociclilo o heteroarilo, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo están además opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos seleccionados entre alquilo, alcoxi, hidroxil, halógeno, haloalquilo, ciano o R₁₈-NH-C(O)--;
- R₁₆ es arilo o heteroarilo;
- 25 R₁₇ es heterociclilo o alquilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre H₂N--, aril-alquil--, o alquil-C(O)-NH--;
- R₁₈ es heterociclil-alquil--; o
- 30 una sal farmacéuticamente aceptable de este; o un isómero óptico de este; o una mezcla de isómeros ópticos.
- El agente de la invención puede ser una [2,6] naftiridina de acuerdo con la Fórmula I, donde
- 35 R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₇), cicloalquilo (C₃-C₇), heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con de uno a dos R₈, donde R₈ es hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₇), R₉-O--, (R₁₀)(R₁₁)N--, (R₁₂)(R₁₃)N-C(O)--, arilo (C₆-C₁₀) o heterociclilo o heteroarilo, dicho heterociclilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de uno a dos grupos alquilo (C₁-C₇);
- 40 R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 4-7 miembros;
- R₃ es (R₁₄)(R₁₅)N;
- 45 R₄, R₅, R₆ son H; y
- R₇ es independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₇), cicloalquilo (C₃-C₇), aril (C₆-C₁₀)-alquilo (C₁-C₇), arilo (C₆-C₁₀) o alcoxi (C₁-C₇);
- 50 R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son independientemente hidrógeno, alquil (C₁-C₇)-O-C(O)--, alquil (C₁-C₇)-NH-C(O)--, alquil (C₁-C₇)-C(O)-NH-C(O)--, cicloalquilo (C₃-C₇), cicloalquil (C₃-C₇)-alquil (C₁-C₇)--, R₁₆-SO₂--, R₁₇-C(O)--, heterociclilo o alquilo (C₁-C₇), dicho heterociclilo está opcionalmente sustituido además con uno o dos grupos cicloalquil (C₃-C₇)-alquil (C₁-C₇)-, y dicho alquilo está opcionalmente sustituido además con uno o dos grupos seleccionados entre hidroxil, alcoxi (C₁-C₇), alquilamina (C₁-C₇), di-(C₁-C₇)alquilamina o heteroarilo;
- 55 R₁₀ y R₁₁ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;
- R₁₂ y R₁₃ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;
- 60 R₁₄ y R₁₅ son independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₇), arilo (C₆-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₇), aril (C₆-C₁₀)-alquil (C₁-C₇)--, heterociclilo o heteroarilo, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo están además con uno o dos grupos seleccionados entre alquilo (C₁-C₇), alcoxi (C₁-C₇), hidroxil, halógeno, haloalquilo (C₁-C₇), ciano o R₁₈-NH-C(O)--;

R₁₆ es arilo o heteroarilo;

R₁₇ es heterociclilo o alquilo (C₁-C₇) opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre H₂N--, aril (C₆-C₁₀)-alquilo (C₁-C₇)--, o alquil (C₁-C₇)-C(O)-NH--;

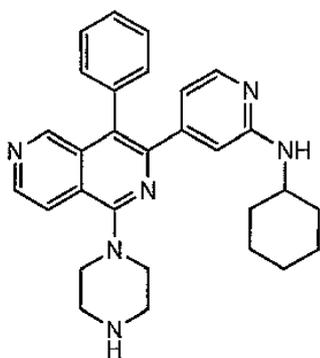
R₁₈ es heterociclil-alquilo (C₁-C₇)--; o

donde heterociclilo se refiere a un anillo o sistema anular no aromático saturado o insaturado opcionalmente sustituido, que es monocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros; y

heteroarilo se refiere a un sistema anular aromático monocíclico o bicíclico o policíclico de 5-14 miembros, que tiene de 1 a 8 heteroátomos seleccionados entre N, O o S;

una sal farmacéuticamente aceptable de este; o un isómero óptico de este; o una mezcla de isómeros ópticos.

En algunas realizaciones, el inhibidor es el ciclohexil-[4-(4-fenil-1-piperazin-1-il-[2,6]naftiridin-3-il)piridin-2-il]amina de fórmula (II):



(II)

A efectos de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando proceda, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa.

Tal como se utiliza en la presente, el término «alquilo» se refiere a un resto hidrocarbonado ramificado o no ramificado totalmente saturado. En algunas realizaciones, el alquilo comprende de 1 a 20 átomos de carbono. En algunas realizaciones, de 1 a 16 átomos de carbono, de 1 a 10 átomos de carbono, de 1 a 7 átomos de carbono, o de 1 a 4 átomos de carbono. En algunas realizaciones, (C₁-C₇) se refiere a un alquilo que contiene de 1 a 7 átomos de carbono. Ejemplos representativos de alquilo incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo y similares.

Tal como se utiliza en la presente, el término «haloalquilo» se refiere a un alquilo tal como se ha definido en la presente, que se sustituye por uno o más grupos halo tal como se definen en la presente. El haloalquilo puede ser monohaloalquilo, dihaloalquilo o polihaloalquilo, que incluye perhaloalquilo. Un monohaloalquilo puede tener un yodo, bromo, cloro o fluoro dentro del grupo alquilo. Los grupos dihaloalquilo y polihaloalquilo pueden tener dos o más átomos halo idénticos, o una combinación de grupos halo diferentes dentro del alquilo. El polihaloalquilo contiene hasta 12, o 10, u 8, o 6, o 4, o 3, o 2 grupos halo. Los ejemplos no limitantes de haloalquilo incluyen fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difluoropropilo, dicloroetilo y dicloropropilo. Un perhaloalquilo se refiere a un alquilo que tiene todos los átomos de hidrógeno reemplazados con átomos halo.

El término «arilo» se refiere a grupos hidrocarbonados aromáticos monocíclicos o bicíclicos que tienen 6-20 átomos de carbono en la porción anular. En algunas realizaciones, el arilo es un arilo (C₆-C₁₀). Ejemplos no limitantes incluyen fenilo, naftilo o tetrahidronaftilo.

Además, el término "arilo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un sustituyente aromático que puede ser un anillo aromático único, o múltiples anillos aromáticos que se condensan juntos. El grupo conector común también puede ser un carbonilo como en la benzofenona u oxígeno como en el éter difenílico o nitrógeno como en la difenilamina.

Tal como se utiliza en la presente, el término «alcoxi» se refiere a alquil-O-, donde alquilo se ha definido anteriormente en la presente. Ejemplos representativos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, *tert*-butoxi, pentiloxi, hexiloxi, ciclopropiloxi, ciclohexiloxi y similares. En algunas realizaciones, los grupos alcoxi tienen 1-7. En algunas realizaciones, tienen 1-4 carbonos.

5

Tal como se utiliza en la presente, el término «acilo» se refiere a un grupo R-C(O)- de desde 1 hasta 10 átomos de carbono de una configuración lineal, ramificada o cíclica o una combinación de estas, unida a la estructura precursora a través de una funcionalidad carbonilo. Dicho grupo puede ser saturado o insaturado, y alifático o aromático. En algunas realizaciones, R en el residuo acilo es alquilo, o alcoxi, o arilo, o heteroarilo. Además, en algunas realizaciones, uno o más carbonos en el residuo acilo se pueden reemplazar por nitrógeno, oxígeno o azufre, siempre que el punto de unión al precursor continúe estando en el carbonilo. Algunos ejemplos de acilo incluyen, sin carácter limitante, acetilo, benzoilo, propionilo, isobutililo, *t*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares. Acilo inferior se refiere a acilo que contiene de uno a cuatro carbonos.

10

15

Tal como se utiliza en la presente, el término «heterociclilo» o «heterociclo» se refiere a un anillo o sistema anular no aromático saturado o insaturado opcionalmente sustituido, por ejemplo, que es un sistema anular monocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros, bicíclico de 7, 8, 9, 10, 11 o 12 miembros o tricíclico de 10, 11, 12, 13, 14 o 15 miembros y contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre O, S y N, donde el N y el S también se pueden oxidar opcionalmente a varios estados de oxidación. El grupo heterocíclico puede estar unido a un heteroátomo o un átomo de carbono. Los heterociclos pueden incluir anillos condensados o puenteados, así como anillos espirocíclicos. Los ejemplos de heterociclos incluyen tetrahydrofurano (THF), dihydrofurano, 1,4-dioxano, morfolina, 1,4-ditiano, piperazina, piperidina, 1,3-dioxolano, imidazolidina, imidazolina, pirrolina, pirrolidina, tetrahidropirano, dihidropirano, oxatolano, ditiolano, 1,3-dioxano, 1,3-ditiano, oxatiano, tiomorfolina y similares.

20

25

Tal como se utiliza en la presente, el término «cicloalquilo» se refiere a grupos hidrocarbonados saturados o insaturados monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos de 3-12 átomos de carbono, en algunas realizaciones 3-9 o 3-7 átomos de carbono. Los grupos hidrocarbonados monocíclicos ilustrativos incluyen, sin carácter limitante, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo y ciclohexenilo y similares. Los grupos hidrocarbonados bicíclicos ilustrativos incluyen bornilo, indilo, hexahidroindilo, tetrahidronaftilo, decahidronaftilo, biciclo[2.1.1]hexilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[2.2.1]heptenilo, 6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptilo, 2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptilo, biciclo[2.2.2]octilo y similares. Los grupos hidrocarbonados tricíclicos ilustrativos incluyen adamantilo y similares.

30

Tal como se utiliza en la presente, el término «heteroarilo» se refiere a un sistema anular aromático monocíclico o bicíclico o policíclico de 5-14 miembros, que tiene de 1 a 8 heteroátomos seleccionados entre N, O o S. En algunas realizaciones, el heteroarilo es un sistema anular de 5-10 o 5-7 miembros. Los grupos heteroarilo típicos incluyen 2- o 3-tienilo, 2- o 3-furilo, 2- o 3-pirrolilo, 2-, 4- o 5-imidazolilo, 3-, 4-, o 5-pirazolilo, 2-, 4-, o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 3- o 5-1, 2, 4-triazolilo, 4- o 5-1, 2, 3-triazolilo, tetrazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 3- o 4-piridazinilo, 3-, 4- o 5-pirazinilo, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo.

35

40

El término "heteroarilo" también se refiere a un grupo en el que un anillo heteroaromático se fusiona a uno o más anillos arilo, cicloalifáticos o heterociclilo, donde el radical o punto de unión está en el anillo heteroaromático. Algunos ejemplos no limitantes incluyen, sin carácter limitante, 1-, 2-, 3-, 5-, 6-, 7- u 8- indolizínilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-isoindolilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-indolilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-indazolilo, 2-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8- purínilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8- o 9-quinolizínilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-quinolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-isoquinolilo, 1-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-ftalazínilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-naftoridinilo, 2-, 3-, 5-, 6-, 7- u 8-quinazolinilo, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-cinnolinilo, 2-, 4-, 6- o 7-pteridinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-4aH carbazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-carbazolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-carbolínilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenantridinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-acridínilo, 1-, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-perimidínilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 8-, 9- o 10-fenatrolínilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8- o 9-fenazínilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenotiazínilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenoxazínilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, o 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10- benzisoquinolínilo, 2-, 3-, 4-, o tieno[2,3-b]furanilo, 2-, 3-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10 - u 11-7H-pirazino[2,3-c]carbazolilo, 2-, 3-, 5-, 6- o 7-2H-furo[3,2-b]-piranilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 7- u 8-5H-pirido[2,3-d]-o-oxazínilo, 1-, 3-, o 5-1H-pirazolo[4,3-d]-oxazolilo, 2-, 4- o 5-4H-imidazo[4,5-d] tiazolilo, 3-, 5- u 8-pirazino[2,3-d]piridazinilo, 2-, 3-, 5- o 6- imidazo[2,1-b] tiazolilo, 1-, 3-, 6-, 7-, 8- o 9-furo[3,4-c]cinnolinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 8-, 9-, 10, u 11-4H-pirido[2,3-c]carbazolilo, 2-, 3-, 6- o 7-imidazo[1,2-b][1,2,4]triazínilo, 7-benzo[b]tienilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-bencimidazolilo, 2-, 4-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotiazolilo, 1-, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9- benzoxapínilo, 2-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-benzoxazínilo, 1-, 2-, 3-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- u 11-1H-pirrololo[1,2-b][2]benzazapínilo. Los grupos heteroarilo fusionados típicos incluyen, sin carácter limitante, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-quinolínilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-isoquinolínilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-indolilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzo[b]tienilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-bencimidazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotiazolilo. Un grupo heteroarilo puede ser mono-, bi-, tri- o policíclico. En algunas realizaciones, puede ser mono-, bi- o tricíclico. En algunas realizaciones, puede ser mono- o bicíclico.

45

50

55

60

Tal como se utiliza en la presente, el término «halógeno» o «halo» se refiere a fluoro, cloro, bromo y yodo.

Tal como se utiliza en la presente, el término «isómeros» se refiere a compuestos diferentes que tienen la misma fórmula molecular, pero difieren en la disposición y configuración de los átomos. También tal como se utiliza en la presente, la expresión «un isómero óptico» o «un estereoisómero» se refiere a cualquiera de las diversas configuraciones estereoisoméricas que pueden existir para un compuesto determinado de la presente invención e incluye isómeros geométricos. Se sobreentiende que un sustituyente puede estar unido a un centro quiral de un átomo de carbono. Por lo tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros o racematos del compuesto. Los «enantiómeros» son un par de estereoisómeros cuyas imágenes especulares no se pueden superponer entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla «racémica». El término se utiliza para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado. Los «diastereoisómeros» son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema R-S de Cahn-Ingold-Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada carbono quiral puede especificarse mediante R o S. Los compuestos resueltos, cuya configuración absoluta es desconocida, pueden designarse (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextrógira o levógira) en la que hacen girar la luz polarizada del plano en la longitud de onda de la línea D del sodio. Algunos de los compuestos descritos en la presente contienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-. Se pretende que la presente invención incluya todos los posibles isómeros de este tipo, que incluyen mezclas racémicas, formas ópticamente puras y mezclas de intermedios. Se pueden preparar isómeros (R) y (S) ópticamente activos utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver utilizando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un doble enlace, el sustituyente puede tener la configuración E o Z. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente del cicloalquilo puede tener una configuración *cis* o *trans*. También se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «sales farmacéuticamente aceptables» se refiere a sales que conservan la efectividad biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y que no son indeseadas desde un punto de vista biológico o de otra forma. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a estos. Se pueden formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos a partir de los cuales se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ácidos orgánicos a partir de los cuales se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Se pueden formar sales de adición de base farmacéuticamente aceptables con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas de las que se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares; se prefieren particularmente las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las bases orgánicas de las que se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico básicas y similares, específicamente tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto precursor, un resto básico o ácido, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, este tipo de sales se pueden preparar haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K o similares), o haciendo reaccionar formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Las reacciones de este tipo normalmente se llevan a cabo en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, donde sea factible. Se puede encontrar una lista de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20.^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985).

La expresión «portador farmacéuticamente aceptable», tal como se utiliza en la presente, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizantes de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales similares y combinaciones de estos, que conocerían los expertos en la técnica (remítase, por ejemplo, a *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Salvo en lo que concierne a cualquier portador convencional que sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La expresión «una cantidad terapéuticamente eficaz» de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad del compuesto de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la reducción o inhibición de una enzima o una actividad proteica, o mejorará los síntomas, aliviará las afecciones, ralentizará o retrasará la progresión de la enfermedad, o prevendrá una enfermedad, etc. En una realización no limitante, la expresión «una cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para, (1) al menos en parte, aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar la ataxia de Friedreich.

- El término «sujeto», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un animal. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (p. ej., seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, camellos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares.
- 5 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «un trastorno» o «una enfermedad» se refiere a cualquier trastorno o anomalía de la función; un estado mental o físico mórbido. Remítase a *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, (W.B. Saunders Co. 27.^a ed. 1988).
- 10 El término «tratar» o «tratamiento» de cualquier enfermedad o trastorno, tal como se utiliza en la presente, se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o el trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En otra realización, «tratar» o «tratamiento» se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico, incluidos aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización más, «tratar» o «tratamiento» se refiere a modular la enfermedad o el trastorno, ya sea físicamente (p. ej., la estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (p. ej., la estabilización de un parámetro físico) o ambos. En otra realización más, «tratar» o «tratamiento» se refiere a prevenir o retrasar el brote o el desarrollo o la progresión de la enfermedad o del trastorno.
- 15 Tal como se utiliza en la presente, el término «anormal» se refiere a una actividad o rasgo que difiere de una actividad o rasgo normal.
- 20 Tal como se utiliza en la presente, la expresión «actividad anormal» se refiere a una actividad que difiere de la actividad del gen o proteína de origen natural o nativa, o que difiere de la actividad del gen o proteína en un sujeto sano. La actividad anormal puede ser más intensa o más débil que la actividad normal. En una realización, la «actividad anormal» incluye la producción anormal (ya sea superior o inferior) de ARNm transcrito a partir de un gen. En otra realización, la «actividad anormal» incluye la producción anormal (ya sea superior o inferior) de polipéptido a partir de un gen. En otra realización, la actividad anormal se refiere a un nivel de un ARNm o polipéptido que es diferente de un nivel normal de dicho ARNm o polipéptido en aproximadamente un 15%, aproximadamente un 25%, aproximadamente un 35%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 100% o superior. En algunas realizaciones, el nivel anormal del ARNm o polipéptido puede ser superior o inferior al nivel normal de dicho ARNm o polipéptido. En otra realización más, la actividad anormal se refiere a la actividad funcional de una proteína que es diferente de una actividad normal de la proteína de origen natural. En algunas realizaciones, la actividad anormal puede ser más intensa o más débil que la actividad normal. En algunas realizaciones, la actividad anormal se debe a las mutaciones en el gen correspondiente, y las mutaciones pueden estar en la región codificante del gen o las regiones no codificantes tales como regiones de promotores transcripcionales. Las mutaciones pueden ser sustituciones, deleciones, inserciones.
- 25 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 30 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 35 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 40 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 45 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 50 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 55 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.
- 60 Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término «un», «una», «el/la» y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. Se pretende que la enumeración de intervalos de valores en la presente sirva meramente como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que se clasifica dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera enumerado de forma individual en la presente. Todos los métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, «tal(es) como») proporcionado en la presente tiene por objeto únicamente ilustrar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención que por lo demás se reivindica. Ningún término en la memoria descriptiva se debería interpretar como indicativo de que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

productos racémicos también se pueden resolver mediante cromatografía quiral, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un adsorbente quiral. Finalmente, los compuestos de la presente invención se obtienen en forma libre, como una sal de estos, o como derivados profármaco de estos.

5 Cuando un grupo básico se encuentra presente en los compuestos de la presente invención, los compuestos se pueden convertir en sales de adición de ácido de estos, en particular, sales de adición de ácido con el resto imidazol de la estructura. En algunas realizaciones, sales farmacéuticamente aceptables de estos. Estas se forman con ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, un ácido fosfórico o ácido hidrohálico. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, ácidos carboxílicos tales como ácidos (alcano (C₁-C₄))carboxílicos que, por ejemplo, están sin sustituir o sustituidos con halógeno, por ejemplo, ácido acético, tales como ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, ácido oxálico, succínico, maleico o fumárico, tales como ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico, tales como aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico, ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos (alquil (C₁-C₄))sulfónicos, por ejemplo, ácido metanosulfónico; o ácidos arilsulfónicos que están sin sustituir o sustituidos, por ejemplo, con halógeno. Se prefieren las sales formadas con ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico y ácido maleico.

20 Cuando se encuentra presente un grupo ácido en los compuestos de la presente invención, los compuestos se pueden convertir en sales con bases farmacéuticamente aceptables. Dichas sales incluyen sales de metales alcalinos, como sales de sodio, litio y potasio; sales de metales alcalinotérreos, como sales de calcio y magnesio; sales de amonio con bases orgánicas, por ejemplo, sales de trimetilamina, sales de dietilamina, sales de *tris*(hidroximetil)metilamina, sales de dicitclohexilamina y sales de *N*-metil-*D*-glucamina; sales con aminoácidos como arginina, lisina y similares. Se pueden formar sales utilizando métodos convencionales, convenientemente en presencia de un disolvente etéreo o alcohólico tal como un alcohol inferior. A partir de las soluciones de este último, las sales se pueden precipitar con éteres, por ejemplo, éter dietílico. Las sales resultantes se pueden convertir en los compuestos libres mediante tratamiento con ácidos. Estas u otras sales también se pueden utilizar para la purificación de los compuestos obtenidos.

25 Cuando tanto un grupo básico como un grupo ácido se encuentran presentes en la misma molécula, los compuestos de la presente invención también pueden formar sales internas.

30 La presente invención también proporciona profármacos de los compuestos de la presente invención que se conviertan *in vivo* en los compuestos de la invención. Un profármaco es un compuesto activo o inactivo que se modifica químicamente a través de la acción fisiológica *in vivo*, tal como la hidrólisis, el metabolismo y similares, para obtener un compuesto de esta invención después de la administración del profármaco a un sujeto. Los expertos en la técnica conocen bien la idoneidad y las técnicas implicadas en la fabricación y el uso de profármacos. Los profármacos se pueden dividir conceptualmente en dos categorías no exclusivas: profármacos bioprecusores y profármacos portadores. Remítase a *The Practice of Medicinal Chemistry*, Cap. 31-32 (Ed. Wermuth, Academic Press, San Diego, Calif., 2001). Generalmente, los profármacos bioprecusores son compuestos son inactivos o tienen baja actividad en comparación con el compuesto farmacológico activo correspondiente, que contiene uno o más grupos protectores y se convierten en una forma activa mediante el metabolismo o la solvolisis. Tanto la forma farmacológica activa como cualesquiera productos metabólicos liberados deberían tener una toxicidad aceptablemente baja. Habitualmente, la formación de un compuesto farmacológico activo conlleva un proceso o reacción metabólica que es una de los siguientes tipos:

45 1. Reacciones oxidativas tales como la oxidación de funciones alcohol, carbonilo y ácido, hidroxilación de carbonos alifáticos, hidroxilación de átomos de carbono alicíclicos, oxidación de átomos de carbono aromáticos, oxidación de enlaces dobles carbono-carbono, oxidación de grupos funcionales que contienen nitrógeno, oxidación de silicio, fósforo, arsénico y azufre, *N*-desalquilación oxidativa, O- y S-desalquilación oxidativa, desaminación oxidativa, así como otras reacciones oxidativas.

50 2. Reacciones reductoras tales como reducción de grupos carbonilo, reducción de grupos alcohólicos y enlaces dobles carbono-carbono, reducción de grupos de funciones que contienen nitrógeno y otras reacciones de reducción.

55 3. Reacciones sin cambio en el estado de oxidación tales como hidrólisis de ésteres y éteres, escisión hidrolítica de enlaces simples carbono-nitrógeno, escisión hidrolítica de heterociclos no aromáticos, hidratación y deshidratación en enlaces múltiples, nuevas conexiones atómicas resultantes de reacciones de deshidratación, deshalogenación hidrolítica, eliminación de una molécula de haluro de hidrógeno y otras reacciones de este tipo.

60 Los profármacos portadores son compuestos farmacológicos que contienen un resto de transporte, por ejemplo, que mejoran la captación y/o suministro localizado a uno o varios sitios de acción. De forma deseable para un profármaco portador de este tipo, la conexión entre el resto farmacológico y el resto de transporte es un enlace covalente, el profármaco es inactivo o menos activo que el compuesto farmacológico y cualquier resto de transporte liberado es aceptablemente atóxico. Para los profármacos en los que se pretende que el resto de transporte potencie la captación, habitualmente la liberación del resto de transporte debería ser rápida. En otros casos, es deseable utilizar un resto que proporcione una liberación lenta, por ejemplo, ciertos polímeros u otros restos tales como ciclodextrinas. Remítase a

- Cheng *et al.*, US20040077595, solicitud con N.º de serie 10/656 838. Dichos profármacos portadores a menudo son convenientes para fármacos administrados por vía oral. Los profármacos portadores se pueden utilizar, por ejemplo, para mejorar una o más de las siguientes propiedades: mayor lipofilia, mayor duración de los efectos farmacológicos, mayor especificidad por un sitio, menor toxicidad y reacciones adversas, y/o mejora en la formulación del fármaco (por ejemplo, estabilidad, hidrosolubilidad, supresión de una propiedad organoléptica o fisicoquímica indeseada). Por ejemplo, la lipofilia se puede aumentar mediante esterificación de grupos hidroxilo con ácidos carboxílicos lipófilos, o de grupos ácido carboxílico con alcoholes, por ejemplo, alcoholes alifáticos. Remítase a *The Practice of Medicinal Chemistry*, Cap. 31-32, Ed. Werriuth, Academic Press, San Diego, Calif., 2001.
- Los profármacos ilustrativos son, por ejemplo, ésteres de ácidos carboxílicos libres y derivados S-acilo y O-acilo de tioles, alcoholes o fenoles, donde acilo tiene un significado tal como se define en la presente. Se prefieren derivados éster farmacéuticamente aceptables que se pueden convertir mediante solvolisis en condiciones fisiológicas en el ácido carboxílico precursor, por ejemplo, ésteres alquílicos inferiores, ésteres cicloalquílicos, ésteres alquénlicos inferiores, ésteres bencílicos, ésteres alquílicos inferiores mono- o disustituidos tales como los ésteres alquílicos inferiores ω -(amino, mono- o dialquilamino inferior, carboxi, alcocarbonilo inferior), los ésteres alquílicos inferiores α -(alcanoiloxi inferior, alcocarbonilo inferior o dialquilaminocarbonilo inferior) tal como el éster pivaloiloximetílico y similares utilizados convencionalmente en la técnica. Además, las aminas se han enmascarado como derivados sustituidos con arilcarboniloximetilo que son escindidos por esterasas *in vivo* que liberan el fármaco libre y formaldehído (Bundgaard, *J. Med. Chem.* 2503 (1989)). Además, los fármacos que contienen un grupo NH ácido tales como imidazol, imida, indol y similares, se han enmascarado con grupos N-aciloximetilo (Bundgaard, *Design of Prodrugs*, Elsevier (1985)). Los grupos hidroxilo se han enmascarado como ésteres y éteres. El documento EP 039 051 (Sloan y Little) divulga profármacos de ácido hidroxámico de bases de Mannich, su preparación y uso.
- En vista de la estrecha relación entre los compuestos, los compuestos en forma de sus sales y los profármacos, se debe sobreentender que cualquier referencia a los compuestos de la presente invención hace referencia también a los profármacos correspondientes de los compuestos de la presente invención, según corresponda y sea oportuno.
- Además, los compuestos de la presente invención, incluidas sus sales, también se pueden obtener en forma de sus hidratos o pueden incluir otros disolventes utilizados para su cristalización.
- Tal como se utiliza en la presente, el término «población» puede ser cualquier grupo de al menos dos individuos. Una población puede incluir, por ejemplo, sin carácter limitante, una población de referencia, un grupo de población, una población familiar, una población clínica y una población del mismo sexo.
- Tal como se utiliza en la presente, el término «polimorfismo» se refiere a cualquier variante de secuencia presente con una frecuencia de >1% en una población. La variante de secuencia puede estar presente con una frecuencia significativamente superior a un 1% tal como un 5% o un 10% o más. Además, el término se puede utilizar para hacer referencia a la variación de secuencia observada en un individuo en un sitio polimórfico. Los polimorfismos incluyen sustituciones, inserciones, deleciones y microsátélites de nucleótidos y pueden, aunque no necesariamente, dar lugar a diferencias detectables en la expresión génica o la función proteica.
- Tal como se utiliza en la presente, el término «polinucleótido» se refiere a cualquier ARN o ADN, que puede ser ARN o ADN no modificado o modificado. Los «polinucleótidos» incluyen, sin limitación, ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario, ARN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, y moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más habitualmente, bicatenarios o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. Además, el término polinucleótido se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contiene una o más bases modificadas y ADN o ARN con esqueletos modificados, por ejemplo, por estabilidad o por otras razones.
- Tal como se utiliza en la presente, el término «polipéptido» se refiere a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos. El término polipéptido se refiere tanto a cadenas cortas, normalmente denominados péptidos, glicopéptidos u oligómeros, como a cadenas largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes. Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas por procesos naturales, tales como el procesamiento posterior a la traducción, o mediante técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una abultada bibliografía de investigación.
- Tal como se utiliza en la presente, la expresión «población estándar de referencia» se refiere a una población caracterizada por una o más características biológicas, por ejemplo, respuesta a fármacos, genotipo, haplotipo, fenotipo, etc.

Tal como se utiliza en la presente, el término «sujeto» se refiere a que preferentemente el sujeto es un mamífero tal como un ser humano, pero también puede ser un animal, que incluye, sin carácter limitante, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, monos tales como monos cinomolgos, ratas, ratones, cerdos de guinea y similares).

5

Tal como se utiliza en la presente, una «muestra de prueba» se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser un fluido biológico (por ejemplo, suero), muestra celular, o tejido, o ácido nucleico aislado o polipéptido obtenido a partir de este.

10

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «fluido corporal» es un fluido biológico seleccionado entre un grupo que comprende sangre, bilis, plasma sanguíneo, suero, humor acuoso, fluido amniótico, fluido cerebroespinal, sebo, jugo intestinal, semen, esputo, sudor y orina.

15

Tal como se utiliza en la presente, el término «desregulación» se refiere a un cambio que es mayor o igual a un factor 1,2 y estadísticamente significativo ($p < 0,05$, prueba t de Student) respecto al control. Por ejemplo, un cambio en un factor 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5.

20

Tal como se utiliza en la presente, la expresión «estadísticamente significativo» se refiere a un valor $p < 0,05$ en comparación con el control utilizando la prueba t de Student.

25

La frase «que se hibrida específicamente a», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una sonda de oligonucleótidos de forma preferencial a una secuencia de nucleótidos diana particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia se encuentra presente en una mezcla de complejo (tal como ADN o ARN celular total). Preferentemente, una sonda se puede unir, formar dúplex o hibridar solamente a la molécula diana particular.

30

El término «condiciones rigurosas» se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, pero mínimamente a otras secuencias. Preferentemente, puede que una sonda no se hibride a secuencias que no sean su diana en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. En general, se pueden seleccionar las condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual un 50% de las sondas de oligonucleótidos complementarias a un ácido nucleico diana se hibridan al ácido nucleico diana en el equilibrio. Como los ácidos nucleicos por lo general se encontrarán presentes en exceso, a la T_m , un 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio. A modo de ejemplo, condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales sea al menos aproximadamente una concentración de 0,01 a 1,0 M de iones Na^+ (u otras sales) a un pH 7,0 a 8,3 y la temperatura sea de al menos 30 °C para las sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Las sondas de oligonucleótidos se pueden utilizar para detectar secuencias de ácidos nucleicos complementarias (es decir, dianas de ácido nucleico) en una muestra representativa adecuada. Dicha unión complementaria constituye la base de la mayoría de las técnicas en las que se pueden utilizar oligonucleótidos para detectar, y de este modo permitir la comparación de, la expresión de genes particulares. Las tecnologías preferidas permiten la cuantificación paralela de la expresión de múltiples genes e incluyen tecnologías en las que la amplificación y la cuantificación de especies se acoplan en tiempo real, tales como las tecnologías de PCR de transcripción inversa cuantitativa y tecnologías donde tiene lugar una cuantificación de especies amplificadas después de la amplificación, tal como las tecnologías de matrices. Las tecnologías de ensayo conllevan la hibridación de muestras, representativa de la expresión génica dentro de la muestra objeto o de control, con una pluralidad de sondas de oligonucleótidos, donde cada sonda se hibrida de forma preferencial a un gen o varios genes divulgados. Las tecnologías de matrices contemplan la identificación única de secuencias de oligonucleótidos específicas, por ejemplo, por su posición física (por ejemplo, una cuadrícula en una matriz bidimensional proporcionada en el mercado por Affymetrix Inc.) o por asociación con otro rasgo (por ejemplo, perlas marcadas proporcionadas en el mercado por Illumina Inc o Luminex Inc). Las matrices de oligonucleótidos pueden sintetizarse *in situ* (por ejemplo, mediante síntesis dirigida por la luz proporcionada en el mercado por Affymetrix Inc) o preformarse y depositarse por contacto o tecnología de chorro de tinta (proporcionada en el mercado por Agilent o Applied Biosystems). Será evidente para los expertos en la técnica que secuencias de ADNc parciales o totales también pueden servir como sondas para la tecnología de matrices (proporcionadas en el mercado por Clontech). Se pueden utilizar sondas de oligonucleótidos en técnicas de transferencia tales como transferencia de Southern o transferencia de Northern, para detectar y comparar la expresión génica (por ejemplo, por medio de moléculas diana de ADNc o ARNm representativas de la expresión génica). Las técnicas y los reactivos adecuados para su uso en técnicas de transferencia de Southern o Northern serán muy conocidas para los expertos en la técnica. En resumen, las muestras que comprenden moléculas diana de ADN (en el caso de la transferencia de Southern) o ARN (en el caso de la transferencia de Northern) se separan según su capacidad de penetrar en un gel de un material tal como acrilamida o agarosa. La penetración del gel puede estar guiada por acción capilar o por la actividad de un campo eléctrico. Una vez que se ha logrado la separación de las moléculas diana, estas moléculas se transfieren a una membrana fina (habitualmente de nailon o nitrocelulosa) antes de inmovilizarlas en la membrana (por

60

ejemplo, mediante cocido o radiación ultravioleta). A continuación, la expresión génica se puede detectar y comparar mediante hibridación de las sondas de oligonucleótidos a las moléculas diana unidas a la membrana.

5 En determinadas circunstancias el uso de protocolos de hibridación tradicional para comparar la expresión génica puede resultar problemático. Por ejemplo, puede ser difícil distinguir entre dos o más productos génicos de aproximadamente el mismo peso molecular con las técnicas de transferencia, puesto que dichos productos con un tamaño similar son difíciles de separar utilizando geles. Por consiguiente, en dichas circunstancias puede que se prefiera comparar la expresión génica utilizando técnicas alternativas tales como las descritas más adelante.

10 La expresión génica en una muestra que representa la expresión génica en un sujeto se puede evaluar haciendo referencia a los niveles de transcrito global en muestras de ácido nucleico adecuadas por medio de tecnología de matrices con alta densidad de oligonucleótidos. Dichas tecnologías hacen uso de matrices en las que se anclan sondas de oligonucleótidos, por ejemplo, mediante unión covalente, a un soporte sólido. Estas matrices de sondas de oligonucleótidos inmovilizadas en soportes sólidos representan componentes preferidos para utilizar en los métodos y kits de la invención para la comparación de la expresión génica. Se puede fijar un número elevado de dichas sondas de esta forma para proporcionar matrices adecuadas para la comparación de la expresión de un número elevado de genes. Otras metodologías adecuadas que se pueden utilizar en la comparación de las dianas de ácido nucleico representativas de la expresión génica incluyen, sin carácter limitante, amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA); o amplificación de ADN por círculo rodante (RCA).

20 El término «epítomos», tal como se utiliza en la presente, se refiere a porciones de un polipéptido que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un animal, en algunas realizaciones, un mamífero, por ejemplo, en un ser humano. En una realización, la presente invención engloba un polipéptido que comprende un epítipo, así como el polinucleótido que codifica este polipéptido. Un «epítipo inmunogénico», tal como se utiliza en la presente, se define como una porción de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal, determinada mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante los métodos para generar anticuerpos descritos más adelante. (Remítase, por ejemplo, a Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002 (1983)). La expresión «epítipo antigénico», tal como se utiliza en la presente, se define como una porción de una proteína a la cual un anticuerpo puede unirse inmunoespecíficamente su antígeno, tal como se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en la presente. La unión inmunoespecífica excluye la unión inespecífica, pero no necesariamente excluye la reactividad cruzada con otros antígenos. No es necesario que los epítomos antigénicos sean necesariamente inmunogénicos. Se pueden producir fragmentos que funcionan como epítomos por cualquier medio convencional. (Remítase, por ejemplo, a Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135 (1985), que se describe adicionalmente en la Patente de EE. UU. N.º 4 631 211).

35 Como apreciará un experto en la técnica, y tal como se ha discutido anteriormente, los polipéptidos que comprenden un epítipo inmunogénico o antigénico se pueden fusionar a otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden fusionar con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o porciones de este (CH1, CH2, CH3, o cualquier combinación de estas y porciones de estas), o albúmina (que incluye, sin carácter limitante, albúmina recombinante (remítase, por ejemplo, a la Patente de EE. UU. N.º 5 876 969, expedida el 2 de marzo de 1999, la patente EP 0 413 622 y la Patente de EE. UU. N.º 5 766 883, expedida el 16 de junio de 1998)), lo que da como resultado polipéptidos quiméricos. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y pueden aumentar la semivida *in vivo*. Esto se ha mostrado para proteínas quiméricas constituidas por los dos primeros dominios del polipéptido-CD4 humano y varios dominios de las regiones constantes de las cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas de mamíferos. Remítase, por ejemplo, al documento EP 394 827; Trauneker *et al.*, *Nature*, 331:84-86 (1988).

50 Se ha demostrado el suministro aumentado de un antígeno a través de la barrera epitelial al sistema inmunitario para los antígenos (por ejemplo, insulina) conjugados a una pareja de unión a FcRn tal como fragmentos de Fc o IgG (remítase, por ejemplo, a las Publicaciones PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). También se ha observado que las proteínas de fusión de IgG que tienen una estructura dimérica conectada por disulfuro debido a los enlaces disulfuro de la porción de IgG son más eficientes en la unión y neutralización de otras moléculas que los polipéptidos o fragmentos monoméricos de estos solos. Remítase, por ejemplo, a Fountoulakis *et al.*, *J. Biochem.*, 270:3958-3964 (1995). Los ácidos nucleicos que codifican los epítomos anteriores también se pueden recombinar con un gen de interés como una etiqueta de epítipo (por ejemplo, la hemaglutinina (etiqueta «HA» o etiqueta flag) para contribuir a la detección y purificación del polipéptido expresado. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht *et al.* Permite la purificación sencilla de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia, de modo que el marco abierto de lectura del gen se fusione mediante la traducción a una etiqueta de aminoácidos constituida por seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con el virus vaccinia recombinante se cargan en una columna de agarosa-ácido nitriloacético Ni²⁺ y se pueden eluir selectivamente las proteínas etiquetadas con histidina con tampones que contienen imidazol. Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de redistribución de genes, redistribución de motivos, redistribución de exones y/o redistribución de codones (denominadas colectivamente "redistribución de ADN"). La redistribución de ADN

se puede emplear para modular las actividades de los polipéptidos de la invención, dichos métodos se pueden utilizar para generar polipéptidos con actividad alterada, así como agonistas y antagonistas de los polipéptidos. Remítase, de forma general, a las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 605 793; 5 811 238; 5 830 721; 5 834 252; y 5 837 458, y Patten *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33 (1997); Harayama, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82 (1998); Hansson, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 287:265-76 (1999); y Lorenzo y Blasco, *Biotechniques* 24(2):308-13 (1998).

Los anticuerpos de la invención incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), fragmentos producidos por una colección de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. El término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Además, en el contexto de la presente invención, el término «anticuerpo» englobará también moléculas alternativas que tienen la misma función, por ejemplo, aptámeros y/o CDR injertados en marcos peptídicos o no peptídicos alternativos. En algunas realizaciones, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos e incluyen, sin carácter limitante, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs conectados por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, que incluyen anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la o las regiones variables solas o combinadas con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que comprenden también cualquier combinación de una o varias regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal que incluye pájaros y mamíferos. En algunas realizaciones, los anticuerpos son humanos, murinos (por ejemplo, de ratón y rata), de burro, oveja, conejo, cabra, cerdo de guinea, camello, tiburón, caballo o pollo. Tal como se utiliza en la presente, los anticuerpos «humanos» incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de colecciones de inmunoglobulina humana o a partir de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe más adelante y, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 5 939 598 de Kucherlapati *et al.* Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, biespecíficos, trispecíficos o con mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido o pueden ser específicos tanto para un polipéptido como para un epítipo heterólogo tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Remítase, por ejemplo, a las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, *et al.*, *J. Immunol.* 147:60-69 (1991); Patentes de EE. UU. N.ºs 4 474 893; 4 714 681; 4 925 648; 5 573 920; 5 601 819; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden describir o especificar en términos de el o los epítopos o porciones de un polipéptido que reconocen o a los que se unen específicamente. El o los epítopos o porciones polipeptídicas se pueden especificar como se describe en la presente, por ejemplo, por posiciones N terminales y C terminales, por tamaño en residuos de aminoácidos contiguos. Los anticuerpos también se pueden describir o especificar en términos de su reactividad cruzada. Se incluyen los anticuerpos que no se unen a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido de la presente invención. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos con al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos un 75%, al menos un 70%, al menos un 65%, al menos un 60%, al menos un 55% y al menos un 50% de identidad (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) a un polipéptido también se incluyen en la presente invención. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención reaccionan de forma cruzada con homólogos murinos, de rata y/o conejo de proteínas humanas y los correspondientes epítopos de estos. Los anticuerpos que no se unen a polipéptidos con menos de un 95%, menos de un 90%, menos de un 85%, menos de un 80%, menos de un 75%, menos de un 70%, menos de un 65%, menos de un 60%, menos de un 55% y menos de un 50% de identidad (calculada utilizando métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente) respecto a un polipéptido también se incluyen en la presente invención.

Los anticuerpos también se pueden describir o especificar en términos de su afinidad de unión a un polipéptido. Los anticuerpos pueden actuar como agonistas o antagonistas de los polipéptidos reconocidos. La invención también presenta anticuerpos con especificidad por receptores que no evitan la unión a ligandos, pero evitan la activación de receptores. La activación del receptor (es decir, señalización) se puede determinar mediante técnicas descritas en la presente o conocidas de otro modo en la técnica. Por ejemplo, la activación del receptor se puede determinar detectando la fosforilación (por ejemplo, tirosina o serina/treonina) del receptor o de uno de sus sustratos posteriores mediante inmunoprecipitación seguida por análisis con transferencia de Western (por ejemplo, tal como se ha descrito antes). En realizaciones específicas, se proporcionan anticuerpos que inhiben la actividad del ligando o la actividad del receptor en al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, al menos un 80%, al menos un 75%, al menos un 70%, al menos un 60% o al menos un 50% de la actividad en ausencia del anticuerpo.

La invención también presenta anticuerpos con especificidad por un receptor que evitan tanto la unión del ligando como la activación del receptor, así como anticuerpos que reconocen el complejo ligando-receptor. Del mismo modo, se engloban en la invención anticuerpos que se unen al ligando, con lo que se evita la activación del receptor, pero no evitan que el ligando se una al receptor. Los anticuerpos se pueden especificar como agonistas, antagonistas o agonistas inversos de actividades biológicas que comprenden las actividades biológicas específicas de los péptidos divulgados en la presente. Los agonistas de anticuerpos anteriores se pueden producir utilizando métodos conocidos en la técnica. Remítase, por ejemplo, a la publicación PCT WO 96/40281; la Patente de EE. UU. N.º 5 811 097; Deng *et al.*, *Blood* 92(6):1981-1988 (1998); Chen *et al.*, *Cancer Res.* 58(16):3668-3678 (1998); Harrop *et al.*, *J. Immunol.* 161(4):1786-1794 (1998); Zhu *et al.*, *Cancer Res.* 58(15):3209-3214 (1998); Yoon *et al.*, *J. Immunol.* 160(7):3170-3179 (1998); Prat *et al.*, *J. Cell. Sci.* III(Pt2):237-247 (1998); Pitard *et al.*, *J. Immunol. Methods* 205(2):177-190 (1997); Liautard *et al.*, *Cytokine* 9(4):233-241 (1997); Carlson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(17):11295-11301 (1997); Taryman *et al.*, *Neuron* 14(4):755-762 (1995); Muller *et al.*, *Structure* 6(9):1153-1167 (1998); Bartunek *et al.*, *Cytokine* 8(1):14-20 (1996).

Tal como se discute en más detalle a continuación, los anticuerpos se pueden utilizar solos o combinados con otras composiciones. Los anticuerpos pueden fusionarse además de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse químicamente (incluidas conjugaciones de forma covalente y de forma no covalente) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse de forma recombinante o conjugarse a moléculas útiles como marcas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Remítase, por ejemplo, a las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Patente de EE. UU. N.º 5 314 995; y documento EP 396 387. Los anticuerpos definidos para la presente invención incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no evite que el anticuerpo genere una respuesta antiidiotípica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, conexión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, sin carácter limitante, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden generar mediante cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos policlonales para un antígeno de interés se pueden producir mediante varios procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede administrar a varios animales hospedadores que incluyen, sin carácter limitante, conejos, ratones, ratas, etc., para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno.

Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria, dependiendo de las especies hospedadoras e incluyen, sin carácter limitante, el adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales como hidróxido de aluminio, surfactantes como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacilo de *Calmette Guérin*) y *corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son muy conocidos en la técnica.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de presentación de fagos, recombinantes y de hibridoma, o una combinación de estas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la técnica y divulgadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión «anticuerpo monoclonal», tal como se utiliza en la presente, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. La expresión «anticuerpo monoclonal» se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el método por el cual se produce.

Los métodos para la producción y cribado para encontrar anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridoma son rutinarios y muy conocidos en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención se pueden producir mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Por ejemplo, los anticuerpos también se pueden generar utilizando varios métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fagos, los dominios de anticuerpo funcionales se presentan en la superficie de las partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, dicho fago se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio

o colección de anticuerpos combinatorios (por ejemplo, humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, utilizando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos utilizados en estos métodos son habitualmente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión a M13 y fd expresados a partir del fago con dominios de anticuerpo Fv estabilizados con disulfuros, Fv o Fab fusionados de forma recombinante a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que se pueden utilizar para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen los divulgados en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, *Gene* 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); Solicitud PCT N.º PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de EE. UU. N.ºs 5 698 426; 5 223 409; 5 403 484; 5 580 717; 5 427 908; 5 750 753; 5 821 047; 5 571 698; 5 427 908; 5 516 637; 5 780 225; 5 658 727; 5 733 743 y 5 969 108. Tal como se describe en estas referencias, después de la selección de fagos, las regiones que codifican anticuerpos del fago pueden aislarse y utilizarse para generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, que incluye células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, por ejemplo, tal como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los divulgados en la publicación PCT WO 92/22324, Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); y Sawai *et al.*, *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better *et al.*, *Science* 240:1041-1043 (1988).

Los ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir anticuerpos y Fv monocatenarios incluyen los descritos en las Patentes de EE. UU. 4 946 778 y 5 258 498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu *et al.*, *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040 (1988). Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible utilizar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones del anticuerpo se obtienen a partir de diferentes especies animales tales como anticuerpos que tienen una región variable procedente de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Remítase, por ejemplo, a Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies *et al.*, (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Patentes de EE. UU. N.ºs 5 807 715; 4 816 567 y 4 816 397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región del marco de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los residuos de marco en las regiones de marco humanas se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar y/o mejorar la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, p. ej., modelando las interacciones de la CDR y los residuos de marco para identificar residuos de marco importantes para la unión a antígeno y la comparación de la secuencia para identificar residuos de marco inusuales en posiciones particulares. (Remítase, por ejemplo, a Queen *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5 585 089; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988). Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando una serie de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239 400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de EE. UU. N.ºs 5 225 539; 5 530 101; y 5 585 089), revestimiento o recubrimiento (EP 592 106; EP 519 596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska *et al.*, *PNAS* 91:969-973 (1994)), y redistribución de cadena (Patente de EE. UU. N.º 5 565 332). Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos mediante una serie de métodos conocidos en la técnica que incluyen los métodos de presentación de fagos descritos anteriormente utilizando colecciones de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humanas. Remítase también a las Patentes de EE. UU. N.ºs 4 444 887 y 4 716 111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

También se pueden producir anticuerpos humanos utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que expresan genes de inmunoglobulina humanos. Por ejemplo, se pueden introducir complejos génicos de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera humanas de forma aleatoria o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, se pueden introducir la región variable, región constante y región de diversidad humanas en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón se pueden volver no funcionales por separado o de forma simultánea con la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos a continuación se cruzan para producir una progenie homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener a partir de ratones transgénicos inmunizados utilizando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos albergados en los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de los linfocitos B, y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. Por

tanto, utilizando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para consultar una revisión de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, remítase a Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para consultar una discusión detallada de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, remítase, por ejemplo, a las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; Patente Europea N.º 0 598 877; Patentes de EE. UU. N.ºs 5 413 923; 5 625 126; 5 633 425; 5 569 825; 5 661 016; 5 545 806; 5 814 318; 5 885 793; 5 916 771; y 5 939 598. Además, empresas como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San José, CA) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente. Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada «selección guiada». En esta estrategia, se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, *Bio/technology* 12:899-903 (1988)). Además, se pueden utilizar anticuerpos para generar anticuerpos antiidiotipo que «imitan» polipéptidos utilizando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. (Remítase, por ejemplo, a Greenspan & Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444; (1989) y Nissinoff, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991)). Por ejemplo, los anticuerpos que se unen e inhiben competitivamente la multimerización de polipéptidos; y/o la unión de un polipéptido a un ligando se puede utilizar para generar antiidiotipos que «imitan» la multimerización de polipéptidos; y/o un dominio de unión y, en consecuencia, se unen y neutralizan un polipéptido y/o su ligando. Dichos antiidiotipos o fragmentos Fab neutralizantes de dichos antiidiotipos se pueden utilizar en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando del polipéptido. Por ejemplo, dichos anticuerpos antiidiotípicos se pueden utilizar para unir un polipéptido y/o para unir sus ligandos/receptores, y bloquear así su actividad biológica. También se engloban los polinucleótidos que codifican anticuerpos, que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Estos polinucleótidos se pueden obtener, y se puede determinar la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, se puede ensamblar un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, tal como se describe en Kutmeier *et al.*, *BioTechniques* 17:242 (1994)), que, en resumen, conlleva la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y el ligamiento de esos oligonucleótidos y posteriormente la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

La secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y/o ligera se puede inspeccionar para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mediante métodos que son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidos de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Utilizando técnicas de ADN recombinante rutinarias, se pueden insertar una o más de las CDR dentro de regiones de marco, por ejemplo, en regiones de marco humanas para humanizar un anticuerpo no humanizado, tal como se ha descrito antes. Las regiones de marco pueden ser regiones de marco de origen natural o de consenso, y en algunas realizaciones, regiones de marco humanas (remítase, por ejemplo, a Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998) para consultar un listado de regiones de marco humanas). En algunas realizaciones, el polinucleótido generado por la combinación de las regiones de marco y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido. En algunas realizaciones, tal como se ha discutido antes, se pueden llevar a cabo una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones de marco y, en algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácido mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Además, dichos métodos se pueden utilizar para llevar a cabo sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios. Otras alteraciones del polinucleótido están comprendidas por la presente descripción y dentro de la competencia de la técnica.

Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de «anticuerpos quiméricos» (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608 (1984); Takeda *et al.*, *Nature* 314:452-454 (1985)) cortando y empalmado genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Tal como se ha descrito antes, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que se obtienen diferentes porciones a partir de especies animales diferentes, tales como las que tienen una región variable obtenida a partir de un mAAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Como alternativa, se pueden adaptar las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de EE. UU. N.º 4 946 778; Bird, *Science* 242:423-42 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); y Ward *et al.*, *Nature* 334:544-54 (1989)) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman conectando los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, lo que da como resultado un polipéptido monocatenario. También se pueden utilizar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, *Science* 242:1038-1041 (1988)). La presente invención engloba anticuerpos fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente (que incluyen tanto conjugaciones de forma covalente como de forma no covalente) a un polipéptido (o porción de este, en algunas realizaciones, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión no tiene que ser

necesariamente directa, sino que puede tener lugar a través de secuencias conectoras. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos distintos de los polipéptidos (o porción de estos, en algunas realizaciones, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos del polipéptido). Además, un anticuerpo o fragmento de este se puede conjugar a un resto terapéutico, por ejemplo, para aumentar su actividad terapéutica. Los conjugados se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica determinada, no se debe interpretar que el agente terapéutico o resto farmacológico se limita a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina difteria; una proteína tal como un factor de necrosis tumoral, un interferón a, interferón B, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF-alfa, TNF-beta, AIM I (Remítase a la Publicación Internacional N.º WO 97/33899), AIM 11 (Remítase a la Publicación Internacional N.º WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994)), VEGF (Remítase a la Publicación Internacional N.º WO 99/23105), un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento. Las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico a anticuerpos son muy conocidas, remítase, por ejemplo, a Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2.ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982). Como alternativa, se puede conjugar un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos tal como describe Segal en la Patente de EE. UU. N.º 4 676 980.

La presente invención también se refiere a terapias basadas en anticuerpos que conllevan la administración de anticuerpos de la invención a un paciente animal, en algunas realizaciones, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, para tratar enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos terapéuticos incluyen, sin carácter limitante, anticuerpos (que incluyen fragmentos, análogos y derivados de estos descritos en la presente) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención (que incluyen fragmentos, análogos y derivados de estos y anticuerpos antiidiotípicos descritos en la presente). Los anticuerpos de la invención se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables conocidas en la técnica o descritas en la presente.

La invención también proporciona métodos para tratar enfermedades neurodegenerativas en un sujeto aumentando la actividad enzimática de HDAC6 mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica que comprende un compuesto agnóstico de HDAC6. En algunas realizaciones, dicho compuesto inhibidor es una molécula de bajo peso molecular, un anticuerpo o un ARNpi. En una realización, el compuesto está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente exento de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseados). El sujeto es en algunas realizaciones, un animal que incluye, sin carácter limitante, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es en algunas realizaciones, un mamífero, por ejemplo, humano.

Las formulaciones y métodos de administración que se pueden emplear cuando el compuesto comprende un ácido nucleico o una inmunoglobulina se han descrito anteriormente; se pueden seleccionar formulaciones y rutas de administración adicionales apropiadas entre las descritas más adelante en la presente.

Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar un compuesto, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (remítase, por ejemplo, a Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, sin carácter limitante, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej. mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar con un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio tal como un reservorio de Ommaya. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente aerosolizante.

5 En una realización específica, puede ser deseable administrar los compuestos o composiciones farmacéuticos de la invención localmente al área que requiere tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas tales como membranas sialásticas o fibras.

10 En otra realización, el compuesto o composición se puede suministrar en una vesícula, en particular, un liposoma (remítase a Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, misma fuente., págs. 317-327; remítase, de forma general, a la misma fuente). En otra realización más, el compuesto o la composición se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (remítase a Langer, supra; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (remítase a *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); remítase también a Levy *et al.*, *Science* 228:190 (1985); During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). En otra realización más, se puede colocar una fracción de la dosis sistémica (remítase, por ejemplo, a Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Se discuten otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

25 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas aumentando la actividad enzimática de HDAC6. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto inhibidor, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión «farmacéuticamente aceptable» significa aprobada por un organismo regulador del gobierno federal o estatal o indicada en la farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas reconocidas en general para utilizar en animales, y más particularmente en seres humanos. El término «portador» se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el producto terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos, pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluidos los derivados del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o tamponantes de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en «Remington's Pharmaceutical Sciences» de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, en algunas realizaciones, en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador a fin de proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

50 En una realización, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Habitualmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

55 Por lo general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o una bolsita que indique la cantidad de agente activo.

60 Cuando la composición se ha de administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Los compuestos de la invención se pueden formar como formas neutras o de sal.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellos formados con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

5 La cantidad del compuesto que será eficaz en el tratamiento, la inhibición y la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o la actividad aberrante de un polipéptido de la invención se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para contribuir a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la seriedad de la enfermedad o trastorno, y se debería decidir conforme al criterio del facultativo y las

10 circunstancias de cada paciente.

Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta obtenidas a partir de sistemas de prueba de modelos *in vitro* o animales. Para los anticuerpos, la dosis administrada a un paciente es habitualmente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. En algunas realizaciones, la dosis administrada a un paciente es de entre 0.1

15 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, por ejemplo, de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. Por lo general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más prolongada dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria frente a los polipéptidos exógenos. Por tanto, a menudo es posible la administración de dosis menores de anticuerpos humanos y menos frecuentes. Además, la dosis y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención se puede reducir aumentando la captación y penetración tisular (por

20 ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

También se engloba un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado con dicho recipiente o recipientes puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o

25 venta de productos farmacéuticos o biológicos, donde el aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.

Los anticuerpos englobados en la presente también pueden ser derivados modificados químicamente que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación mayores del polipéptido, o inmunogenicidad reducida (remítase a la Patente de EE. UU. N.º 4 179 337). Los restos químicos para la derivatización se pueden seleccionar entre polímeros hidrosolubles tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico y similares. Los anticuerpos se pueden modificar en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o

30 más restos químicos unidos. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido es de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 000 kDa (indicando el término «aproximadamente» que en los preparados de polietilenglicol algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular señalado) por facilidad en la manipulación y fabricación. Se pueden utilizar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol frente a una proteína terapéutica o análogo. Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de aproximadamente 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000,

35 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10 000, 10 500, 11 000, 11 500, 12 000, 12 500, 13 000, 13 500, 14 000, 14 500, 15 000, 15 500, 16 000, 16 500, 17 600, 17 500, 18 000, 18 500, 19 000, 19 500, 20 000, 25 000, 30 000, 35 000, 40 000, 50 000, 55 000, 60 000, 65 000, 70 000, 75 000, 80 000, 85 000, 90 000, 95 000 o 100 000 kDa. Tal como se ha señalado anteriormente, el polietilenglicol puede tener una estructura ramificada. Se describen polietilenglicoles ramificados, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 5 643 575; Morpurgo *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); y Caliceti *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 10:638-646 (1999). Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) se deberían unir a la proteína tomando en consideración los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existen una serie de métodos de unión disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo, el documento EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), remítase también a Malik *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (1992) (que divulga la pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede estar unido covalentemente mediante residuos de aminoácidos a través de un grupo reactivo tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que se puede unir una molécula de polietilenglicol activada. Los residuos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácidos N terminales; aquellos que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico y residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido C terminal. También se pueden utilizar grupos sulfhidrilo como grupos reactivos para unir las moléculas de polietilenglicol. A efectos terapéuticos se prefiere la unión en un grupo amino tal como la unión en el grupo lisina o extremo N. Tal como se ha sugerido anteriormente, se puede unir polietilenglicol a las proteínas a través de una conexión a cualquiera de una serie de

40 aminoácidos. Por ejemplo, se puede unir polietilenglicol a las proteínas a través de enlaces covalentes con residuos de lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína. Se pueden emplear una o más químicas de reacción para unir polietilenglicol a residuos de aminoácidos específicos (por ejemplo, lisina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína) de la proteína o a más de un tipo de residuo de aminoácido (por ejemplo, lisina, histidina, ácido aspártico, ácido

45 50 55 60

glutámico, cisteína y combinaciones de estos) de la proteína. Tal como se ha indicado anteriormente, la pegilación de las proteínas de la invención se puede conseguir por cualquier número de medios. Por ejemplo, se puede unir polietilenglicol a la proteína directamente o mediante un conector intermedio. Se describen sistemas sin conectores para unir polietilenglicol a proteínas en Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992); Francis *et al.*, *Intern. J. of Hematol.* 68:1-18 (1998); Patente de EE. UU. N.º 4 002 53 1; Patente de EE. UU. N.º 5 349 052; WO 95/06058 y WO 98/32466.

El término «ARNpi» o la expresión «ácido ribonucleico pequeño interferente» de acuerdo con la invención tiene los significados conocidos en la técnica, que incluyen los siguientes aspectos. El ARNpi consta de dos hebras de ribonucleótidos que se hibridan a lo largo de una región complementaria en condiciones fisiológicas. Las hebras normalmente están separadas. Debido a que las dos hebras tienen funciones separadas en una célula, una hebra se denomina hebra «antisentido», también conocida como la secuencia «guía», y se utiliza en el complejo de RISC funcional para guiarlo al ARNm correcto para la escisión. Este uso del término «antisentido», debido a que se refiere a un compuesto de ARN, es diferente de los compuestos de ADN diana antisentido a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva. La otra hebra se conoce como la secuencia «antigua» y, debido a que contiene la misma secuencia de nucleótidos que la secuencia diana, también se conoce como la hebra sentido. Las hebras se pueden unir mediante un conector molecular en determinadas realizaciones. Los ribonucleótidos individuales pueden ser ribonucleótidos naturales no modificados, desoxirribonucleótidos naturales no modificados o pueden estar modificados químicamente o ser sintéticos tal como se describe en otra parte en la presente. En algunas realizaciones, la molécula de ARNpi es sustancialmente idéntica a al menos una región de la secuencia codificante del gen diana para permitir la reducción de la expresión del gen. En algunas realizaciones, el grado de identidad entre la secuencia de la molécula de ARNpi y la región utilizada como diana del gen es al menos un 60% de identidad de secuencia, en algunas realizaciones al menos un 75% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos un 85% de identidad, 90% de identidad, al menos un 95% de identidad, al menos un 97% o al menos un 99% de identidad.

El cálculo de las identidades porcentuales entre diferentes secuencias de aminoácido/polipéptido/ácido nucleico se pueden llevar a cabo de la siguiente manera. Se genera en primer lugar un alineamiento múltiple con el programa ClustalX (parámetros por pares: apertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,1, matriz de proteínas Gonnet 250, matriz de ADN IUB; parámetros múltiples: apertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,2, retraso de secuencias divergentes 30%, peso de transición de ADN 0,5, matriz negativa desactivada, serie de matrices de proteínas gonnet, peso de ADN IUB; parámetros de hueco de las proteínas: penalizaciones específicas para residuos activadas, penalizaciones hidrófilas activadas, residuos hidrófilos GPSNDQERK, distancia de separación de huecos 4, separación de hueco final desactivada). A continuación, la identidad porcentual se calcula a partir del alineamiento múltiple como $(N/T)*100$, donde N es el número de posiciones en las que las dos secuencias comparten un residuo idéntico y T es el número total de posiciones comparadas. Como alternativa, se puede calcular la identidad porcentual como $(N/S)*100$, donde S es la longitud de la secuencia más corta que se compara. Las secuencias de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos se pueden sintetizar de novo, o pueden ser una secuencia de aminoácidos/polipéptidos/ácidos nucleicos, o un derivado de estas. Una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar será codificada por una secuencia que se hibrida con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos a las que se hace referencia en la presente o sus complementos en condiciones rigurosas. Por condiciones rigurosas, se pretende hacer referencia a que el nucleótido se hibrida a ADN o ARN unido al filtro en 6x de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C seguido de al menos un lavado en 0,2x de SSC/0,1% de SDS a aproximadamente 5-65°C. Como alternativa, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en al menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos de las secuencias peptídicas de acuerdo con la presente invención. Debido a la degeneración del código genético, está claro que cualquier secuencia de ácidos nucleicos se podría variar o cambiar sin afectar sustancialmente a la secuencia de la proteína codificada por esto, para proporcionar una variante funcional de esta. Las variantes de nucleótidos adecuadas son las que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, con lo cual se produce un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas, pero que comprenden todas, o porciones de, las secuencias que se alteran con la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido que sustituye, para producir un cambio conservativo. Por ejemplo, los aminoácidos hidrófobos no polares de pequeño tamaño incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina; los aminoácidos hidrófobos no polares de gran tamaño incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina; los aminoácidos polares neutros incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. El alineamiento preciso de secuencias de proteínas o ADN es un proceso complejo, que ha sido investigado en detalle por una serie de investigadores. De particular importancia es el equilibrio entre el apareamiento óptimo de secuencias y la introducción de huecos para obtener dicho apareamiento. En el caso de las proteínas, también es significativo el medio por el cual se puntúan los apareamientos. La familia de matrices PAM (por ejemplo, Dayhoff, M. *et al.*, 1978, *Atlas of protein sequence and structure, Natl. Biomed. Res. Found.*) y las matrices BLOSUM cuantifican la naturaleza y la probabilidad de sustituciones conservativas y se utilizan en múltiples algoritmos de alineamiento, aunque los expertos en la técnica conocerán otras matrices igualmente aplicables. El programa de alineamiento múltiple popular ClustalW, y si versión de windows ClustalX (Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680; Thompson *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882) son formas

eficientes para generar múltiples alineamientos de proteínas y ADN. Con frecuencia, los alineamientos generados automáticamente requieren alineamiento manual, lo que explota el conocimiento del usuario entrenado sobre la familia de proteínas que se está estudiando, por ejemplo, el conocimiento biológico de sitios conservados clave. Un programa editor de alineamientos de este tipo es Align (<http://www.gwdg.de/dhepper/download/>; Hepperle, D., 2001: Multicolor Sequence Alignment Editor. Instituto de ecología del agua dulce y pesca interior, 16775 Stechlin, Alemania), aunque otras tales como JalView o Cinema también son adecuadas. El cálculo de las identidades porcentuales entre proteínas tiene lugar durante la generación de alineamientos múltiples de Clustal. Sin embargo, es necesario recalcular estos valores si el alineamiento se ha mejorado manualmente, o para la comparación deliberada de dos secuencias. Los programas que calculan este valor para pares de secuencias de proteínas dentro de un alineamiento incluyen PROTDIST dentro del paquete filogénico PHYLIP (Felsenstein; <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>) utilizando la opción «Similarity Table» como modelo para la sustitución de aminoácidos (P). Para el ADN/ARN, existe una opción idéntica dentro del programa DNAIDST de PHYLIP. Las moléculas de ARNbc de acuerdo con la presente invención comprenden una región bicatenaria que es sustancialmente idéntica a una región del ARNm del gen diana. Una región con un 100% de identidad respecto a la secuencia correspondiente del gen diana es adecuada. Este estado se denomina «totalmente complementario». Sin embargo, la región también puede contener uno, dos o tres apareamientos erróneos en comparación con la región correspondiente del gen diana, dependiendo de la longitud de la región del ARNm utilizada como diana y, por tanto, puede no ser totalmente complementaria. En una realización, las moléculas de ARN de la presente invención se dirigen específicamente a un gen determinado. Con el fin de dirigirse solamente al ARNm deseado, el reactivo de ARNpi puede tener un 100% de homología respecto al ARNm diana y al menos 2 nucleótidos apareados erróneamente respecto a todos los demás genes presentes en la célula u organismo. En la técnica se conocen métodos para analizar e identificar ARNpi con una identidad de secuencia suficiente con el fin de inhibir de forma eficaz la expresión de una secuencia diana específica. La identidad de secuencia se puede optimizar mediante comparación de secuencias y algoritmos de alineamiento conocidos en la técnica (remítase a Gribskov y Devereux, *Sequence Analysis Primer*, Stockton Press, 1991, y a las referencias allí citadas) y calculando la diferencia porcentual entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman tal como se ha implementado en el programa informático BESTFIT utilizando los parámetros por defecto (p. ej., Grupo de computación genética de la Universidad de Wisconsin).

La longitud de la región del ARNpi complementaria a la diana, de acuerdo con la presente invención, puede ser de 10 a 100 nucleótidos, de 12 a 25 nucleótidos, de 14 a 22 nucleótidos o 15, 16, 17 o 18 nucleótidos. Cuando hay apareamientos erróneos respecto a la región diana correspondiente, generalmente se requiere que la longitud de la región complementaria sea algo más larga. En una realización, el inhibidor es una molécula de ARNpi y comprende entre aproximadamente 5 pb y 50 pb en algunas realizaciones, entre 10 pb y 35 pb, o entre 15 pb y 30 pb, por ejemplo, entre 18 pb y 25 pb. En algunas realizaciones, la molécula de ARNpi comprende más de 20 y menos de 23 pb.

Debido a que los ARNpi pueden portar extremos salientes (que pueden ser o no complementarios a la diana), o nucleótidos adicionales complementarios a sí mismos, pero no al gen diana, la longitud total de cada hebra individual de ARNpi puede ser de 10 a 100 nucleótidos, de 15 a 49 nucleótidos, de 17 a 30 nucleótidos o de 19 a 25 nucleótidos.

La frase «cada hebra tiene 49 nucleótidos o menos» se refiere a que el número total de nucleótidos consecutivos en la hebra, que incluye todos los nucleótidos modificados o sin modificar, pero no incluye ningún resto químico que se pueda añadir al extremo 3' o 5' de la hebra. Los restos químicos cortos insertados en la hebra no se cuentan, pero no se considera que un conector químico diseñado para unir dos hebras separadas cree nucleótidos consecutivos.

La frase «una protuberancia de 1 a 6 nucleótidos en al menos uno del extremo 5' o extremo 3'» se refiere a la arquitectura del ARNpi complementario que se forma a partir de dos hebras separadas en condiciones fisiológicas. Si los nucleótidos terminales son parte de la región bicatenaria del ARNpi, se considera que el ARNpi tiene extremos romos. Si uno o más nucleótidos no están apareados en un extremo, se crea una protuberancia. La longitud de la protuberancia se mide por el número de nucleótidos salientes. Los nucleótidos salientes pueden estar en el extremo 5' o el extremo 3' de cada hebra.

El ARNpi de acuerdo con la presente invención presenta una estabilidad *in vivo* elevada y puede ser particularmente adecuado para el suministro oral incluyendo al menos un nucleótido modificado en al menos una de las hebras. Por tanto, el ARNpi de acuerdo con la presente invención contiene al menos un ribonucleótido modificado artificial. Se expone una descripción extensa de muchas modificaciones químicas conocidas en la solicitud de patente PCT publicada WO 200370918. Las modificaciones adecuadas para el suministro incluyen modificaciones químicas se pueden seleccionar entre: a) una caperuza 3'; b) una caperuza 5', c) una conexión internucleósido modificada o d) un resto básico o azúcar modificado.

Las modificaciones adecuadas incluyen, sin carácter limitante, modificaciones del resto azúcar (es decir, la posición 2' del resto azúcar tal como, por ejemplo, 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi) o el resto básico (es decir, una base artificial o modificada que mantiene la capacidad de emparejarse con otra base específica en una cadena de nucleótidos alternados). Otras modificaciones incluyen las modificaciones del denominado «esqueleto» que incluyen, sin carácter limitante, el reemplazo del grupo fosfoéster (que conecta ribonucleótidos adyacentes) por, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales o fosforoditioatos.

Las modificaciones de los extremos, denominadas en ocasiones en la presente caperuzas 3' o caperuzas 5', pueden ser importantes. Las caperuzas pueden consistir simplemente en la adición de nucleótidos adicionales tales como «T-T», que se ha observado que confieren estabilidad en un ARNpi. Las caperuzas pueden consistir en químicas más complejas que sean conocidas por los expertos en la técnica.

El diseño de una molécula de ARNpi adecuada es un proceso complicado, y conlleva un análisis muy cuidadoso de la secuencia de la molécula de ARNm diana. Un método ilustrativo para el diseño de ARNpi se ilustra en el documento WO2005/059132. Después, haciendo uso de una considerable actividad inventiva, los inventores han de elegir una secuencia definida de ARNpi que posea una determinada composición de bases de nucleótidos, que tendría la afinidad y también la estabilidad requeridas para provocar la interferencia de ARN.

La molécula de ARNpi puede sintetizarse *de novo* o producirse con un microorganismo. Por ejemplo, la molécula de ARNpi se puede producir con bacterias, por ejemplo, *E. coli*. Los métodos para la síntesis de ARNpi, incluido ARNpi que contiene al menos un ribonucleótido modificado o artificial son muy conocidos y fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se exponen varias químicas sintéticas en las solicitudes de patente PCT publicadas WO2005021749 y WO200370918. La reacción se puede llevar a cabo en solución o, en algunas realizaciones, en fase sólida o utilizando reactivos soportados en polímeros, y posteriormente combinar las hebras de ARN sintetizadas en condiciones en las que se forma una molécula de ARNpi, que es capaz de mediar iARN.

Se debería apreciar que los ARNpi (ácidos nucleicos interferentes pequeños) pueden comprender uracilo (ARNpi) o timidina (ADNpi). Por consiguiente, los nucleótidos U y T, como se han denominado anteriormente, se pueden intercambiar. Sin embargo, se prefiere que se utilice ARNpi.

Las moléculas silenciadoras de genes, es decir, inhibidores, utilizadas de acuerdo con la invención son, en algunas realizaciones, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNpi o antisentido o ribozimas). Dichas moléculas pueden ser (pero no necesariamente) unas que pasan a estar incorporadas en el ADN de células del sujeto que se está tratando. Las células indiferenciadas se pueden transformar de forma estable con la molécula silenciadora de genes, lo que da lugar a la producción de células hijas modificadas genéticamente (en cuyo caso se puede requerir la regulación de la expresión en el sujeto, por ejemplo, con factores de transcripción o activadores génicos específicos).

La molécula silenciadora de genes puede sintetizarse *de novo* e introducirse en cantidades suficientes para inducir silenciamiento génico (por ejemplo, mediante interferencia de ARN) en la célula diana. Como alternativa, la molécula puede producirse con un microorganismo, por ejemplo, *E. coli*, y después introducirse en cantidades suficientes para inducir silenciamiento génico en la célula diana. Como alternativa, la molécula se puede producir utilizando, por ejemplo, vectores lentivirales que habitualmente se empaquetan utilizando un sistema de tres plásmidos en una línea celular humana tal como la HEK293: el primer vector codifica el genoma viral y se transcribe en ARN y se empaqueta en la partícula de virus, el segundo vector codifica la glicoproteína viral, y el tercer vector codifica las proteínas estructurales virales (GAG) y enzimas virales (POL: constituidas por transcriptasa, proteasa e integrasa inversa).

La molécula se puede producir con un vector que alberga un ácido nucleico que codifica la secuencia silenciadora de genes. El vector puede comprender elementos capaces de controlar y/o potenciar la expresión del ácido nucleico. El vector puede ser un vector recombinante. El vector puede comprender, por ejemplo, ADN plasmídico, cosmídico, de fago o vírico. Además, o en lugar de, utilizar el vector para sintetizar la molécula silenciadora de genes, el vector se puede utilizar como un sistema de suministro para transformar una célula diana con la secuencia silenciadora de genes.

El vector recombinante también puede incluir otros elementos funcionales. Por ejemplo, se pueden diseñar vectores recombinantes de modo que el vector se replique de forma autónoma en la célula diana. En este caso, se pueden requerir elementos que induzcan replicación de ácidos nucleicos en el vector recombinante. Como alternativa, el vector recombinante se puede diseñar de modo que el vector y la molécula de ácido nucleico recombinante se integren en el genoma de una célula diana. En este caso, son deseables secuencias de ácido nucleico que favorezcan la integración dirigida (por ejemplo, mediante recombinación homóloga). Los vectores recombinantes también pueden tener ADN que codifica genes que se pueden utilizar como marcadores seleccionables en el proceso de clonación.

El vector recombinante también puede comprender un promotor o regulador o potenciador para controlar la expresión del ácido nucleico según sea necesario. Se pueden utilizar elementos promotores/potenciadores con especificidad tisular para regular la expresión del ácido nucleico en tipos de célula específicos, por ejemplo, células endoteliales. El promotor puede ser constitutivo o inducible.

Como alternativa, la molécula silenciadora de genes se puede administrar a una célula o tejido diana en un sujeto con o sin que se incorpore en un vector. Por ejemplo, la molécula se puede incorporar dentro de un liposoma o una partícula vírica (por ejemplo, un retrovirus, virus del herpes, virus de la viruela, virus vaccina, adenovirus, lentivirus y similares).

Como alternativa, una molécula de ARNpi o antisentido «desnudo» se puede insertar en las células de un sujeto mediante un medio adecuado, por ejemplo, captación endocitótica directa.

5 La molécula silenciadora génica también se puede transferir a las células de un sujeto a tratar mediante transfección, infección, microinyección, fusión celular, fusión de protoplastos o bombardeo balístico. Por ejemplo, la transferencia puede ser mediante: transfección balística con partículas de oro recubiertas; liposomas que contienen una molécula de ANpi; vectores víricos que comprende una secuencia silenciadora de genes o un medio para proporcionar captación de ácidos nucleicos directa (por ejemplo, endocitosis) mediante aplicación de la molécula silenciadora de genes directamente.

10 En una realización de la presente invención, se pueden suministrar moléculas de ANpi a una célula diana (ya sea en un vector o «desnudo») y se basan en la célula hospedadora a replicar y alcanzar de este modo niveles terapéuticamente eficaces. Cuando este es el caso, en algunas realizaciones, el ANpi se incorpora en un casete de expresión que permitirá que se transcriba el ANpi en la célula y después interfiere con la traducción (induciendo la destrucción del ARNm endógeno que codifica el producto génico utilizado como diana).

15 Se pueden utilizar inhibidores de acuerdo con cualquier realización de la presente invención en una monoterapia (por ejemplo, uso de ARNpi solo). Sin embargo, se apreciará que los inhibidores se pueden utilizar como un complemento o combinados con otras terapias.

20 El modulador de PRKD1 puede estar contenido en composiciones que tienen una serie de formas diferentes dependiendo, en particular, de la manera en la que se vaya a utilizar la composición. Por tanto, por ejemplo, la composición se puede encontrar en forma de cápsula, líquido, pomada, crema, gel, hidrogel, aerosol, espray, micela, parche transdérmico, liposoma o cualquier otra forma adecuada que se pueda administrar a una persona o animal. Se apreciará que el vehículo de la composición de la invención debería ser uno que sea bien tolerado por el sujeto al que se proporciona, y en algunas realizaciones, permite el suministro del inhibidor al sitio diana.

25 Los agentes se pueden utilizar de varias formas. Por ejemplo, puede ser necesaria una administración sistémica, en cuyo caso el compuesto puede estar contenido dentro de una composición que se pueda, por ejemplo, administrar mediante inyección en el torrente sanguíneo. Las inyecciones pueden ser intravenosas (bolo o infusión), subcutáneas, intramusculares o una inyección directa en el tejido diana (por ejemplo, una inyección intraventricular cuando se utilizan en el cerebro). Los inhibidores también se pueden administrar mediante inhalación (por ejemplo, por vía intranasal) o incluso por vía oral (si procede).

30 Los agentes de la invención también se pueden incorporar dentro de un dispositivo de liberación lenta o retrasada. Dichos dispositivos se pueden, por ejemplo, insertar en el cuerpo del sujeto, y la molécula se puede liberar durante semanas o meses. Dichos dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiera un tratamiento a largo plazo con un agonista de HDAC6 y que requeriría normalmente una administración frecuente (por ejemplo, al menos una inyección diaria).

35 Se apreciará que la cantidad de un agente que se requiere se determina mediante su actividad biológica y su biodisponibilidad, la cual a su vez depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas de la molécula empleada y si se está utilizando como monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también se verá influida por los factores mencionados anteriormente y, en particular, la semivida del inhibidor dentro del sujeto que se esté tratando.

40 Las dosis óptimas a administrar pueden ser determinadas por los expertos en la técnica, y variarán con el inhibidor particular en uso, la concentración del preparado y el modo de administración.

45 Los factores adicionales en función del sujeto particular que se está tratando darán lugar a una necesidad de ajustar las dosis, que incluyen la edad, el peso, el género y la dieta del sujeto y el momento de la administración.

50 Cuando el agente es un ácido nucleico, se pueden utilizar técnicas de biología molecular convencionales (transferencia vectorial, transferencia de liposomas, bombardeo balístico, etc) para suministrar el inhibidor al tejido diana.

55 Se pueden utilizar procedimientos conocidos tales como los empleados convencionalmente en la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.) con el fin de establecer formulaciones específicas para su uso de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (tales como dosis diarias de la molécula de silenciamiento génico y la frecuencia de administración).

60 Por lo general, se puede utilizar una dosis diaria de entre 0,01 µg/kg de peso corporal y 0,5 g/kg de peso corporal de un agonista de HDAC6 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en el sujeto, dependiendo de qué inhibidor específico se utilice. Cuando el inhibidor es una molécula de ARNpi, la dosis diaria puede ser de entre 1 pg/kg de peso

corporal y 100 mg/kg de peso corporal, en algunas realizaciones, de entre aproximadamente 10 pg/kg y 10 mg/kg, o de entre aproximadamente 50 pg/kg y 1 mg/kg.

5 Cuando el inhibidor (por ejemplo, ANpi) se suministra a una célula, se pueden proporcionar dosis diarias en forma de una única administración (por ejemplo, una única inyección diaria).

Se conocen varios ensayos en la técnica para evaluar ARN_{bc} en cuanto a su capacidad para mediar la iARN (remítase, por ejemplo, a Elbashir *et al.*, *Methods* 26 (2002), 199-213). El efecto del ARN_{bc} de acuerdo con la presente invención en la expresión génica habitualmente dará como resultado que la expresión del gen diana se inhiba en al menos un 10%, 33%, 50%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula no tratada con las moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención.

15 De forma similar, se conocen muy bien varios ensayos en la técnica para evaluar los anticuerpos en cuanto a su capacidad para inhibir la actividad biológica de sus dianas específicas. El efecto del uso de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención habitualmente dará como resultado que la actividad biológica de su diana específica se inhiba en al menos un 10%, 33%, 50%, 90%, 95% o 99% en comparación con un control no tratado con el anticuerpo.

Los términos «frataxina», «FA», «X25», «CyaY», «FARR», «MGC57199» y «FXN» se refieren indistintamente a ácidos nucleicos y variantes polimórficas polipeptídicas, alelos, mutantes y homólogos entre especies que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, por ejemplo, una identidad de secuencia de aminoácidos de un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o superior, preferentemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, o más aminoácidos, o a lo largo de la longitud completa, respecto a una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de frataxina (Remítase, por ejemplo, a los N.^{os} de acceso a GenBank NM_000144.4 (isoforma 1); NM_181425.2 (isoforma 2); NM_001161706.1 (isoforma 3)) o respecto a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de frataxina (Remítase, por ejemplo, a los N.^{os} de acceso de GenBank NM_000135.2 (isoforma 1); NP_852090.1 (isoforma 2); NP_001155178.1 (isoforma 3)); (2) se unen a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de frataxina (por ejemplo, los polipéptidos de frataxina descritos en la presente); o una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de frataxina (por ejemplo, los polinucleótidos de frataxina descritos en la presente), y variantes de estos modificadas de manera conservativa; (3) se hibridan de forma específica en condiciones de hibridación rigurosas respecto a una hebra antisentido correspondiente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de frataxina, y variantes de esta modificadas de manera conservativa; (4) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente un 90%, preferentemente más de aproximadamente un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o una identidad de secuencia de nucleótidos superior, preferentemente a lo largo de una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 o más nucleótidos, o a lo largo de la longitud completa, respecto a un ácido nucleico de frataxina.

La expresión «ataxia de Friedreich» y el término «FRDA» indistintamente a una ataxia congénita recesiva autosómica provocada por una mutación en un gen FXN (anteriormente conocido como X25) que codifica frataxina, localizada en el cromosoma 9. La base genética para FRDA conlleva repeticiones de trinucleótido GAA en una región intrónica del gen que codifica frataxina. Este segmento normalmente se repite de 5 a 33 veces dentro del gen FXN. En las personas con ataxia de Friedreich, el segmento GAA se repite de 66 a más de 1000 veces. Las personas con segmentos de GAA repetidos menos de 300 veces tienden a tener una aparición posterior de los síntomas (después de la edad de 25) que aquellos con repeticiones del trinucleótido GAA mayores. La presencia de estas repeticiones da lugar a la transcripción y expresión reducida del gen. La frataxina está implicada en la regulación del contenido de hierro mitocondrial. La mutación en el gen FXN provoca un daño progresivo al sistema nervioso, lo cual da lugar a síntomas que van desde alteraciones en la marcha a problemas del habla; puede dar lugar también a enfermedades cardíacas y diabetes. La ataxia de la ataxia de Friedreich se debe a la degeneración del tejido neural en la médula espinal, en particular neuronas sensoriales esenciales (a través de conexiones con el cerebelo) para dirigir el movimiento muscular de brazos y piernas. La médula espinal se vuelve más fina y las células neurales pierden parte de su vaina de mielina (el recubrimiento aislante en algunas células neurales que contribuye a conducir los impulsos nerviosos). Un sujeto con FRDA puede presentar uno o más de los siguientes síntomas: debilidad muscular en los brazos y piernas, pérdida de coordinación, deterioro visual, deterioro auditivo, problemas de dicción, curvatura de la médula (escoliosis), arcos plantares altos (deformidad del pie pes cavus), intolerancia a carbohidratos, diabetes mellitus, trastornos cardíacos (por ejemplo, fibrilación atrial, taquicardia (frecuencia cardíaca acelerada) y cardiomiopatía hipertrófica). Un sujeto con FRDA puede presentar además movimientos oculares involuntarios y/o rápidos, pérdida de reflejos tendinosos profundos, pérdida de respuestas plantares extensoras, pérdida de sensación de vibración y propioceptiva, cardiomegalia, hipertrofia simétrica, soplos cardíacos y defectos de conducción cardíaca. El análisis patológico puede revelar esclerosis y degeneración de los ganglios de la raíz dorsal, vías espinocerebrales, vías corticoespinales laterales y columnas posteriores.

60 El término «administrar» se refiere a administración local o sistémica, por ejemplo, que incluye administración enteral o parenteral. Las vías de administración para los agentes activos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo, administración oral («po»), administración en forma de supositorio, contacto tópico, administración

intravenosa («iv»), intraperitoneal («ip»), intramuscular («im»), intralesional, intranasal o subcutánea («sc»), o el implante de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba miniosmótica, una formulación de liberación lenta y así sucesivamente, a un sujeto. La administración puede ser por cualquier vía que incluye parenteral y transmucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, ionoforética e intracraneal. Otros modos de suministro incluyen, sin carácter limitante, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos y así sucesivamente. Las expresiones «administración sistémica» y «administrado sistémicamente» se refieren a un método para administrar un compuesto o composición a un mamífero de modo que el compuesto o la composición se suministre a sitios en el cuerpo, que incluyen el sitio diana de la acción farmacéutica, a través del sistema circulatorio. La administración sistémica incluye, sin carácter limitante, administración oral, intranasal, rectal y parenteral (es decir, distinta de las vías alimentarias tal como intramuscular, intravenosa, intraarterial, transdérmica y subcutánea).

El término «coadministrar» y el término «coadministración» y variantes de estos se refieren a la administración de dos agentes activos próximos en el tiempo entre sí (por ejemplo, dentro del mismo día o semana o periodo de 30 días, o lo suficientemente próximos para que ambos fármacos se puedan detectar simultáneamente en la sangre o lo suficientemente próximos de otro modo para que resulte un efecto sinérgico de la administración combinada). Un efecto se considera sinérgico si se obtiene una respuesta más favorable y/o menos efectos secundarios de la coadministración de dos (o más) agentes que a partir de la administración de la misma dosis de cada agente individual como la dosis del agente combinado (la dosis se puede medir en moles, moles/kg, mg o mg/kg). Por ejemplo, la coadministración de los agentes activos A y B se considera sinérgica si la coadministración de 0,5 x moles A y 0,5 x moles B proporciona una eficacia mejor y/o efectos secundarios reducidos que la administración separada de 1,0 X moles A y la administración separada de 1,0 moles de B. Cuando se coadministran, pueden coformularse dos o más agentes activos como parte de la misma composición o administrarse como formulaciones separadas.

La PRKD1, también conocida como proteína cinasa D1, NPKC-Mu, PKD, EC 2.7.11.13, PRKCM, PKC-Mu, PKCM, PKC-MU, proteína cinasa C, Mu, Serina/Treonina-Proteína cinasa D1, Proteína cinasa C tipo Mu, PKD1, proteína cinasa D, EC 2.7.11 o NPKC-D1, es una serina/treonina cinasa que regula una serie de funciones celulares, que incluyen señalización de receptores de membrana, transporte en el Golgi, protección frente al estrés oxidativo en la mitocondria, transcripción génica y regulación de la forma, motilidad y adhesión celular. La familia de proteínas cinasas D (PKD) de proteínas serina/treonina cinasas contiene tres miembros; PKD1, PKD2 y PKD3. Estas enzimas ocupan una posición única en la vía de transducción de señales iniciada por diacilglicerol (DAG) y proteína cinasa C (PKC). Los PKD son dianas directas de DAG, y también se encuentran después de la PKC en una vía de transducción de señales novedosa que se encuentra implicada en varios procesos biológicos. Estructuralmente, las PKD contienen un dominio rico en cisteínas N' terminales (CRD), que se une a ésteres de forbol con una afinidad elevada y tiene una función en la mediación de la translocación de PKD a la membrana plasmática después de la activación. Los dominios PH tienen un sitio de fosforilación autorregulador (PKD1 y PKD2 solamente) y los dominios catalíticos tienen un grado elevado de homología respecto a la cadena ligera de miosina y las cinasas dependientes de calmodulina. En el estado inactivado, la PKD1 y la PKD2 se localizan principalmente en el citoplasma, mientras que la PKD3 se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo. La actividad cinasa de estas enzimas es reprimida por sus dominios CDR y PH. Las PKD son activadas por una serie de estímulos que incluyen péptidos reguladores, ácido lisofosfatídico, trombina, PDGF, IGF-1, estrés oxidativo, colestistoquinina, Gbetagamma, ATP y más. Estos estímulos producen una rápida generación de DAG, que induce translocación de PKD mediada por CDR desde el citosol hasta la membrana plasmática. Los PKC novedosos también se atraen hacia la membrana plasmática en respuesta a la generación de DAG. Los PKC novedosos son activados alostéricamente por DAG y transfosforilan los PKD. Esto estabiliza el PKD en su conformación activa. El PKD activado se disocia de la membrana plasmática, se trasloca al citosol y posteriormente al núcleo. Los PKD se han implicado en procesos fisiológicos fundamentales que incluyen transducción de señales, tráfico a través de la membrana y supervivencia celular, migración, diferenciación y proliferación. El PKD aumenta la expresión de las vías de señalización de ERK y Ras, y suprime la vía de señalización de JNK. Estas enzimas regulan el brote de vesículas secretoras a partir de la red trans-Golgi y promueven la atracción de integrina hacia las adhesiones focales. Además, los PKD tienen una función en la regulación de la apoptosis y tienen funciones en las vías de supervivencia celular inducidas por el estrés oxidativo. También tienen una función en la regulación inmunitaria. A pesar de la multitud de procesos fisiológicos en los que están implicados los PKD, solamente se conocen unas pocas dianas directas. Estas incluyen kidins220, una proteína de membrana integral de las células neuroendocrinas, c-Jun y RIN1, una proteína que se asocia con Ras y 14.3.3 y activa la vía de Ras-MEK-ERK.

En la técnica se conocen inhibidores de PRKD1. Algunos ejemplos de estos son, por ejemplo, CID 755673 (George *et al. Pharmaceutics*, 2011 3 de junio (2)), [2,6] Naftiridina (documento WO-A-2008/122615), los biperidilos descritos en el documento WO2009/150230, los azoles descritos en el documento WO2011/009484, un anticuerpo o fragmento de este, que se une específicamente a la proteína cinasa D1 e inhiben su actividad, ARNpi que disminuye la expresión de *PRKD1*, kb-NB142-70 (George *et al. Pharmaceutics*, 3 de junio de 2011 (2)), kb-NB165-09 (George *et al. Pharmaceutics*, 3 de junio de 2011(2)), y kmg-NB4-23 (George *et al. Pharmaceutics*, 3 de junio de 2011(2)). A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado con el que los entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales

similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o evaluación de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, primará la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente

5

Ejemplos

Cultivo celular. Los fibroblastos dérmicos de pacientes sanos no afectados (WT, GM08399) y de pacientes afectados por la ataxia de Friedrich (FRDA, GM04078) se obtuvieron a partir de repositorios de células de Coriell (Camden, N.J.). Los H9 hESC se obtuvieron de WiCell (Madison, Wis.). Se inmortalizaron células GM04078 mediante suministro lentiviral de BMI1 y hTERT tal como se ha descrito previamente (Duss, S. *et al. Breast Cancer Res* 9, R38 (2007)), lo que da lugar a la línea celular FRDA-4078iBT. Se mantuvieron GM04078 y fibroblastos dérmicos humanos FRDA-4078iBT (HDF) en medio MEM- α (Life Technologies, Grand Island, N.Y.) que contenía un 20% de FBS inactivado por calor (Geminbio, Sacramento Oeste, Calif.) y 1X L-glutamina (Life Technologies) o en Medio esencial mínimo de Eagle (Sigma, St. Luis, Mo.) suplementado con un 10-15% de FCS (Sigma) y L-glutamina 2 mM a 37°C en un 5% de CO₂. Las células HEK293T se cultivaron en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de FCS (Sigma), 100 U mL⁻¹ de penicilina, 100 μ g mL⁻¹ de estreptomina y L-glutamina 2 mM a 37°C en un 5% de CO₂. Las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) y células madre embrionarias humanas (hESC) se mantuvieron en mTeSR (Stem Cell Technologies, B.C., Canadá) en condiciones de cultivo con Matrigel con factor de crecimiento reducido (BD, San José, Calif.) y se pasaron cada 4-6 días utilizando dispasa (Stem Cell Technologies). Los análisis de cariotipo y de huella genética fueron llevados a cabo por Cell Line Genetics (Madison, Wis.).

Edición genómica. Se cotransfectaron plásmidos que codificaban FXN-ZFN-L, FXN-ZFN-R, y constructos de donantes en células FRDA-4078iBT o HEK293T mediante nucleofección Amaxa (Lonza). En resumen, se tripsinizaron células que crecían exponencialmente y se recolectaron 10⁶ células para la transfección. Las células se resuspendieron en 100 μ L de solución nucleofectora R, se mezclaron con tres plásmidos no linealizados (dos plásmidos ZFN + Donante1 o Donante2) en una relación molar 1:10 (ZFN:Donante). La electroporación se llevó a cabo en 5-10 μ L de agua sin nucleasa utilizando el programa X-01 (nucleofector I de Amaxa, Lonza). Después de la transfección, las células se transfirieron al respectivo medio precalentado en placas de cultivo tisular de 100 mm y se cultivaron en condiciones estándar durante 3 días antes de la selección con puromicina o G418. Se seleccionaron clones resistentes a puromicina o a G418 individuales y se expandieron para un análisis adicional.

Tinción inmunofluorescente. Se sembraron los hiPSC en una placa de imagen con fondo negro-transparente recubierta con matrigel (BD). Dos días después de colocarlas en placas, las células se lavaron una vez con PBS y se fijaron en un 4% de formaldehído (USB Corp, Cleveland, Ohio) durante 20 min. Las células se permeabilizaron y se incubaron durante 30 min en tampón de bloqueo que contenía un 3% de suero de burro (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) y un 0,1% de Triton (Sigma) en PBS. Las células se tiñeron con anticuerpos primarios Oct4/Nanog (Abcam, Cambridge, Mass./Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Calif.) y anticuerpos SSEA-4 y Tra-1-81/1-60 conjugados con un tinte (BD) durante la noche a 4°C en tampón de bloqueo. Las células se lavaron en un 1% de Tween (Sigma) en PBS y se tiñeron con anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente. Las imágenes se capturaron utilizando un microscopio confocal Zeiss (Thornwood, N. Y.).

Ensayos con luciferasa. Los ensayos con luciferasa se llevaron a cabo con el sistema de ensayo indicador de luciferasa dual Promega según el protocolo del fabricante. En resumen, se añadió el tampón de lisis directamente a las monocapas de células confluyentes. Se cultivaron placas de cultivo a 25 °C durante 15 min y se sacudieron varias veces para garantizar una lisis completa. Los lisados celulares se centrifugaron a velocidad máxima en una microcentrífuga Eppendorf durante 10 min a 4 °C. Las mediciones de la luciferasa se llevaron a cabo con sobrenadantes de lisados por duplicado. Todas las medidas se llevaron a cabo en un luminómetro Centro LB 960 (Berthold Technologies, Alemania). Se llevaron a cabo ensayos de Bradford para determinar la concentración de proteínas total, que se utilizó para la normalización.

Pirosecuenciación. Las células se recogieron y se externalizaron a EpigenDX (Worcester, Mass.). Se llevó a cabo un análisis de pirosecuenciación según procedimientos estándar con cebadores que se desarrollaron para los sitios CpG en las posiciones (-50; +96) del codón inicial del gen OCT4 (ID del ensayo: ADS510).

RT-PCR en tiempo real. Para los experimentos de RT-PCR (pRT-PCR) cuantitativa, se extrajo el ARN total de las líneas celulares GM04078, FRDA-4078iBT y HEK293T-FF2AP con el kit Absolutely RNA Microprep (Stratagene). Se transcribió de forma inversa una alícuota de 1 μ g de ARN total con enzima AffinityScript (Stratagene) utilizando hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una qRT-PCR en un sistema de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad) utilizando la mezcla Green Supermix SsoAdvanced SYBR (Bio-Rad, #172-5264). Los niveles de ARN relativos se calcularon a partir de los valores de C_T de acuerdo con el método Δ C_T y se normalizaron respecto a los niveles de ARNm de GAPDH o ARNr 18S. Las células reprogramadas se lavaron una vez y se aisló el ARN total utilizando TRIzol (Life Technologies). Después de la extracción con cloroformo, el ARN se purificó utilizando un kit RNeasy Plus (Qiagen,

Germantown, MD). La pureza y concentración del ARN se verificaron utilizando un Bioanalizador Aligent 2100 (Santa Clara, CA). En un procedimiento de dos pasos, se utilizó en primer lugar un aporte de 1,5 µg de ARN total para sintetizar ADNc con cebadores aleatorios con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo un análisis Q-PCR en un sistema de PCR en tiempo real ViiA-7 (Life Technologies) utilizando la mezcla maestra para PCR Fast Advanced SYBR Green (Life Technologies). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C - 5 min; (60°C - 30 s; x 40 ciclos); 74°C - 10 min.

Cribado de iARN. Se cribó una colección de ARNpi sintética que tenía como diana el genoma farmacoconvertible (4835 genes con 9670 constructos o dos constructos por gen) en un formato de placa de 384 pocillos por duplicado con dos ARNpi dirigidos a genes por pocillo para identificar genes que aumentan la expresión de una fusión de frataxina-luciferasa. La colección se transfectó de forma inversa en la línea de células indicadoras HEK293T-FF2AP mediante una transfección de alto rendimiento (Aza-Blanc, P *et al. Molecular cell* 12, 627-637 (2003); Chanda, S.K. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12153-12158 (2003)) utilizando un sistema robótico genómico totalmente integrado (GNF Systems). Cada placa contenía controles de transfección dirigidos a la viabilidad celular (Muerte celular AllStars, Qiagen), no dirigidos (Control Negativo AllStars, Qiagen) y un ARNpi dirigido a frataxina (Frataxina-12, Qiagen). Los datos de cada placa se normalizaron al promedio de las placas y se procesaron para determinar el factor de actividad. Se determinó la media geométrica de las lecturas por duplicado para cada pocillo con el fin de generar una única puntuación de actividad. Se aplicó una transformación no lineal para eliminar la variación entre placas (Konig, R. *et al. Nature methods* 4, 847-849 (2007)). Los pocillos con supuestos resultados positivos se volvieron a cribar como ARNpi individuales por pocillo para su validación. Además de los ARNpi con resultado positivo en la primera ronda, todos los constructos de ARNpi dirigidos a genes de interés de otras colecciones disponibles (Qiagen, Integrated DNA Technologies) se incluyeron en el cribado de validación. Se introdujeron 96 controles no dirigidos adicionales en cada placa de 384 pocillos del ensayo de validación (Qiagen). El análisis de datos incluyó la evaluación de las actividades de iARN de pocillos individuales y múltiples para cada gen (análisis de actividad de ARNpi redundante) (Konig, R. *et al. Nature methods* 4, 847-849 (2007)).

Reprogramación y aislamiento del virus sendai. Se adquirieron partículas de virus sendai (SeV) que codificaban OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC (OSKM) de Life Technologies y se llevó a cabo una reprogramación de SeV de la siguiente manera: se sembraron HDF de pacientes y no afectados en placas de 24 pocillos recubiertos con Matrigel con una densidad de 25-50 x 10³ por pocillo. Las células se transdujeron con partículas SeV que codificaban los 4 factores (MOI; O=10, SKM=7,5) durante la noche en medio de fibroblastos que contenía una concentración de 10 µg/mL de polibreno (Sigma). El medio se cambió a mTeSR 3 días después de la infección. En los días 5 o 6, las células se disociaron utilizando acutasa (Life Technologies) y se colocaron en placas de 35 mm recubiertas con Matrigel sembradas con células de alimentación de fibroblastos neonatales humanos tratados con mitomicina C (GlobalStem, Rockville, Md.). Las colonias de hiPSC emergentes se observaron 20-30 días después de la infección, se seleccionaron y se transfirieron a unas condiciones de cultivo con matrigel y mTeSR.

Suministro de ARNhc. Se suministraron constructos de ARNhc a células FRDA-4078iBT por transducción lentiviral. Se produjo un lentivirus mediante transfección con fosfato de calcio de células HEK293T (Dull, T. *et al. Journal of virology* 72, 8463-8471 (1998)). Para transducir células FRDA-4078iBT con constructos de ARNhc múltiples, se llevaron a cabo infecciones con diferentes virus simultáneamente. Todas las infecciones se llevaron a cabo con una multiplicidad de infección de aproximadamente 30 partículas virales por célula. Se utilizó la lipofección para suministrar constructos de ARNhc en células HEK293T-FF2AP; se sembraron ~200 células por mm² 1 día antes de la transfección. Las células se transfectaron con plásmidos utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante.

Diferenciación tricapa y formación de teratomas. *Endoderma:* Se utilizó acutasa para la disociación celular a células individuales, que a continuación se colocaron en placas sobre matrigel en mTeSR con inhibidor de rock Y27632 (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) con una densidad de 100 x 10³ por cm². Tres días después de la colocación en placas, el medio se cambió a RPMI que contenía un 0,5% de FBS (Thermo, Waltham, Mass.) y 100 ng/mL de Activina A (R&D, Mineápolis, Minn.). Las células se lavaron una vez, se reabastecieron con medio fresco diariamente, se fijaron el día 5-6 y se tiñeron con Sox17 (Abcam) para el análisis. *Mesoderma:* los cultivos hiPSC/hESC se cultivaron hasta la confluencia. Utilizando dispasa (Stem Cell Technologies), las células se recogieron y se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos no adherentes para la formación de cuerpos embrioides (EB) en medios que contenían BMP4, G-CSF (R&D) y hSCF, hFlt3, e IL-3/6 (Peprotech, Rocky Hill, N.J.). El medio se cambió cada 3 días. Las células se recogieron o se volvieron a colocar en placas de 96 pocillos recubiertas con MG para su fijación el día 18 y posteriormente se tiñeron con α-Actinina (Abcam) para su análisis. *Ectoderma y derivados neurales:* Se expusieron en primer lugar cultivos de hESC/hiPSC indiferenciados a una inhibición dual de la señalización de SMAD, la cual se ha mostrado que convierte la hESC en precursores neurales (Chambers, S.M. *et al. Nat Biotechnol* 27, 275-280 (2009)). Para la diferenciación neuronal, se expandieron los precursores neurales en DMEM/F-12 con suplementos de B27 y N2 (Gibco), 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico (hbFGF) (Gibco). Los precursores neurales se diferenciaron finalmente en neuronas en un medio neurobasal (Gibco) suplementado con B27, 10 ng/mL de neurotrofina 3 humana (hNT-3) (R&D), y 10 ng/mL de factor neurotrófico humano procedente del cerebro humano (hBDNF) (R&D) durante al menos 4 semanas. Se utilizaron anticuerpos contra Pax6 (DSHB) y β-III tubulina (Tuj1,

Covance) para identificar los precursores neurales y las neuronas, respectivamente. Para cuantificar la eficiencia de la diferenciación en precursores neurales que expresan Pax6, se generaron inmunoteñidos y se determinó el porcentaje de células positivas para Pax6 y DAPI en 10 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente. Para cuantificar la eficiencia de la diferenciación en neuronas que expresan β -III tubulina, se utilizó una estrategia similar con cultivos tratados previamente con citosina-1- β -D-arabinofuranósido para evitar la expansión de precursores neurales. La formación del teratoma se externalizó a Applied Stem Cells (Menlo Park, Calif.).

Inmunotransferencia de Western. Las muestras de proteínas se separaron en geles con gradiente de un 4-12% de NuPAGE-Novex Bis-Tris (Invitrogen) en tampón MES a 200 V durante 40 min. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa optitrán BA-S 85 (Whatman) se llevó a cabo a 60 mA (constante) durante la noche en tampón de transferencia con un 20% de metanol. Las membranas se bloquearon en un 5% de leche seca sin grasa en TBST durante al menos 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron una vez en TBST durante 5-10 min. Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-FXN (SKU#456300, Invitrogen) en un 5% de leche seca sin grasa en TBST durante la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron en TBST y se incubaron con anticuerpo secundario (HRP antirrátón, 1:5000) en un 5% de leche seca sin grasa en TBST durante 45-60 min a temperatura ambiente. Se desarrollaron las membranas de transferencia con sustrato HRP de Western Inmobilon (Millipore).

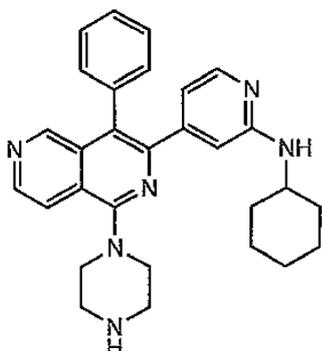
Para abordar las necesidades de la técnica, los inventores trataron en primer lugar de generar una línea de células indicadoras de origen humano que fuera compatible con la biología de alto rendimiento y permitiera la monitorización precisa de la expresión génica de FXN endógeno. Para este fin, seleccionaron una estrategia de edición genómica mediada por nucleasas de dedos de zinc (ZFN) para etiquetar el extremo 3' del gen FXN endógeno con un gen indicador de luciferasa de luciérnaga (FL) (Lombardo, A. *et al. Nature biotechnology* 25, 1298-1306 (2007); Urnov, F.D. *et al. Nature* 435, 646-651 (2005)). Para inducir una rotura bicatenaria aproximadamente 1 kb en dirección 3' del sitio de corte y empalme 5' en el último intrón del gen FXN, los inventores diseñaron un par de ZFN que se unen únicamente al locus de FXN. Para la recombinación homóloga, crearon un fragmento de ADN de donante transgénico que codificaba el último exón de FXN fusionado al marco de lectura abierto de FL. Para permitir la selección clonal después de la inserción dirigida, también crearon constructos de donantes que codificaban puromicina N-acetil-transferasa (Puro) precedida por un péptido de autoescisión 2A conectado a la fusión FXN-FL (Donante-1) o un casete de selección de neomicina (Neo) autónomo (Donante-2). El brazo de homología izquierdo de los constructos de donantes se diseñó para introducir un punto de ramificación funcional en los sitios de corte y empalme 3' para favorecer el corte y empalme eficiente entre el exón 4 y el exón insertado 5. Los inventores utilizaron este sistema de ZFN para introducir un indicador de luciferasa en el locus de FXN de células 293T de riñón embrionario humano (HEK). Esta línea celular se seleccionó porque se puede expandir a una escala muy grande a un coste relativamente bajo. Como consecuencia, se cree que su sistema indicador de FXN es compatible con las restricciones técnicas y financieras de la mayor parte de plataformas de cribado académicas e industriales. Los inventores cotransfectaron células HEK 293T humanas con plásmidos de expresión que codificaban las dos frataxina-ZFN (ZFN-L y ZFN-R) y un plásmido que codificaba el Donante-1, que confiere resistencia a puromicina solamente después de la correcta integración, el corte y empalme de pre-mARN y la traducción de la proteína de fusión FXN-FL-2A-PURO (FF2AP) adecuados. A las 2-3 semanas después de la transfección, se aislaron las colonias resistentes a puromicina y se sometieron a análisis por transferencia de Western. Esto reveló la expresión específica de una proteína de fusión FXN-FL de 75 kDa en células resistentes a puromicina (denominada en adelante en la presente HEK293T-FF2AP). Los inventores observaron el mismo peso molecular cuando la proteína de fusión FXN-FL se expresó ectópicamente respecto a un plásmido, lo que demuestra la autoescisión cotraduccional eficiente del péptido 2A y la liberación de la proteína Puro. Es importante destacar que detectaron actividad de luciferasa de luciérnaga en lisados de HEK293T-FF2AP, pero no de células HEK293T precursoras, una actividad que podría ser anulada tras la expresión de un ARN horquillado corto (ARNhc) dirigido al exón 2 del ARNm de FXN. Por tanto, concluyeron que la actividad de luciferasa de luciérnaga en las células HEK293T-FF2AP procedía solamente de la integración dirigida en el locus de FXN y, por tanto, indica de forma fiable la expresión del gen FXN a partir de su ubicación endógena.

Al contrario que el trabajo anterior (Martelli, A., Napierala, M. & Puccio, H. *Dis Model Mech* 5, 165-176 (2012)), la línea celular HEK293T-FF2AP permitió a los inventores de la presente el cribado para detectar moduladores de la expresión de FXN en su contexto genómico natural y en un formato HTS. Esta línea celular es fácil de transfectar y, por tanto, muy adecuada para cribados de interferencia por ARN (iARN) o de sobreexpresión de ADNc. Por lo tanto, para identificar represores potenciales de la expresión de FXN, llevaron a cabo un cribado de iARN dirigido a 4835 genes humanos en la línea celular HEK293T-FF2AP, utilizando amplificación de la señal de luciferasa como lectura. Se evaluaron dos ARNpi únicos en un formato agrupado a las 72 horas después de la transfección. Debido al formato de constructos agrupados, escogieron un valor inicial de activación de luciferasa de 1,6 veces sobre la media como umbral para capturar fenotipos generados de los pocillos en los que puede que solamente un ARNpi esté activo. En los cribados de validación posteriores, se detectaron los ARNpi con resultado positivo en un formato de pocillos organizados de 1 ARNpi por pocillo y se cribaron por duplicado en condiciones idénticas. Utilizando la línea celular HEK293T-FF2AP, los inventores llevaron a cabo un cribado de reconfirmación de los resultados positivos del cribado principal. En paralelo, cribaron los ARNpi con resultado positivo para detectar activadores de actividad luciferasa no específicos para FXN con una línea celular HEK 293T que expresaba luciferasa de forma estable a partir de un promotor de CMV (HEK293-pGF1-CMV) (ref). Esto permitió un análisis minucioso de los constructos independientes mediante un análisis de ARNpi redundante (RSA) (Konig, R. *et al.*

Nature methods 4, 847-849 (2007)), que aumentó los genes donde dos o más ARNpi independientes elevaban los niveles de proteína luciferasa-FXN específicamente. Los alelos de FXN en la línea celular HEK293T-FF2AP utilizada en el cribado de iARN principal no contienen expansiones de repeticiones del triplete GAA patogénicas. Los inventores de la presente diseñaron la línea celular de cribado de esta manera debido a que la biología de alto rendimiento requiere grandes cantidades de células y una deficiencia de FXN podría evitar la expansión celular. Para determinar si los resultados positivos primarios podían aumentar la expresión génica de FXN en células que contenían una repetición expandida, llevaron a cabo experimentos de validación de los resultados positivos secundarios en fibroblastos de pacientes de FRDA inmortalizados (FRDA-4078iBT). El análisis de la expresión reveló que también se expresaban cinco genes candidatos en fibroblastos de FRDA (PRKD1, CDK12, CDK13, SBF1 y NR1H3). Para atenuar estos genes, se diseñaron tres constructos de ARNhc diferentes por gen candidato y se suministraron a los fibroblastos mediante transducción lentiviral. Excepto para SBF1, los niveles de ARNm de todos los genes candidatos se redujeron tras la expresión de ARNhc. El agotamiento de las cinasas relacionadas con el ciclo celular CDK12 y CDK13 dio lugar a importantes defectos de proliferación y se omitieron del análisis adicional. Aunque las eficiencias de atenuación para PRKD1 o NR1H3 nunca fueron superiores a un 60%, los inventores observaron de manera uniforme un aumento significativo en los niveles de ARNm de FXN. Estos resultados confirmaron que la reducción de los niveles de proteína serina/treonina cinasa PRKD1 o del receptor nuclear NR1H3 da lugar a una expresión de FXN mayor incluso en presencia de un tramo de repeticiones expandidas. Cabe destacar que los intentos anteriores para identificar represores de FXN con constructos indicadores artificiales no identificaron PRKD1 ni NR1H3. Este resultado confirma que monitorizar la expresión génica del locus de FXN endógeno abre nuevas oportunidades para el descubrimiento de dianas y la disección de vías moleculares implicadas en la FRDA.

Los inventores completaron nuestra plataforma de descubrimiento de fármacos diseñando modelos relevantes para la enfermedad, que no solamente validan los resultados positivos primarios como dianas farmacoconvertibles, sino que también permiten el descubrimiento de moduladores químicos de estas dianas. En primer lugar, reprogramaron fibroblastos dérmicos a partir de individuos no afectados sanos (WT de origen natural, GM08399) y de pacientes afectados por FRDA (FRDA, GM04078) en células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Se utilizaron partículas de virus sendai que codificaban OCT4, SOX2, KLF4 y cMYC (OSKM) para minimizar el riesgo de que la integración aleatoria de transgenes de reprogramación afectase a las vías de FXN. Los iPSC obtenidos tanto de pacientes de FRDA como de WT y todas las líneas de iPSC expresaban marcadores celulares de pluripotencia similares. Las líneas de iPSC también se pudieron diferenciar en los ejemplares de las tres capas germinales, que incluyen neuronas y cardiomiocitos, dos tipos de células que se ven afectadas en los pacientes de FRDA. Tanto los iPSC de FRDA como de WT formaron también teratomas cuando se inyectaron en ratones. Es importante destacar que las líneas de iPSC obtenidas de pacientes de FRDA y WT presentaban una capacidad similar para diferenciarse en precursores neurales que expresaban Pax6 y neuronas que expresaban β -III tubulina. Finalmente, las células neuronales de FRDA expresaban niveles inferiores de ARNm y proteína FXN que las WT, lo que indica que el fenotipo molecular de FRDA se conserva durante la reprogramación.

Con el fin de identificar moduladores de bajo peso molecular de PRKD1, se inspeccionó un archivo de compuestos. Tal como se divulgó en el documento WO-A-2008/122615, se había identificado la 2,6-naftiridina como un inhibidor de PKC/PRKD dual que se desarrolló adicionalmente para obtener un potente paninhibidor de PRKD prototipo. El diseño y la modificación racional dio lugar a la [2,6] Naftiridina es la ciclohexil-[4-(4-fenil-1-piperazin-1-il-[2,6]naftiridin-3-il)piridin-2-il]amina de fórmula (II):



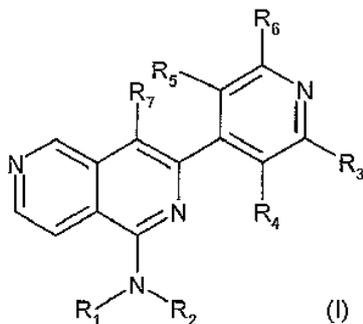
(II)

Se trataron neuronas derivadas de FRDA-iPSC con el compuesto de fórmula (II) o un compuesto de control sin 2,6-naftiridina pero carece de actividad sobre PRKD1. Tal como se observa con la supresión mediada por ARNhc en los fibroblastos, la inhibición química de PRKD1 por parte del compuesto de fórmula (II) dio lugar a un aumento significativo en la expresión génica de FXN endógeno en neuronas derivadas de FRDA-iPSC. Es importante destacar que el compuesto de control no tenía un efecto significativo en la expresión de FXN en las neuronas de pacientes de FRDA, lo que indica que la actividad del compuesto de fórmula (II) se debe a un efecto inhibitorio sobre PRKD1. Es importante

5 destacar que el tratamiento con el compuesto de fórmula (II) dio lugar a un aumento de un 25% en la expresión de ARNm de FXN en las neuronas FRDA después de solamente 3 semanas de tratamiento. Debido a que muchos pacientes de FRDA presentan niveles de FXN que son solamente un 20-30% inferiores que los portadores asintomáticos, se espera que un aumento del 25% en la expresión de FXN sea suficientemente terapéutico para al menos una subpoblación de pacientes de FRDA (Miranda, C. J. *et al. FEBS Lett* 512, 291-297 (2002); Martelli, A., Napierala, M. & Puccio, H. *Dis Model Mech* 5, 165-176 (2012)). Además, la viabilidad de las neuronas no se vio afectada por la exposición al compuesto de fórmula (II), incluso con una concentración 10 μ M.

REIVINDICACIONES

5 1. Un agente que es un modulador de la actividad del producto génico *PRKD1*, la proteína cinasa D1, para su uso en el tratamiento de la ataxia de Friedreich, donde dicho agente es un inhibidor de proteína cinasa D1 y es una [2,6] Naftiridina de fórmula (I):



10 donde

R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con de uno a dos R₈, donde R₈ es hidrógeno, halógeno, alquilo, R₉-O--, (R₁₀)(R₁₁)N--, (R₁₂)(R₁₃)N-C(O)--, arilo, o heterociclilo o heteroarilo, dicho heterociclilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos alquilo;

15

R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 4-7 miembros;

R₃ es (R₁₄)(R₁₅)N--, o halógeno;

20

R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo, cicloalquilo (C₃-C₇), aril-alquilo, arilo o alcoxi;

R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son independientemente hidrógeno, alquil-O-C(O)--, alquil-NH-C(O)--, alquil-C(O)-NH-C(O)--, cicloalquilo, cicloalquil-alquil--, R₁₆-SO₂--, R₁₇-C(O)--, heterociclilo o alquilo, dicho heterociclilo está además opcionalmente sustituido por uno o dos grupos cicloalquil-alquilo--, y dicho alquilo está además opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre hidroxilo, alcoxi, alquilamina, dialquilamina o heteroarilo;

25

R₁₀ y R₁₁ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

R₁₂ y R₁₃ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

30

R₁₄ y R₁₅ son independientemente hidrógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, aril-alquil--, heterociclilo o heteroarilo, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo están además opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos seleccionados entre alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, haloalquilo, ciano o R₁₈-NH-C(O)--;

35

R₁₆ es arilo o heteroarilo;

R₁₇ es heterociclilo o alquilo opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre H₂N--, aril-alquil--, o alquil-C(O)-NH--;

40

R₁₈ es heterociclil-alquil--; o

una sal farmacéuticamente aceptable de este; o un isómero óptico de este; o una mezcla de isómeros ópticos.

2. El agente para el uso de la reivindicación 1, donde dicha [2,6] Naftiridina es acorde a la Fórmula I, donde

45

R₁ y R₂ son independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₇), cicloalquilo (C₃-C₇), heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con de uno a dos R₈, donde R₈ es hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₇), R₉-O--, (R₁₀)(R₁₁)N--, (R₁₂)(R₁₃)N-C(O)--, arilo (C₆-C₁₀) o heterociclilo o heteroarilo, dicho heterociclilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos con de uno a dos grupos alquilo (C₁-C₇);

50

R₁ y R₂ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 4-7 miembros;

R₃ es (R₁₄)(R₁₅)N;

R₄, R₅, R₆ son H; y

5 R₇ es independientemente hidrógeno, halógeno, alquilo (C₁-C₇), cicloalquilo (C₃-C₇), aril (C₆-C₁₀)-alquilo (C₁-C₇), arilo (C₆-C₁₀) o alcoxi (C₁-C₇);

10 R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ son independientemente hidrógeno, alquil (C₁-C₇)-O-C(O)--, alquil (C₁-C₇)-NH-C(O)--, alquil (C₁-C₇)-C(O)-NH-C(O)--, cicloalquilo (C₃-C₇), cicloalquil (C₃-C₇)-alquil (C₁-C₇--, R₁₆-SO₂--, R₁₇-C(O)--, heterociclilo o alquilo (C₁-C₇), dicho heterociclilo está opcionalmente sustituido además con uno o dos grupos cicloalquil (C₃-C₇)-alquil (C₁-C₇)-, y dicho alquilo está opcionalmente sustituido además con uno o dos grupos seleccionados entre hidroxil, alcoxi (C₁-C₇), alquilamina (C₁-C₇), di-(C₁-C₇)alquilamina o heteroarilo;

15 R₁₀ y R₁₁ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

15 R₁₂ y R₁₃ tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos forman opcionalmente un anillo de 5-7 miembros;

20 R₁₄ y R₁₅ son independientemente hidrógeno, alquilo (C₁-C₇), arilo (C₆-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₇), aril (C₆-C₁₀)-alquil (C₁-C₇--, heterociclilo o heteroarilo, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidos además con uno o dos grupos seleccionados entre alquilo (C₁-C₇), alcoxi (C₁-C₇), hidroxil, halógeno, haloalquilo (C₁-C₇), ciano o R₁₈-NH-C(O)--;

R₁₆ es arilo o heteroarilo;

25 R₁₇ es heterociclilo o alquilo (C₁-C₇) opcionalmente sustituido con uno o dos grupos seleccionados entre H₂N--, aril (C₆-C₁₀)-alquilo (C₁-C₇--, o alquil (C₁-C₇)-C(O)-NH--;

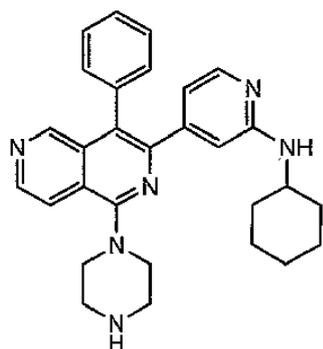
R₁₈ es heterociclil-alquilo (C₁-C₇--; o

30 donde heterociclilo se refiere a un anillo o sistema anular no aromático saturado o insaturado opcionalmente sustituido, que es monocíclico de 4, 5, 6 o 7 miembros; y

35 heteroarilo se refiere a un sistema anular aromático monocíclico o bicíclico o policíclico de 5-14 miembros, que tiene de 1 a 8 heteroátomos seleccionados entre N, O o S;

una sal farmacéuticamente aceptable de este; o un isómero óptico de este; o una mezcla de isómeros ópticos.

40 3. El agente para el uso de la reivindicación 2, donde dicha [2,6] Naftiridina es la ciclohexil-[4-(4-fenil-1-piperazin-1-il-[2,6]naftiridin-3-il)piridin-2-il]amina de fórmula (II):



(II)

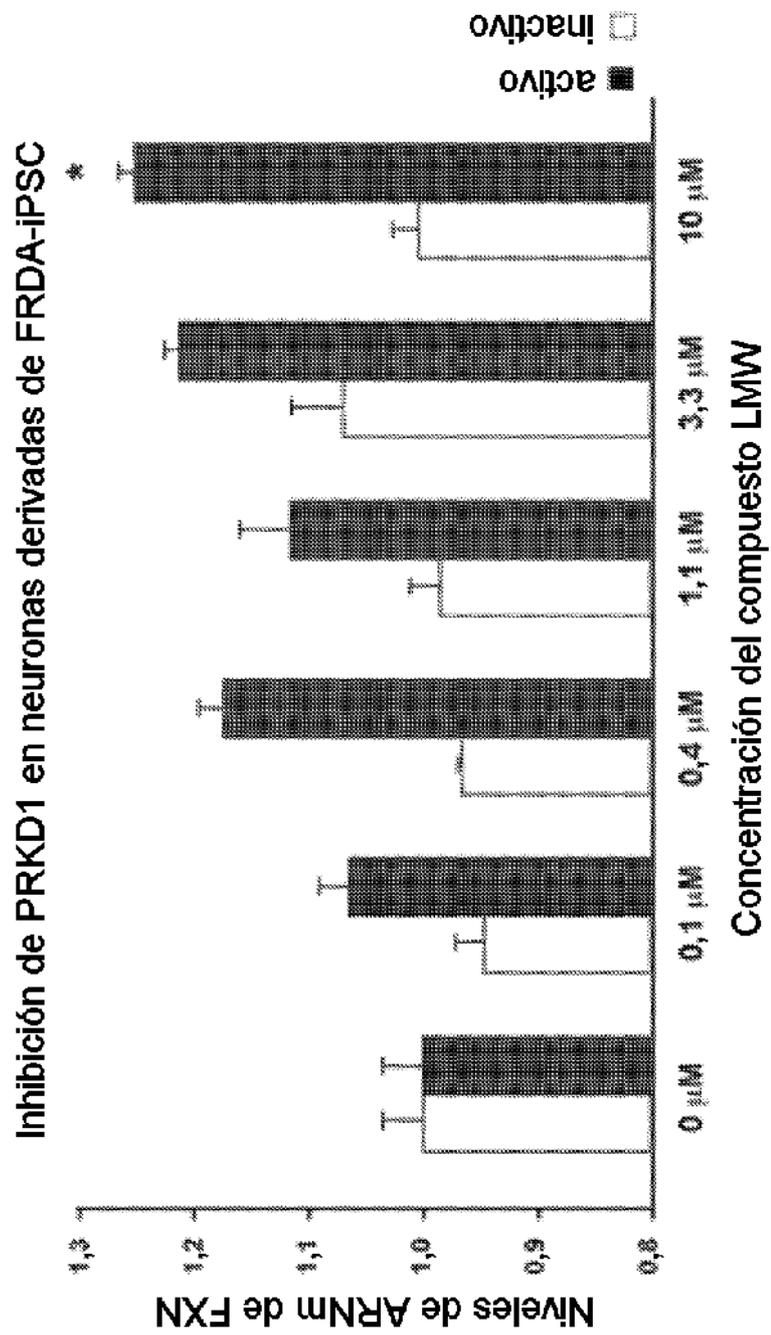


Figura 1