

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 231**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 31/145 (2006.01)

A61K 31/4418 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2017 PCT/US2017/041851**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18013761**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2017 E 17828436 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024 EP 3484474**

54 Título: **Compuestos de fenotiazina para el tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías**

30 Prioridad:

13.07.2016 US 201662361631 P

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

10.12.2024

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER
CORPORATION (50.0%)
55 Shattuck Street
Boston, Massachusetts 02115, US y
DANA FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BRADNER, JAMES;
QI, JUN;
BUCKLEY, DENNIS;
ZON, LEONARD, I. y
MACARI, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 992 231 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

Compuestos de fenotiazina para el tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a métodos, composiciones y kits para el tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la anemia de Diamond-Blackfan (DBA). En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de nuevas clases de compuestos, es decir, inhibidores de la RSK (p90S6K); inhibidores de la p70S6K; e inhibidores de la rps6, para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías. En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de inhibidores de la Chk2 específicos, así como al uso de derivados de fenotiazina específicos para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA.

10 Antecedentes de la invención

15 La anemia de Diamond-Blackfan (DBA) es una anemia congénita que se presenta en niños, a menudo antes de cumplir un año de edad (Vlachos et al., 2008). El síntoma principal en estos pacientes es un bloqueo en la diferenciación eritroide y un posible defecto en las células madre hematopoyéticas (HSC), y algunos pacientes también tienen anomalías craneofaciales. La proteína ribosómica S19 (RPS19) fue el primer gen encontrado mutado en pacientes con DBA (Draptchinskaia et al., 1999). La secuenciación de muestras de pacientes ha identificado mutaciones de proteínas ribosómicas de subunidades grandes (60) o pequeñas (40) en más del 50 % de los pacientes (Vlachos et al., 2010), más recientemente rps29. Los pacientes son heterocigóticos para estas mutaciones y siempre mantienen una copia de tipo silvestre del gen de la proteína ribosómica afectado.

20 La desactivación de proteínas ribosómicas conduce a un aumento de proteínas ribosómicas libres. Algunas proteínas ribosómicas, incluyendo la RPL11 y la RPL5, pueden prevenir la degradación de la p53, ya que pueden unirse a la MDM2 y secuestrarla de la p53 (Fumagalli et al., 2009). Se ha demostrado que la RPL26 aumenta la proteína p53 mediante un mecanismo alternativo, ya que puede unirse al ARNm de la p53 y aumentar su traducción (Tagaki et al., 2005). La activación de la p53 desempeña un papel importante en la patogénesis de la DBA, así como en otras enfermedades en las que los genes ribosómicos y relacionados mutan, ahora denominadas ribosomopatías. Éstas incluyen el síndrome mielodisplásico 5q, en el que se pierde una copia de la RPS 14. La activación de la p53 también es una característica común en trastornos de insuficiencia de médula ósea, como la anemia de Fanconi (Ceccaldi et al., 2012). En las células CD34+ humanas, la inactivación de la RPS19 conduce a la activación de la p53 (Ebert et al., 2005; Flygare et al., 2005), con una mayor acumulación en células eritroides. Los defectos de diferenciación pueden rescatarse mediante la inhibición de la p53 (Dutt et al., 2011). Los modelos de ratón de mutación o desactivación de la RPS 19 tienen defectos hematopoyéticos que pueden rescatarse mediante mutación de la p53 (McGowan et al., 2008; Jaako et al., 2011). La RPS19 ha sido atacada por el morfolino en embriones de pez cebra, y los defectos hematopoyéticos del pez cebra mutante rpl11 se rescatan mediante la desactivación de la p53 (Danilova et al., 2008; Torihara et al., 2011; Danilova et al., 2011).

35 Las mutaciones de proteínas ribosómicas son frecuentes en pacientes con anemia de Diamond-Blackfan (DBA), que tienen aplasia de glóbulos rojos y anomalías craneofaciales. Los inventores han caracterizado previamente la rps29 mutante del pez cebra, una proteína ribosómica en la subunidad pequeña, que tiene defectos hematopoyéticos y endoteliales (Taylor et al., 2012). Los embriones Rps29^{-/-} tienen defectos morfológicos en la cabeza, así como una disminución de células madre hematopoyéticas, hemoglobina y tinción de marcadores endoteliales. Al igual que otros modelos de DBA, la desactivación de la p53 rescata casi por completo el fenotipo mutante rps29.

40 Los inventores han demostrado previamente que los embriones Rps29^{-/-} tienen un defecto en la especificación arterial, lo que conduce a una disminución de las HSC y a una disminución de la expresión de flk1 en los vasos intersegmentarios 24 horas después de la fertilización (hpf). La eritropoyesis primitiva también se ve afectada, ya que los embriones rps29^{-/-} tienen menos hemoglobina. Estos embriones también tienen un aumento de la apoptosis, particularmente en la cabeza, y mueren cinco días después de la fertilización (dpf). Las vías de la p53 se activan en el embrión y la mutación de la p53 rescata todos los fenotipos hematopoyéticos y apoptóticos. Usando este sistema modelo, los inventores descubrieron que los inhibidores de la Calmodulina (CAM) y los inhibidores de Ca²⁺ pueden rescatar el fenotipo Rps29^{-/-} y pueden usarse para tratar trastornos ribosómicos o ribosomopatías, por ejemplo la anemia de Diamond-Blackfan (DBA) (véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. 2015/0265627).

50 El documento US 2015/265627A1 describe composiciones y kits para el tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA. La invención se refiere al uso de inhibidores de la calmodulina (tales como los compuestos de fenotiazina) y bloqueadores de los canales de calcio para el tratamiento, por ejemplo, de la DBA. El inhibidor de la calmodulina reduce la p53 al menos en células CD34+, células eritroides o las células diferenciadas eritroides de un individuo.

55 Si bien se están logrando avances significativos en la identificación de compuestos para el tratamiento, las opciones de tratamiento actuales para el tratamiento de trastornos ribosómicos o ribosomopatías, por ejemplo, una mutación en una proteína ribosómica, están lejos de ser óptimas, especialmente para la DBA. Como tal, sigue siendo imperativo descubrir terapias novedosas, eficaces y dirigidas para estas enfermedades asociadas con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, por ejemplo, una mutación en una proteína ribosómica. En particular, existe una gran necesidad en la

técnica de métodos mejorados para el tratamiento de la DBA con fármacos de moléculas pequeñas.

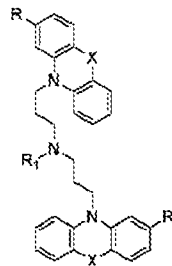
Compendio de la invención

La presente invención se refiere en general a una composición para el tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la anemia de Diamond-Blackfan (DBA), tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. La invención se refiere al uso de derivados de fenotiazina específicos, por ejemplo, Perfenazina (PerSuCC), o ACV, o 221E, o DB-4-088-2 (088-2), o DB-4-088-3 (088-3), o DB-4-086 (086), o DB-4-087-2 (087-2), o DB-4-087-3 (087-3), o DB-4-089 (089)) para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA.

En particular, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la señalización de la RSK está regulada de forma ascendente en células deficientes en proteínas ribosómicas, por ejemplo, células deficientes en RPA19. Los inventores han descubierto que la RSK se activa tras la deficiencia de RPS 19 en células CD34⁺ y que los inhibidores de la RSK (p90s6K), así como los inhibidores de la p70s6K, aumentan la hemoglobina (Hb) en embriones de pez cebra *rps29*^{-/-}, un modelo *in vivo* de defecto de proteína ribosómica. Los inventores han determinado además que inhibidores específicos de la Chk2 no descritos anteriormente rescatan la Hb en embriones *rps29*^{-/-}, es decir, CCT y III.

Además, los inventores han identificado derivados de fenotiazina específicos, no descritos anteriormente, tales como ACV; 22E1; PerSucc; DB-4-088-2 (088-2); DB-4-088-3 (088-3); y DB-4-089 (089), que funcionan particularmente bien para rescatar defectos morfológicos y defectos hematopoyéticos y endoteliales en embriones de pez cebra *rps29*^{-/-}. El derivado de fenotiazina DB-4-088-2 (088-2) ventajosamente no cambió el comportamiento del pez cebra en un cribado de comportamiento, y el derivado de fenotiazina DB-4-089 aumentó la Hb en bajas concentraciones, y también aumentó la diferenciación eritroide. Los compuestos derivados de fenotiazina DB-4-083 (083); DB-4-084 (084); y DB-4-086 (086) no aumentaron la Hb en las mismas concentraciones bajas que el DB-4-089.

En ciertas realizaciones, el compuesto de fenotiazina para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo, la DBA, es un compuesto de la fórmula (I):



FÓRMULA (I)

en donde:

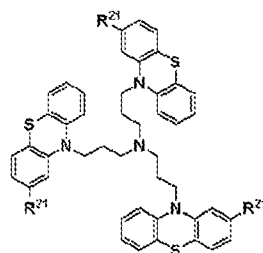
X es O o S;

R¹ es H, alquilo, alquenoilo, alquínilo, ciclilo, heterociclilo, acilo, arilo, heteroarilo, alquilheteroarilo o alquilarilo;

cada R es independientemente H, halo, alquilo, alquilo, alquenoilo, alquínilo, haloalquilo, CN, OH, NH₂, alquilamino, dialquilamino, CO₂H, acilo, SH, tioalcoxi, SO₂H o SO₃H;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Véase la sección de la presente memoria titulada compuestos de fenotiazina.

En algunas realizaciones, el compuesto de fenotiazina para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA, es un compuesto de la fórmula II:



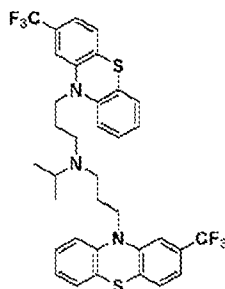
FÓRMULA (II)

en donde:

cada R²¹ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halo, alquilo, haloalquilo, CN, OH, NH₂, alquilamino, dialquilamino, CO₂H, acilo, SH, tioalcoxi, SO₂H y SO₃H;

5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Véase la sección de la presente memoria titulada compuestos de fenotiazina.

En una realización, el compuesto de fenotiazina para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA, es el compuesto de la estructura:



10 Por lo tanto, los inhibidores de la señalización de la RSK, por ejemplo los inhibidores de la RSK p90S6K y p70S6K, los inhibidores de la rsp6, así como los derivados de fenotiazina y los compuestos inhibidores (CaM) específicos descritos en la presente memoria (por ejemplo, BABTA) pueden usarse en un método para el tratamiento de individuos con trastornos de proteínas ribosómicas o ribosomopatías, por ejemplo la anemia de Diamond-Blackfan (DBA) y otras ribosomopatías, como la mielodisplasia, incluyendo mielodisplasia 5q, síndrome de Shwachman-Diamond y síndrome de Treacher Collins en individuos humanos.

15 En un aspecto se describe una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de la calmodulina que disminuye la p53 activa en al menos una de las células CD34+, células eritroides o células diferenciadas eritroides, en donde el inhibidor de la calmodulina es un compuesto de fenotiazina, en donde el compuesto de fenotiazina se selecciona entre el grupo que consiste en ACV-1-235 (ACV); JJM-II-221E (221E); y DB1026 (PerSuCC) DB-4-088-2 (088-2); DB-4-088-3 (088-3); DB-4-086 (086); DB-4-087-2 (087-2); DB-4-087-3 (087-3); DB-4-089 (089), o un compuesto de la Fórmula I o la Fórmula II.

25 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, el individuo tiene un trastorno ribosómico en el que el individuo tiene anemia de Diamond-Blackfan (DBA) o eritroblastopenia hereditaria, por ejemplo cuando el individuo tiene DBA1, DBA2, DBA3, DBA4, DBA5, DBA6, DBA7 o DBA8. En algunas realizaciones, un individuo con un trastorno ribosómico tiene una mutación en la proteína ribosómica 19 (RPS19). En realizaciones alternativas, un individuo con un trastorno ribosómico tiene una mutación en la proteína ribosómica de al menos una de, pero sin limitarse a, RPS7, RPS10, RPS19, RPS24, PRS26, RPS17, PRS27L RPS29, RPL35A, PRL5 y PPL11.

30 En algunas realizaciones, un individuo con un trastorno ribosómico tiene una mutación en una proteína ribosómica seleccionada entre el grupo que consiste en: rPL2A, rPL2B, rPL3, rPL4A, rPL4B, rPL7A, rPL7B, rPL10, rPL11, rPL16A, rPL17A, rPL17B, rPL18A, rPL18B, Rp119A, rPL19, rPL25, rPL29, rPL31A, rPL31B, rPL36A, rPL40A, rPS1A, rPS6A, rPS6B, rPS14A, rPS15, rPS19, rPS23B, rPS25A, rPS26B, rPS29, rPS29B y rPS31.

En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, la composición se administra con otro agente terapéutico para tratar el defecto de la proteína ribosómica, seleccionado entre el grupo que consiste en: corticosteroides, transfusiones de sangre.

35 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, el inhibidor administrado al individuo aumenta el número de células eritroides CD71+ en el individuo y/o aumenta los niveles de hemoglobina en el individuo.

En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, el individuo tiene un trastorno ribosómico, tal como la DBA que tiene un síntoma de anemia macrocítica y/o anomalías craneofaciales.

40 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, la ribosomopatía es la mielodisplasia 5q, por ejemplo, en la que el individuo tiene una mutación en la Rps14 o una disminución en la expresión de la Rps14. En algunas realizaciones, un individuo con mielodisplasia 5q tiene médula ósea displásica.

45 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, la ribosomopatía es el síndrome de Shwachman-Diamond, por ejemplo, en el que el individuo tiene una mutación en Sbds. En algunas realizaciones, un individuo con el síndrome de Shwachman-Diamond tiene uno o más síntomas seleccionados entre insuficiencia pancreática, disfunción de la médula ósea y deformidades esqueléticas.

En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, la ribosomopatía es el síndrome de Treacher Collins, por ejemplo, en el que el individuo tiene una mutación en el TCOF1 (nucleolar). En algunas realizaciones, un individuo con el síndrome de Treacher Collins tiene una o más deformidades craneofaciales.

Breve descripción de los dibujos

5 El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con uno o más dibujos en color, previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

10 La **Figura 1** muestra las características clínicas, los tratamientos y la genética asociados con la anemia de Diamond-Blackfan (DBA). Más de la mitad de los pacientes tienen una mutación en un gen de proteína ribosómica (todas las mutaciones son heterocigóticas). No existe ningún tratamiento eficaz y dirigido disponible para estos pacientes.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra las ribosomopatías adicionales, siendo la más común el subtipo 5q de MDS. Cualquier fármaco que encontremos que funcione en nuestros modelos de DBA también ayudaría a pacientes con otras ribosomopatías.

15 La **Figura 3** es un esquema de las consecuencias moleculares de la deficiencia de proteína ribosómica. La interrupción de la biogénesis ribosómica conduce a la activación de la p53 a través de la acumulación de proteínas ribosómicas libres que se unen y secuestran el regulador negativo de la p53, MDM2. Esto permite una acumulación de p53 activa en el núcleo, que luego puede activar objetivos posteriores de p53, como p21 y GADD45.

20 Las **Figuras 4A a 4B** son fotos de peces cebra. La **Figura 4A** muestra que los peces cebra con una mutación en rps29 tienen una expresión disminuida de cmyb (marcador hematopoyético) y flk1 (marcador de vasos endoteliales) y son anémicos, lo que se demuestra por la falta de tinción con bencidina (que tiñe la hemoglobina (Hb)). Estos peces de proteína ribosómica modelan la DBA. (Taylor, A.M., et al. (2012). Exp. Hematol. 40, 228-237.e5., Mirabello, L., et al. (2014). Blood 124, 24-32.). La **Figura 4B** muestra fotos de peces cebra del fenotipo rescatado. De acuerdo con otros modelos animales de DBA, el cruce del mutante rps29 con un mutante p53 rescata estos fenotipos, lo que demuestra que los defectos hematopoyéticos y endoteliales están mediados por la p53.

25 Las **Figuras 5A y 5B** muestran fotos de peces cebra y estructuras de compuestos novedosos que pueden rescatar el defecto de Hb en nuestro modelo de DBA. Los inhibidores específicos de la Chk2, CCT y III, pueden rescatar la Hb en los peces. La **Figura 5A** muestra fotos de peces cebra del rescate de A-3, W-7, CCT y III. La **Figura 5B** muestra estructuras químicas de compuestos TFP, A-3, W-7, CCT y III que se identificaron mediante el cribado químico para rescatar la Hb en embriones rps 29-/-.

30 La **Figura 6** muestra un breve esquema de la función de la calmodulina. La calmodulina 1) se conserva evolutivamente, 2) es abundante en la célula, 3) es un sensor de Ca²⁺, 4) interactúa con proteínas, 5) activa quinasas/fosfatasa, 6) los inhibidores de CaM son antipsicóticos aprobados por la FDA, 7) trifluoperazina (TFP).

35 Las **Figuras 7A a 7C** son esquemas y gráficos que muestran los resultados de nuestros inhibidores en un modelo humano *in vitro* de DBA. En la **Figura 7A**, unas células CD34⁺ esquemáticas derivadas de sangre de cordón umbilical se expandieron en cultivo durante 4 días y luego se infectaron con un lentivirus que contenía una horquilla contra RPS 19 o luciferasa como control. Después de 3 días de selección, las células se trasladaron a un medio de diferenciación eritroide y se incubaron con fármacos hasta el día 12. A continuación, las células se recolectaron para análisis de citometría de flujo y ARN. El día 12, las células deficientes en RPS 19 tienen solo un 40 % de células precursoras eritroides, mientras que nuestras células de control tienen un 70 %. La **Figura 7B**, muestra el % de células precursoras eritroides el día 12 después del tratamiento con TFP. El tratamiento con TFP aumenta los porcentajes de células CD71+. La deficiencia de RPS19 aumenta los niveles de ARNm de p21. La **Figura 7C** es un gráfico de las tasas de p21 después del tratamiento con TFP. El tratamiento con TFP disminuye de forma dependiente de la dosis el ARNm de p21. También vemos esto con nuestros inhibidores de Chk2 (datos no mostrados). En consecuencia, los inhibidores de CAM rescatan el modelo *in vitro* humano de DBA y reducen la expresión del gen diana de p53.

45 Las **Figuras 8A a 8D** son esquemas y gráficos que muestran que la TFP rescata parcialmente la anemia en un modelo de ratón inducible por DBA, utilizando un modelo de ratón desactivado por RPS19 inducible por dox. (Jaako, P., et al. (2011). Blood 118, 6087-6096.) La **Figura 8A** muestra un esquema del procedimiento. Los ratones WT fueron irradiados y trasplantados con médula de un ratón donante que contenía una horquilla inducible por dox contra la RPS19. Tras el injerto, los ratones se alimentaron con dox para inducir la deficiencia de Rps19 y se trataron con TFP cada dos días durante 2 semanas. Después de 2 semanas se extraen sangre y médula ósea para su análisis. La **Figura 8B** muestra un gráfico de los niveles de ARNm de p21. Al utilizar los niveles de ARNm de p21 para medir la actividad de p53 en la médula de los ratones, los ratones con deficiencia de Rps19 aumentaron los niveles de ARNm de p21. El tratamiento de ratones con TFP disminuye el nivel de ARNm de p21 en los ratones. La **Figura 8C** muestra un gráfico del número de glóbulos rojos. La **Figura 8D** muestra un gráfico de los niveles de hemoglobina. El tratamiento con TFP de ratones con deficiencia de RPS19 aumenta significativamente el número de glóbulos rojos y los niveles de hemoglobina. Por lo tanto, los compuestos

encontrados en un cribado químico del pez cebra pudieron rescatar un modelo de DBA humano *in vitro* e *in vivo* en mamíferos.

Las **Figuras 9A a 9C** muestran esquemas y gráficos. La **Figura 9A** es un esquema del P53 de tipo silvestre y de la región reguladora p53 eliminada (p53 reg). La **Figura 9B** muestra un esquema de procedimiento. Las células Saos2 (células nulas de p53) se transfectaron transitoriamente con construcciones de p53 y se trataron con vehículo o TFP 20 μ M durante 24 horas. La actividad de la TFP en la p53 se evaluó mediante la capacidad de la TFP para reducir los niveles de ARNm de la p21 medidos mediante qPCR. La **Figura 9C** es un gráfico de la expresión de ARN de p21. Dado que nuestro compuesto disminuye la actividad de p53, queríamos determinar la región de p53 responsable de la actividad inhibidora de CaM. La mutación de la secuencia de localización nuclear no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la TFP y la TFP no inhibió la capacidad de la p53 para formar un tetrámero. A continuación, se eliminaron los 30 aminoácidos C-terminales de p53 (363-393). Esta construcción es p53-reg. Se descubrió que la región reguladora (REG) de p53 es necesaria para la actividad de la TFP.

Las **Figuras 10A a 10C** muestran esquemas, gráficos y geles que indican que los inhibidores de CaM y Chk2 reducen la fosforilación de S392. La **Figura 10A** es un esquema de los sitios de fosforilación de la región reguladora conservados. La **Figura 10B** son gráficos de un análisis de espectrometría de masas no sesgado que busca modificaciones postraduccionales de p53 alteradas en presencia del inhibidor de CaM TFP o del inhibidor de Chk2, BML. Las células 293T se transfectaron con WT-p53 etiquetadas con GFP y se trataron con TFP o BML durante 3 horas. El P53 se inmunoprecipitó usando un anticuerpo contra GFP y se sometió a un análisis de espectrometría de masas. Sorprendentemente se comprobó que solo 1 residuo estaba fosforilado diferencialmente en presencia de TFP y BML. Mediante dos métodos de espectrometría de masas diferentes, ya sea mediante espectrometría de masas convencional o mediante el etiquetado con TMT del péptido, se descubrió que en ambos casos el porcentaje de péptidos que contenían serina 392 fosforilada se redujo en muestras tratadas con TFP y BML (**Figura 10B**). También se observó que esta serina se conserva tanto en el pez cebra como en el ratón (**Figura 10A**). La **Figura 10C** es un Western Blot que indica una disminución de la fosforilación. Se identificó que la serina 6 y la serina 315 estaban fosforiladas, pero el porcentaje de péptidos que contenían estas fosforilaciones no cambió con el tratamiento con TFP o BML.

Las **Figuras 11A a 11C** son esquemas y gráficos que indican que el fosfomimético p53 S392 evita que la TFP reduzca la actividad de la p53. Para confirmar la importancia de la capacidad de los inhibidores de CaM para bloquear la fosforilación de la p53, se creó la p53 fosfomimética sustituyendo S392 por un ácido aspártico, que imita la fosforilación constitutiva. También se generó una p53 fosfomimética de control en el que el S15 se reemplazó con ácido aspártico. Este mutante no debería tener ningún efecto sobre la capacidad de la TFP para reducir la actividad de la p53. La **Figura 11A** es un esquema del experimento utilizado para probar estos mutantes, se transfectaron transitoriamente WT p53, S15D y S392D en células Saos2 y se trataron con vehículo o TFP. Para evaluar la actividad de p53, se examinaron los niveles de ARNm de p21 y MDM2. La **Figura 11B** es un gráfico de la expresión de la p21. La **Figura 11C** es un gráfico de la expresión del ARNm de MDM2. En células que contenían WT p53 o S15D p53, la TFP pudo reducir los niveles de p21 y MDM2. Sin embargo, en células que contenían p53 S392D, la TFP no pudo reducir los niveles de p21 o MDM2. Confirmar que el bloqueo de la fosforilación de S392 es importante para la actividad de la TFP.

La **Figura 12** muestra un gráfico del porcentaje de inhibición de la actividad de quinasa *in vitro* de los inhibidores de CaM y Chk2. Se preguntó si los inhibidores de CaM y Chk2 bloquean quinasas específicas. Las quinasas conocidas que fosforilan S392 son CK2 y p38. Sin embargo, los inhibidores de estas quinasas no rescataron la Hb en peces *rps29^{-/-}*. Por lo tanto, la pregunta era: ¿qué es lo que inhibe la TFP aguas arriba? ¿Está inhibiendo una quinasa que fosforila S392? Se presentan los inhibidores de CaM y Chk2 para la elaboración de perfiles de quinasa mediante el SelectScreen de Thermo Fisher. Mediante el cribado de 100 quinasas, se descubrió que múltiples inhibidores de CaM y Chk2 bloqueaban la actividad de múltiples quinasas en la familia de proteínas quinasas s6 ribosómicas, tanto p70S6K como p90S6K (RSK).

La **Figura 13** muestra un gráfico del porcentaje de inhibición de la actividad de quinasa *in vitro* de los inhibidores de CaM y Chk2 en miembros de la familia RSK, RSK1 (p90S6K), RSK 2 (p90S6K), RSK3 (p90S6K), RSK4, (p90S6K) y p70S6K.

La **Figura 14** es un esquema que muestra la evidencia bibliográfica de que la CaM desempeña un papel en la traducción y la ruta de RSK. Se cita la siguiente bibliografía: RSK inhibitors were found in a screen of 23K shRNAs for p53 inhibitors that reduce p53 activity (p21 levels) but not protein levels Berns, K. et al. (2004). Nature 428, 431-437; Increased Calcium or ionomycin treatment causes sustained RSK activation Chuderland, D., Marmor, G., Shainskaya, A., y Seger, R. (2008). J. Biol. Chem. 283, 11176-11188; AA acids activate mTOR through Ca/CaM signaling Gulati, P. et al. (2008). Cell Metabolism 7, 456-465; RSK2 and 3 are elevated in *rps29^{-/-}* microarray compared to WT/HET and p70S6K, downstream of mTOR and RSK, can phosphorylate p53 S392 Ci, Y. et al. (2014). Cell Death and Disease 5, e1542-10. Se planteó la hipótesis de que la deficiencia de RP aumenta la señalización de RSK y que los inhibidores de CaM y Chk2 bloquean la señalización aguas abajo de RSK y se preguntó si la actividad de RSK aumentó durante la deficiencia de proteína ribosómica.

Las **Figuras 15A a 15B** son geles y gráficos que indican que los embriones *Rps29^{-/-}* tienen niveles aumentados de RSK (p90S6K), p70S6K y RPS6 en comparación con los embriones *rps29^{+/+}*. (El anticuerpo fosfo-RSK no funciona en el pez cebra.) La **Figura 15** muestra un gel de lisados embrionarios. Los embriones completos se lisaron en tampón RIPA y se procesaron en un gel SDS-PAGE al 10 %. Pista 1. WT= WT/*RPS29^{+/-}* lisados embrionarios 48 hpf. Pista 2. MU = *rps29^{-/-}* 48 lisados embrionarios 48 hpf. La **Figura 15B** muestra una micromatriz que compara embriones WT y *rps29^{-/-}* a 24 hpf, se identificó RSK2 como el gen con mayor expresión diferencial, con un valor medio de cambio de multiplicación de 1.6 veces con respecto a los embriones WT. Para comparar, se incluyen los valores medios de cambio de multiplicación de p53 y MDM2, que se sabe que son altos durante la deficiencia de *rps*.

Las **Figuras 16A a 16C** muestra inhibidores de RSK y p70S6K aumentan la Hb en embriones *rps29^{-/-}*. La **Figura 16A** muestra un gráfico de barras de los niveles de Hb en % de embriones frente a SL1010. La **Figura 16B** muestra un gráfico de barras de los niveles de Hb en % de embriones frente a SL1010. La **Figura 16C** muestra imágenes representativas de peces cebra; SL = inhibidor de RSK, pF = inhibidor de p70S6K, FLU = inhibidor de CaM. El inhibidor de la CaM, la flufenazina (FLU), rescata mejor que el inhibidor de la RSK o el inhibidor de la p70S6K por sí solos.

Las **Figuras 17A a 17C** son esquemas y geles que indican que los inhibidores de CaM y Chk2 bloquean la fosforilación de la p70S6K de forma selectiva durante la deficiencia de RP. La **Figura 17A** muestra un esquema en el que se utilizaron células 293T y se indujo una deficiencia de proteína ribosómica usando ARNhc para RPS19 o Luc para el control. La **Figura 17B** es un gel que indica que la fosforilación de p70S6K es inhibida selectivamente por TFP y BML durante la deficiencia de proteína ribosómica. Estos inhibidores aumentan la fosforilación de ERK, lo que también se observa con los inhibidores de RSK. La **Figura 17C** es un gel del efecto del ARNhc de Luc y RPS10 sobre S392 fosforilada. Los inhibidores de CaM y Chk2 inhiben la familia de las quinasas s6 ribosómicas en células humanas. Los inhibidores de RSK aumentan la fosforilación de ERK a través de un circuito de retroalimentación negativa. Por lo tanto, TFP y BML afectan de manera similar a ERK de la misma manera.

La **Figura 18** es un esquema del ensayo de activación de RSK en células humanas. El modelo *in vitro* más relevante en el campo de la sangre son las células humanas primarias, como las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Las **Figuras 19A a 19B** muestran que la RSK se activa tras la deficiencia de RPS19 en células CD34. La **Figura 19A** muestra un gel de fosforilación que presenta los resultados del tratamiento con TFP de células CD34 deficientes en RPS19, indica que la RSK es activada y la fosforilación de RPS6 aumenta en células desactivadas por RPS19. La **Figura 19B** muestra un esquema de la deficiencia de RP. El tratamiento con TFP reduce los niveles totales de P-RPS6 y P-p53, S392 y p53.

La **Figura 20** es un gel que muestra que la p-70S6K fosforila directamente la p53 en S392 en 10 minutos. Usando p70S6K o RSK activo recombinante y combinándolo con p53 y ATP recombinantes, se ve que solo la p70S6K puede fosforilar la p53 en S392. La RSK no fosforiló la p53 después de 30 minutos de incubación con ATP. S15, S20 y S315 no son fosforilados por p70S6K y RSK1/2/3/ no fosforila p53 en las mismas condiciones (datos no mostrados).

La **Figura 21** es un esquema de nuestro modelo actual: Durante la deficiencia de RP, no hay suficientes ribosomas funcionales ni suficiente traducción. La célula está intentando regular de forma ascendente la traducción (especialmente en RBC, cuando necesitan producir mucha globina). Para compensar, el eje RSK es mucho más activo durante la deficiencia de RP, en un esfuerzo por obtener una mayor traducción. El calcio necesita CaM para activar muchas quinasas y para señalar tanto para el eje mTOR como para el eje RSK. Sin ceñirse a la teoría, se propone que los inhibidores de la CaM inhiben estas quinasas al unirse a la CaM disponible y, por lo tanto, bloqueando la señalización. Los inhibidores de la Chk2 actúan directamente en la inhibición de la RSK y la p70S6K (lo demuestra nuestro perfil de quinasas *in vitro*).

Las **Figuras 22A y 22B** muestran un gráfico y un gel que indican que los niveles intracelulares de Ca^{2+} están aumentados en células deficientes en RP y que la quelación reduce la fosforilación de p70S6K y RPS6. No todos los inhibidores de la CaM inhibieron directamente la RSK o la p70S6K en nuestros perfiles de quinasas *in vitro*. Se plantea la hipótesis de que la inhibición de la CaM es indirecta, la CaM es necesaria para la señalización de calcio. La **Figura 22A** muestra un gráfico de calcio en lisados celulares, utilizando un kit colorimétrico de detección de calcio se midió la cantidad de calcio en lisados celulares y se comprobó que las células en las que se había desactivado la RPS19 tenían niveles elevados de calcio y el tratamiento de esos lisados con un quelante de calcio, BAPTA-AM, podía reducir los niveles de calcio. La **Figura 22B** es un gel de fosforilación, en el que se muestra que la quelación del calcio en células reduce la fosforilación de p70S6K y RPS6, de forma similar a nuestros inhibidores de CaM (TF). Inhibidor de RSK: SL y B1. Inhibidor de p70S6K: PF. En resumen se muestra: 1) Los inhibidores de CaM y Chk2 reducen la fosforilación de la p53 por S392, en mucha mayor medida durante la deficiencia de proteína ribosómica, 2) los inhibidores de CaM y Chk2 también disminuyen la P-p70S6K en mucha mayor medida durante la deficiencia de RP, 3) la p70S6K puede fosforilar directamente la p53 S392 *in vitro*, 4) los niveles de proteína total de RSK, p70S6K y *rps6* aumentan la deficiencia de RP *in vitro* e *in vivo*, 5) la RSK2 aumenta en nuestra

micromatriz en embriones *rps20*^{-/-} frente a WT 24 hpf. La proteína valida esta regulación de forma ascendente, 6) los niveles de calcio aumentan durante la deficiencia de RP, 7) el bloqueo de la señalización del calcio CaM (inhibidores de la CaM) o la inhibición directa de la RSK o la p70S6K (inhibidores de la Chk2) conduce a una disminución de la actividad de la P-p53 y la p53. La reducción de la actividad de p53 conduce a que menos RBC sufran apoptosis, lo que alivia la anemia.

La **Figura 23** es un gráfico de barras que indica que las fenotiazinas aprobadas por la FDA, como la perfenizina y la flufenazina, aumentan la Hb en los embriones anémicos de pez cebra *rps29*^{-/-}. Sin embargo, la exposición prolongada a las fenotiazinas se asocia con efectos secundarios neurológicos negativos. Por lo tanto, se deseaba detectar derivados de fenotiazina. Nuestro racional: Las fenotiazinas afectan a la actividad locomotora en el pez cebra (Boehmler W, et al. *Genes, Brain and Behaviour*. (2007)), se necesita un compuesto que no entre en el cerebro, otros están generando derivados de la fenotiazina y existe un cribado de alto rendimiento para detectar la exclusión de la BBB con el comportamiento.

La **Figura 24** es un esquema de la generación de derivados de fenotiazina. Se usaron 2 métodos de síntesis generales para generar los compuestos que han de ser ensayados. Síntesis 1: compuestos que retienen el quimiotipo activo (el sistema de anillo de fenotiazina) y se diversifican sistemáticamente en un sitio permisivo distal con respecto a la piperazina alifática. En resumen, se utiliza una estrategia de biblioteca de sesgos eficiente y altamente paralela. Síntesis 2: biblioteca enfocada para explorar los determinantes en torno al sistema de anillo tricíclico para la actividad biológica.

Las **Figuras 25A a 25D** son gráficos de barras y fotos de peces cebra que indican que dos derivados de muestra sintetizados aumentan la Hb en embriones *rps29*^{-/-}: Perpenazina succ (PerSucc), véase la **Figura 25A**, y ACV, véase la **Figura 25C**. La **Figura 25B** muestra un embrión tratado con Persucc en comparación con el embrión con DMSO. La **Figura 25D** muestra un embrión tratado con ACV en comparación con el embrión con DMSO.

La **Figura 26** es una foto de muestra de una placa de *seguimiento del comportamiento*. Se utilizaron 6 peces cebra DpFwt, 1 pez/pocillo de placa de 96 pocillos. El fármaco fue suministrado al agua de los peces, se agregó el fármaco al pocillo y se rastreó el movimiento durante 2 horas. Luego se utilizó un algoritmo de Matlab para cuantificar los fármacos de movimiento: Perfenazina Succ (PerSucc): 221E y ACV. El cuadrado amarillo resalta un pez representativo que nada de forma muy errática.

Las **Figuras 27A a 27C** son mapas térmicos de la actividad de los peces durante 2 h de registro. 221E (Figura 21B) y Persucc (Figura 21C) son fármacos. El DMSO es el vehículo de control (Figura 21A).

Las **Figuras 28A a 28B** son datos gráficos que resumen el movimiento de los peces durante 2 h con adición de PerSucc en Reposo (**Figura 28A**) o Actividad (**Figura 28B**). Los peces tratados con PerSuCC son menos activos y reposan más que los peces tratados con DMSO.

Las **Figuras 29A a 29B** son datos gráficos que resumen el movimiento de los peces durante 2 h con adición de ACV en Reposo (**Figura 29A**) o Actividad (**Figura 29B**). Los peces tratados con ACV son más activos y reposan menos que los peces tratados con DMSO.

Las **Figuras 30A a 30B** son datos gráficos que resumen el movimiento de los peces durante 2 h con adición de 221E en Reposo (**Figura 30A**) o Actividad (**Figura 30B**). Los peces tratados con 221E tienen una actividad más errática porque reposan menos y se mueven más que los peces tratados con DMSO. Hacen una pausa y luego se mueven muy rápido, luego hacen una pausa y lo hacen de nuevo. Por lo tanto, los estudios de comportamiento representan un ensayo robusto y rápido que puede diferenciar el movimiento del pez cebra: más y menos actividad frente a actividad errática, y se pueden obtener estadísticas con tan solo 8 peces por tratamiento.

La **Figura 31** muestra las estructuras químicas de compuestos usados en algunas realizaciones de la invención.

La **Figura 32** muestra estructuras químicas de derivados de fenotiazina específicos.

La **Figura 33** muestra estructuras químicas de derivados de fenotiazina específicos. Nota: El nombre abreviado del compuesto es, por ejemplo, DB-4-083=083.

Las **Figuras 34A a 34B** son fotos de peces cebra del método de puntuación para los niveles de hemoglobina. Niveles de tipo silvestre (Figura 34A). Los niveles alto, medio y bajo se muestran en la (**Figura 34B**).

Las **Figuras 35A y 35B** son gráficos de barras que muestran el efecto de los diversos derivados de fenotiazina sobre los niveles de Hb en embriones *rps*^{-/-}. **Figura 35A**: efectos 083; 084; 086; y 087-2. **Figura 35B**: efectos 087-3; 088-2; 088-3; y 089.

Las **Figuras 36A a 36D** son gráficos del número de movimientos con DMSO o fármaco. **Figura 36A**: flufenazina. **Figura 36B**: Inhibidor de Ch2. **Figura 36C**: 83. **Figura 36D**: estructura química de 083. 083 reduce el movimiento del pez cebra.

Las **Figuras 37A a 37D** son gráficos del número de movimientos con DMSO o fármaco. **Figura 36A:** flufenazina. **Figura 37B:** inhibidor de Ch2. **Figura 37C:** 088-2. **Figura 37D:** estructura química de 088-2. 088-2 no altera el movimiento del pez cebra.

5 Las **Figuras 38A a 38D** son gráficos del número de movimientos con DMSO o fármaco. **Figura 38A:** flufenazina. **Figura 38B:** inhibidor de Ch2. **Figura 38C:** 089. **Figura 38D:** estructura química de 089. 089 altera el movimiento del pez cebra.

Las **Figuras 39A a 39D** son gráficos del número de movimientos con DMSO o fármaco. **Figura 39A:** flufenazina. **Figura 39B:** inhibidor de Ch2. **Figura 39C:** 088-3. **Figura 39D:** estructura química de 088-3. 088-3 altera el movimiento del pez cebra.

10 La **Figura 40** es un esquema del ensayo de nuevos derivados de fenotiazina en un modelo humano *in vitro* de DBA. Las células mononucleares de sangre periférica humana primaria (PBMC) se transducen con ARNhc RPS 19-GFP para producir una deficiencia de proteína ribosómica. Las células se transfieren a medios de diferenciación eritroide y se tratan una vez durante 5 días con fármaco. Las células se recolectan y se analizan en busca de precursores eritroides mediante citometría de flujo para células CD71⁺.

15 La **Figura 41** muestra diagramas de citometría de flujo para células CD71⁺ en presencia de varios derivados de fenotiazina, tal como se indica en la Figura 40.

La **Figura 42** es un gráfico de barras que representa el número absoluto de células eritroides en comparación con células tratadas con DMSO. Los derivados de fenotiazina aumentan el número absoluto de células eritroides.

20 La **Figura 43** muestra un gráfico que incluye un breve resumen de los efectos de los derivados de fenotiazina sobre la Hb, el comportamiento y la diferenciación de Glóbulos Rojos (RBC).

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la señalización de RSK está regulada de forma ascendente en células deficientes en proteínas ribosómicas, por ejemplo células deficientes en RPA19. Los inventores han descubierto que la RSK se activa tras la deficiencia de RPS 19 en células CD34 y que los inhibidores de la RSK (p90s6K), y que los inhibidores de la p70s6K, aumentan la hemoglobina (Hb) en embriones de pez cebra *rps29^{-/-}*, un modelo *in vivo* de defecto de proteína ribosómica. Los inventores han determinado además que los inhibidores de Chk2 rescatan la Hb en embriones *rps29^{-/-}*.

30 Por consiguiente, la divulgación se refiere al uso de nuevas clases de compuestos, es decir, inhibidores de RSK (p90S6K), por ejemplo SL; inhibidores de p70S6K, por ejemplo PF; e inhibidores de rps6, para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías. En algunos aspectos, la divulgación se refiere al uso de inhibidores de Chk2 específicos, es decir, CCT y III, para el tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo DBA. La invención se refiere al uso de derivados de fenotiazina específicos, por ejemplo, PerSuCC, ACV y 221E, DB-4-088-2 (088-2); DB-4-088-3 (088-3); DB-4-086 (086); DB-4-087-2 (087-2); DB-4-087-3 (087-3); DB-4-089 (089), derivados sustituyentes trifluoronados específicos, o un compuesto de la Fórmula I o la Fórmula II, para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo DBA. La invención se define en las reivindicaciones. Si los compuestos que no están cubiertos por las reivindicaciones se describen en la presente memoria para su uso en los métodos reivindicados, pueden ser solo ilustrativos y no necesariamente formar parte de la invención reivindicada.

35 Por conveniencia, en la presente memoria se recopilan ciertos términos empleados en la presente memoria, en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. A menos que se indique lo contrario, o esté implícito en el contexto, los siguientes términos y expresiones incluyen los significados que se proporcionan a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o sea evidente por el contexto, los siguientes términos y expresiones no excluyen el significado que el término o la expresión haya adquirido en la técnica a la que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar a describir realizaciones particulares y no pretenden limitar la invención reivindicada, ya que el alcance de la invención está limitado únicamente por las reivindicaciones. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Definiciones

40 El término "realización" no implica necesariamente que el objeto descrito en el mismo forme parte de la invención reivindicada. El término "regular" usado en la presente memoria en referencia a la expresión de un gen se refiere a producir un efecto sobre, por ejemplo, la expresión génica. En algunas realizaciones, el efecto puede ser estimulador, tal como aumentar la expresión de un gen. En algunas realizaciones, el efecto puede ser inhibidor, tal como disminuir la expresión de un gen. Los términos "regular" y "modular" se usan indistintamente en la presente memoria.

45 La expresión "inhibidor de la calmodulina", usado indistintamente en la presente memoria, se refiere en general a un agente o molécula que inhibe la actividad o expresión de la calmodulina. Los inhibidores de la calmodulina pueden ser de origen sintético o biológico. Pueden ser moléculas orgánicas o inorgánicas, o péptidos, anticuerpos o ARN

antisentido que inhiben la calmodulina. Los inhibidores de la calmodulina de la invención son entidades químicas o moléculas que pueden inhibir la expresión de la calmodulina y/o la actividad biológica de la calmodulina; por ejemplo, se ha determinado previamente que los compuestos de TFP y FLU, profármacos, derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles en el tratamiento de trastornos ribosómicos (véase la publicación de EE. UU. 2015/0265627). Los ensayos para monitorizar la actividad de la calmodulina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. 2015/0265627. En la presente memoria, los inventores han identificado compuestos no descritos anteriormente que funcionan particularmente bien para el tratamiento de trastornos ribosómicos, por ejemplo, ACV, 221E y PerSuCC, DB-4-088-2 (088-2); DB-4-088-3 (088-3); DB-4-086 (086); DB-4-087-2 (087-2); DB-4-087-3 (087-3); DB-4-089 (089), derivados sustituyentes trifluorados, o un compuesto de la Fórmula I o la Fórmula II (véanse las **Figuras 25 y 32**).

La expresión "proteína ribosómica", también designada en la presente memoria como "proteínas r", se refiere a cualquiera de las partículas de ribonucleoproteína intracelular relacionadas con la síntesis de proteínas; consisten en unidades disociables de forma reversible y se encuentran unidas a membranas celulares o libres en el citoplasma. Pueden presentarse individualmente o en grupos (polirribosomas). Pueden presentarse solos o en grupos, llamados polirribosomas o polisomas, que son ribosomas unidos por el ARNm y participan activamente en la síntesis de proteínas. Las ribonucleoproteínas (a menudo designadas como "RNP") son importantes en la síntesis de proteínas; constan de dos unidades disociables de forma reversible, una grande (L) y otra pequeña (S) (denominadas también subunidades 60S y 40S en eucariotas (50S y 30S en bacterias)). El término incluye cualquiera de las proteínas que, junto con el ARNr, forman las subunidades ribosómicas implicadas en el proceso celular de traducción. El término abarca proteínas de la subunidad pequeña (S) y la subunidad grande (L) de los ribosomas. Debido a la alta conservación de los restos de ARN y proteínas de los ribosomas y de la maquinaria de biogénesis de los ribosomas de levaduras y bacterias, gran parte del conocimiento sobre estas moléculas orgánicas proviene del estudio de los ribosomas de *E. coli*, y también se aplica a los seres humanos. En la subunidad pequeña (30S) de los ribosomas de *E. coli*, las proteínas denominadas S4, S7, S8, S15, S17, S20 se unen de forma independiente al ARNr 16S. Tras el ensamblaje de estas proteínas de unión primarias, S5, S6, S9, S12, S13, S16, S18 y S19 se unen al ribosoma en crecimiento. Estas proteínas también potencian la adición de S2, S3, S10, S11, S14 y S21. El enlace de proteínas a uniones helicoidales es importante para iniciar el pliegue terciario correcto del ARN y organizar la estructura general. Casi todas las proteínas contienen uno o más dominios globulares. Además, casi todas contienen extensiones largas que pueden entrar en contacto con el ARN en regiones de gran alcance. Los residuos básicos de las proteínas producen una estabilización adicional, ya que neutralizan la repulsión de carga de la cadena principal del ARN. También existen interacciones proteína-proteína para mantener unida la estructura mediante interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno. Las investigaciones teóricas apuntaron a los efectos correlacionados de la unión a proteínas sobre las afinidades de unión durante el proceso de ensamblaje [2].

Las expresiones "trastorno ribosómico" o "trastorno de proteínas ribosómicas" se refieren a una enfermedad o trastorno relacionado con una función mutada y/o anormal de una proteína ribosómica. Puede incluir una enfermedad debida a una mutación en una proteína ribosómica, o una enfermedad debida a una disminución del nivel, o una pérdida parcial de la función, de una proteína ribosómica o, alternativamente, una enfermedad debida a un nivel elevado de una proteína ribosómica, en comparación con un individuo de control sano normal. La expresión trastorno ribosómico incluye enfermedades genéticas de proteínas ribosómicas, incluyendo, entre otros, la anemia de Diamond-Blackfan (DBA), la mielodisplasia, el síndrome de Shwachman-Diamond (SDS) y el Síndrome de Treachers Collins (TCS).

Los términos "ribosomopatía" o "ribosomopatías" se refieren a cualquier enfermedad o mal funcionamiento de los ribosomas. Los ribosomas son pequeños orgánulos que se encuentran en todas las células y que participan en la producción de proteínas mediante la traducción de ARN mensajero. Una enfermedad o un mal funcionamiento de los ribosomas incluyen: (i) enfermedad de las proteínas de la biogénesis ribosómica, (ii) enfermedad de las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas, y (iii) enfermedades de las proteínas ribosómicas (como se ha discutido más arriba en la definición de "trastorno de proteínas ribosómicas"), y todas se revisan en Freed et al., *Mol. Biosyst.* 2010; 6(3); 481-493 titulado "When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis". Las enfermedades de las proteínas de la biogénesis ribosómica incluyen, pero no se limitan a, el síndrome de Treachers-Collins (TCS), la infertilidad masculina debida a una mutación en UTP14c, la cirrosis infantil de los indios nativos americanos (NAIC), el síndrome de Bowen-Conradi (BCS), el defecto neurológico de la alopecia y el síndrome de endrocrinopatía (síndrome ANE), el síndrome de Shwachman-Diamond (SDS), el gen candidato para glaucoma primario de ángulo abierto (POAG) y modificador de la neurofibromatosis tipo I (NF1). Las enfermedades de las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas incluyen, pero no se limitan a, la displasia Anauxética (AD), la displasia cartilagino-capilar (también llamada condrodisplasia metafisaria, tipo McKusick; CCH), la displasia metafisaria sin hipotricosis (MDWH), la Disqueratosis congénita (también llamada síndrome de Zinzzler-Engman-Cole), el síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (en el que algunos casos son variantes graves de la Disqueratosis congénita) y síndrome de Prader-Willi (PWS).

El término "derivado", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia química relacionada estructuralmente con otra, es decir, una sustancia "original", que puede denominarse compuesto "precursor". Se puede preparar un "derivado" a partir del compuesto precursor estructuralmente relacionado en una o más etapas. Las propiedades físicas y químicas generales de un derivado también son similares a las del compuesto precursor.

- Las expresiones “derivado funcional” y “mimético” se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a compuestos que poseen una actividad biológica (en particular, actividad biológica funcional) que es sustancialmente similar a la actividad biológica de la entidad o molécula de la que es un derivado funcional. La expresión derivado funcional pretende incluir los fragmentos, variantes, análogos o derivados químicos de una molécula. En ciertas realizaciones, los derivados funcionales y los análogos funcionales de los inhibidores de la calmodulina (por ejemplo, análogos funcionales de TFP, A-3, W-7, A-7, W-5 y CGS-9343) pueden evaluarse para determinar su actividad biológica usando el ensayo descrito en la presente memoria, en el que los derivados y análogos que inhiben la calmodulina se considerarían derivados funcionales o análogos funcionales de dichos inhibidores de la calmodulina.
- El término “análogo”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente que conserva la misma función biológica, o una función biológica y/o estructura similares (es decir, la inhibición de la calmodulina) que la molécula o sustancia química o polipéptido de los que es un análogo. Los ejemplos de análogos incluyen peptidomiméticos (un análogo peptídico), ácidos nucleicos peptídicos (un análogo de ácido nucleico), compuestos orgánicos o inorgánicos pequeños y grandes, así como derivados y variantes de un polipéptido o ácido nucleico de la presente memoria.
- La expresión “sustancialmente similar”, cuando se usa para definir la actividad biológica de un derivado o análogo de un inhibidor (por ejemplo, el inhibidor de p90S6K, p70S6K, Chk2 o calmodulina) en comparación con la actividad biológica del inhibidor del que es un derivado o análogo, significa que un derivado o análogo particular difiere del inhibidor precursor inicial en su estructura química, en uno o más grupos o elementos, incluyendo sustituciones, deleciones o adiciones de grupos de elementos, cuyo efecto neto consiste en retener al menos parte de la actividad biológica encontrada en el inhibidor precursor inicial con respecto a la inhibición de la quinasa u otra actividad y/o expresión de RSK, Chk2. Un experto en la materia puede evaluar dicha actividad biológica de inhibición por un derivado o análogo funcional mediante ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo en ensayos de quinasa *in vitro*, que miden la fosforilación de sustratos.
- El término “tejido” pretende incluir células intactas, sangre, preparados sanguíneos tales como plasma y suero, huesos, articulaciones, músculos, músculos lisos y órganos.
- El término “individuo” incluye individuos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico. Los términos “individuo” y “sujeto” se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a un animal, por ejemplo un ser humano, para el que se proporciona un tratamiento, incluyendo un tratamiento profiláctico, con las células de acuerdo con la presente invención. Los “animales no humanos” de la invención incluyen mamíferos tales como ratas, ratones, conejos, ovejas, gatos, perros, vacas, cerdos y primates no humanos.
- Las expresiones “una muestra de referencia” o “un nivel de referencia”, tal como se usan indistintamente en la presente memoria, se refieren a un control negativo de la afección. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento, un nivel de referencia es el nivel en el que un individuo no recibe tratamiento. En algunas realizaciones, un nivel de referencia en el contexto del diagnóstico es el nivel presente en un individuo sano normal. La expresión “individuo sano normal” se refiere a un individuo que no presenta síntomas de ninguna enfermedad o trastorno, o en el que no se ha identificado ninguna enfermedad o trastorno, o que no está recibiendo ningún tratamiento farmacológico, o a un individuo que los médicos identifican como sano basándose en exámenes médicos. En algunas realizaciones, un nivel o muestra de referencia usado en la presente memoria se refiere al nivel medido en un punto temporal anterior de un individuo que está siendo tratado.
- Los términos “tratar” y “tratamiento”, utilizados indistintamente, con respecto al tratamiento de una enfermedad o trastorno, significan prevenir el desarrollo de la enfermedad, o alterar el curso de la enfermedad (por ejemplo, pero sin limitarse a, retrasar la progresión de la enfermedad), o revertir un síntoma de la enfermedad o reducir uno o más síntomas y/o uno o más marcadores bioquímicos en un individuo, evitando que uno o más síntomas empeoren o progresen, promover la recuperación o mejorar el pronóstico en un individuo que está en riesgo de la enfermedad, así como retrasar o reducir la progresión de la enfermedad existente. El término tratamiento abarca reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado con una función inadecuada de proteínas ribosómicas. Tal como se usa en la presente memoria con respecto a un trastorno de proteínas ribosómicas, el término tratamiento se usa para referirse a la reducción de un síntoma y/o un marcador bioquímico de un trastorno de proteínas ribosómicas en al menos un 10 %, por ejemplo, una reducción de los niveles de p21 y/o p53 en células CD34+ del individuo, o un retorno de la hemoglobina a los niveles normales, o una restauración o prevención de deformidades craneofaciales. Por ejemplo, pero sin carácter limitativo, una reducción de los niveles de p21 y/o p53 en células CD34+ del individuo, solo como ejemplo ilustrativo, en un 10 % se considerarían tratamientos eficaces mediante los métodos descritos en la presente memoria.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término “tratar” incluye prevenir la progresión y/o reducir o revertir al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado con un trastorno de proteínas ribosómicas o ribosomopatía, por ejemplo DBA. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el tratamiento puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad o signo o síntoma de un trastorno de proteínas ribosómicas o ribosomopatía. Por ejemplo, los individuos que se sabe que tienen una mutación en proteínas ribosómicas o, alternativamente, niveles de expresión bajos de una proteína ribosómica específica, pueden someterse a un tratamiento profiláctico para prevenir la aparición de uno o más síntomas asociados con dicha mutación en la proteína ribosómica y/o niveles disminuidos en la proteína ribosómica. En algunas realizaciones, el tratamiento

5 profiláctico se puede administrar a individuos que hayan recibido un tratamiento previo de una enfermedad asociada con un trastorno de proteínas ribosómicas. Por ejemplo, los individuos que han recibido corticosteroides o transfusiones de sangre para el tratamiento de la DBA y/u otro tratamiento previo para estabilizar su DBA pueden tratarse profilácticamente (por ejemplo, con un inhibidor de la calmodulina y/o un bloqueador de los canales de calcio tal como se describe en la presente memoria).

10 Tal como se usan en la presente memoria, los términos “prevenir” y “prevención” se refieren a evitar o retrasar la manifestación de uno o más síntomas o marcadores medibles de una enfermedad o trastorno. Un retraso en la manifestación de un síntoma o marcador es un retraso con respecto al tiempo en el que dicho síntoma o marcador se manifiesta en un individuo de control o no tratado con una probabilidad o susceptibilidad similar de desarrollar la enfermedad o trastorno. Los términos “prevenir” y “prevención” incluyen no solo evitar o prevenir totalmente los síntomas o marcadores, sino también reducir la gravedad o el grado de cualquiera de esos síntomas o marcadores, en relación con los síntomas o marcadores que surgen en un individuo de control o no tratado con una probabilidad o susceptibilidad similar de desarrollar la enfermedad o el trastorno, o en relación con los síntomas o marcadores que puedan surgir según las medidas históricas o estadísticas de las poblaciones afectadas por la enfermedad o el trastorno. Por “gravedad reducida” se entiende al menos una reducción del 10 % en la gravedad o el grado de un síntoma o marcador de enfermedad medible, en relación con un control o referencia, por ejemplo, al menos el 15 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o incluso el 100 % (es decir, sin síntomas ni marcadores medibles).

20 El término tratamiento “profiláctico” o “terapéutico” se refiere a la administración al huésped de una o más de las composiciones objeto. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, una enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped), el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada, mientras que si se administra después de la manifestación de la afección no deseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, está destinado a disminuir, mejorar o mantener la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).

25 Tal como se usa en la presente memoria, “silenciamiento génico” o “silenciado génicamente” en referencia a una actividad de una molécula de ARNi, por ejemplo, un ARNsi o un ARNmi, se refiere a una disminución en el nivel de ARNm en una célula para un gen diana (por ejemplo, el gen p90S6K o el gen p70S6K) en al menos aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 100 % del nivel de ARNm encontrado en la célula sin la presencia de la molécula de interferencia de ARNmi o ARN. En una realización preferida, los niveles de ARNm disminuyen en al menos aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 99 %, aproximadamente un 100 %.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término “ARNi” se refiere a cualquier tipo de ARN interferente, incluyendo, entre otros, ARNisi, ARNihc, microARN endógeno y microARN artificial. Por ejemplo, incluye secuencias previamente identificadas como ARNsi, independientemente del mecanismo de procesamiento aguas abajo del ARN (es decir, aunque se cree que los ARNsi tienen un método específico de procesamiento *in vivo* que da como resultado la escisión del ARNm, dichas secuencias pueden incorporarse en los vectores en el contexto de las secuencias flanqueadoras descritas en la presente memoria). El término “ARNi” puede incluir tanto moléculas de ARNi silenciadoras de genes como moléculas efectoras de ARNi que activan la expresión de un gen. Solo a modo de ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes de ARNi que sirven para inhibir o silenciar genes son útiles en los métodos, kits y composiciones descritos en la presente memoria para inhibir los genes p70S6K y p90S6K de RSK.

45 Tal como se usa en la presente memoria, un “ARNsi” se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, teniendo dicho ARN bicatenario la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o gen diana cuando el ARNsi está presente o se expresa en la misma célula que el gen diana. El ARN ARNsi bicatenario puede estar formado por las cadenas complementarias. En una realización, un ARNsi se refiere a un ácido nucleico que puede formar un ARNsi bicatenario. La secuencia del ARNsi puede corresponder al gen diana de longitud completa, o a una subsecuencia del mismo. Normalmente, el ARNsi tiene una longitud de al menos aproximadamente 15 a 50 nucleótidos (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNsi bicatenario tiene una longitud de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos, y el ARNsi bicatenario tiene una longitud de aproximadamente 15 a 50 pares de bases, preferiblemente de aproximadamente 19 a 30 nucleótidos de bases, preferiblemente de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud).

55 Tal como se usa en la presente memoria, el “ARNhc” o “ARN de horquilla pequeña” (también denominado estructura de horquilla) es un tipo de ARNsi. En una realización, estos ARNhc están compuestos por una cadena antisentido corta, por ejemplo de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos, seguida de un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura del bucle nucleotídico y la cadena antisentido puede seguirla.

Los términos “microARN” o “ARNmi” se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a ARN endógenos, algunos de los cuales se sabe que regulan la expresión de genes codificadores de proteínas a nivel postranscripcional. Los microARN endógenos son pequeños ARN presentes de forma natural en el genoma que son capaces de modular la utilización productiva del ARNm. El término microARN artificial incluye cualquier tipo de secuencia de ARN, distinta del microARN endógeno, que sea capaz de modular la utilización productiva del ARNm. Las secuencias de microARN se han descrito en publicaciones tales como Lim, et al., *Genes & Development*, 17, p. 991-1008 (2003), Lim et al. *Science* 299, 1540 (2003), Lee y Ambros *Science*, 294, 862 (2001), Lau et al., *Science* 294, 858-861 (2001), Lagos-Quintana et al., *Current Biology*, 12, 735-739 (2002), Lagos Quintana et al., *Science* 294, 853-857 (2001), y Lagos-Quintana et al., *RNA*, 9, 175-179 (2003). También se pueden incorporar múltiples microARN en una molécula precursora. Además, las estructuras de horquilla similares a los ARNmi pueden expresarse en las células como un vehículo para suministrar ARNmi artificiales y ARN interferentes cortos (ARNsi) con el fin de modular la expresión de genes endógenos a través de las vías del ARNmi o del ARNi.

Tal como se usan en la presente memoria, “ARN bicatenario” o “ARNds” se refieren a moléculas de ARN que están compuestas por dos cadenas. Las moléculas bicatenarias incluyen aquellas compuestas por una única molécula de ARN que se dobla sobre sí misma para formar una estructura bicatenaria. Por ejemplo, la estructura en horquilla de las moléculas progenitoras de las que se deriva el ARNmi monocatenario, denominada premiARN (Bartel et al., 2004). Cell 116:281-297), comprende una molécula de ARNds.

El término “gen” usado en la presente memoria puede ser un gen genómico que comprende secuencias reguladoras de la transcripción y/o la traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias 5' y 3' no traducidas y secuencias reguladoras). La región codificante de un gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos o un ARN funcional, tal como ARNt, ARNr, ARN catalítico, ARNsi, ARNmi y ARN antisentido. Un gen también puede ser un ARNm o un ADNc correspondiente a las regiones codificantes (por ejemplo, exones y ARNmi) que comprenden opcionalmente secuencias 5' o 3' no traducidas unidas a las mismas. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende toda o una parte de la región codificante y/o secuencias 5' o 3' no traducidas unidas a la misma.

La expresión “producto(s) génico(s)”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a incluir el ARN transcrito a partir de un gen, o un polipéptido codificado por un gen o traducido a partir del ARN.

Las expresiones “disminuir”, “reducir”, “reducción” o “disminución”, “regular de forma descendente” o “inhibir” se usan todas en la presente memoria generalmente para referirse a una disminución en una cantidad estadísticamente significativa. Sin embargo, para evitar dudas, “bajar”, “reducir”, “reducción” o “disminución” o “inhibir” significan una disminución de al menos un 10 % en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo, una disminución de al menos aproximadamente un 20 %, o al menos aproximadamente un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, o al menos aproximadamente un 60 %, o al menos aproximadamente un 70 %, o al menos aproximadamente un 90 % o hasta e incluida una disminución del 100 % (es decir, un nivel no existente en comparación con una muestra de referencia), o cualquier disminución entre el 10 y el 100 % en comparación con un nivel de referencia. Cuando se usan “disminución” o “inhibición” en el contexto del nivel de expresión o actividad de un gen o una proteína, por ejemplo la calmodulina, se refieren a una reducción en el nivel o la actividad de una proteína o ácido nucleico en una célula, un extracto celular o un sobrenadante celular. Por ejemplo, dicha disminución puede deberse a una reducción de la estabilidad, transcripción o traducción del ARN, a una mayor degradación de las proteínas o a la interferencia del ARN. En algunas realizaciones, un inhibidor de la calmodulina que es una molécula pequeña tal como se describe en la presente memoria puede disminuir la actividad o expresión de la calmodulina. Preferiblemente, esta disminución es de al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 % o incluso al menos aproximadamente el 90 % del nivel de expresión o actividad en condiciones de control. El término “nivel”, tal como se usa en la presente memoria en referencia a la calmodulina, se refiere a la expresión o actividad de la calmodulina.

Las expresiones “regular de forma ascendente”, “aumentar” o “activar” se usan todas en la presente memoria para referirse en general a un aumento de una cantidad estadísticamente significativa; para evitar cualquier duda, las expresiones “regular de forma ascendente”, “aumentar” o “elevar” significan un aumento de al menos el 10 % en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo un aumento de al menos aproximadamente el 20 %, o al menos aproximadamente el 30 %, o al menos aproximadamente el 40 %, o al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 %, o al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 90 % o un 100 % de aumento o más, o cualquier aumento entre el 10 y el 100 % en comparación con un nivel de referencia, o un aumento superior al 100 %, por ejemplo un aumento de al menos aproximadamente 2 veces, o al menos aproximadamente 3 veces, o al menos aproximadamente 4 veces, o al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, o cualquier aumento entre 2 veces y 10 veces o más en comparación con un nivel de referencia. Cuando se usa “aumento” en el contexto de la expresión o actividad de un gen o proteína, se refiere a un cambio positivo en el nivel o la actividad de la proteína o el ácido nucleico en una célula, un extracto celular o un sobrenadante celular. Por ejemplo, dicho aumento puede deberse a una mayor estabilidad, transcripción o traducción del ARN, o a una disminución de la degradación de las proteínas. Preferiblemente, este aumento es de al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos

aproximadamente el 100 %, al menos aproximadamente el 200 % o incluso al menos aproximadamente el 500 % o más del nivel de expresión o actividad en condiciones de control.

Las expresiones “significativamente diferente que”, “estadísticamente significativo” y expresiones similares se refieren a comparaciones entre datos u otras mediciones, en donde las diferencias entre dos individuos o grupos comparados son evidente o razonablemente diferentes a las del observador entrenado, o estadísticamente significativas (si la expresión incluye el término “estadísticamente” o si hay alguna indicación de prueba estadística, como un valor p, o si los datos, una vez analizados, producen una diferencia estadística mediante pruebas estadísticas estándar conocidas en la técnica).

Una “composición farmacéutica” se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un individuo mamífero. Dichas composiciones pueden formularse específicamente para su administración a través de una o más de varias vías, incluyendo, pero sin limitarse a, administración oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intranasal, sublingual, intraespinal, intracerebroventricular, y similares.

La expresión “cantidad eficaz” se usa indistintamente con la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” y se refiere a la cantidad de al menos un agente, por ejemplo un inhibidor de la calmodulina y/o un bloqueador de los canales de calcio de una composición farmacéutica, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado, por ejemplo, para reducir o detener al menos un síntoma del trastorno ribosómico o ribosomopatía, por ejemplo un síntoma de niveles altos de p53 y/o p21 en células CD34+ del individuo. Por ejemplo, una cantidad eficaz usando los métodos descritos en la presente memoria se consideraría como la cantidad suficiente para reducir un síntoma del trastorno ribosómico o ribosomopatía en al menos un 10 %. Una cantidad eficaz, tal como se usa en la presente memoria, también incluiría una cantidad suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de una enfermedad sintomática (por ejemplo, pero sin limitarse a, retrasar la progresión de un síntoma de la enfermedad) o revertir un síntoma de la enfermedad. Por consiguiente, la expresión “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de agente terapéutico (por ejemplo, los inhibidores de p90 y p70S6K de RSK y los inhibidores específicos de la Chk2 y la calmodulina descritos en la presente memoria) de la composición farmacéutica para aliviar al menos un síntoma de un trastorno ribosómico o ribosomopatía, por ejemplo la DBA. Dicho de otro modo, la “cantidad terapéuticamente eficaz” de un inhibidor tal como se describe en la presente memoria es la cantidad de un inhibidor de la calmodulina o un bloqueador de los canales de calcio que ejerce un efecto beneficioso sobre, por ejemplo, los síntomas del trastorno ribosómico o la ribosomopatía. La dosis administrada, como dosis únicas o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas del inhibidor, la vía de administración, las condiciones y características (sexo, edad, peso corporal, salud, talla) de los individuos, la extensión de los síntomas, los tratamientos simultáneos, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente terapéutico es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. La cantidad eficaz en cada caso individual puede ser determinada empíricamente por un experto en la materia de acuerdo con los métodos establecidos en la técnica y sin experimentación indebida. En general, las expresiones “terapéuticamente eficaz” y “eficaz para el tratamiento, la prevención o la inhibición” pretenden calificar el inhibidor descrito en la presente memoria que logrará el objetivo de reducir la gravedad de al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno de proteínas ribosómicas o ribosomopatía.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente memoria para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente memoria, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, líquidos o sólidos, implicados en el transporte o la transmisión de los agentes en cuestión desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación; por ejemplo, el vehículo no disminuye el impacto del agente en el tratamiento. En otras palabras, un vehículo es farmacéuticamente inerte. Las expresiones “vehículos fisiológicamente tolerables” y “vehículos de suministro biocompatibles” se usan indistintamente.

Los términos “administrado” y “sometido” se usan indistintamente en el contexto del tratamiento de una enfermedad o trastorno. Ambos términos se refieren a un individuo que está siendo tratado con una dosis eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la invención mediante métodos de administración tales como la administración parenteral o sistémica.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “alquilo” significa un radical alifático saturado lineal o ramificado que tiene una cadena de átomos de carbono. Normalmente se usan alquilo C_x y alquilo C_x-C_y, donde X e Y indican el número de átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, alquilo C₁-C₆ incluye alquilos que tienen una cadena de entre 1 y 6 carbonos (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, neopentilo, hexilo, y similares). El término alquilo representado junto con otro radical (por ejemplo, como en arilalquilo) significa un radical alquilo divalente saturado, lineal o ramificado, que tiene el número de átomos indicado o, cuando no se indica ningún átomo, significa un enlace, por ejemplo, arilo (C₆-C₁₀)alquilo (C₀-C₃) incluye fenilo, bencilo, fenetilo,

1-feniletil-3-fenilpropilo, y similares. La cadena principal del alquilo se puede insertar opcionalmente con uno o más heteroátomos, tales como N, O o S.

5 En realizaciones preferidas, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene 30 o menos átomos de carbono en su cadena principal (por ejemplo, C1-C30 para cadenas lineales, C3-C30 para cadenas ramificadas), y más preferiblemente 20 o menos. Del mismo modo, los cicloalquilos preferidos tienen de 3 a 10 átomos de carbono en su estructura de anillo y, más preferiblemente, tienen 5, 6 o 7 carbonos en la estructura de anillo. La expresión "alquilo" (o "alquilo inferior"), tal como se usa a lo largo de la especificación, los ejemplos y las reivindicaciones, pretende incluir tanto "alquilos no sustituidos" como "alquilos sustituidos", refiriéndose estos últimos a restos alquilo que tienen uno o más sustituyentes que reemplaza a un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal de hidrocarburo.

10 A menos que el número de carbono se especifique de otro modo, "alquilo inferior", tal como se usa en la presente memoria, significa un grupo alquilo, tal como se ha definido más arriba, pero que tiene de uno a diez carbonos, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono en su estructura de cadena principal. Del mismo modo, el "alqueno inferior" y el "alquino inferior" tienen longitudes de cadena similares. A lo largo de toda la solicitud, los grupos alquilo preferidos son alquilos inferiores. En realizaciones preferidas, un sustituyente designado en la presente memoria como
15 alquilo es un alquilo inferior.

Los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir halógeno, hidroxilo, nitro, tioles, amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo grupos sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato) y sililo, así como éteres, alquiltios y carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos y ésteres), -CF₃, -CN y similares.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "alqueno" se refiere a radicales hidrocarburo insaturados de cadena lineal, cadena ramificada o cíclicos que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Normalmente se usan alqueno C_x y alqueno C_x-C_y, donde X e Y indican el número de átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, alqueno C₂-C₆ incluye alquenos que tienen una cadena de entre 1 y 6 carbonos y al menos un doble enlace, por
25 ejemplo, vinilo, alilo, propeno, isopropeno, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-metilalilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, y similares). El alqueno representado junto con otro radical (por ejemplo, como en el arilalqueno) significa un radical divalente de alqueno lineal o ramificado que tiene el número de átomos indicado. La cadena principal del alqueno se puede insertar opcionalmente con uno o más heteroátomos, tales como N, O o S.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alquino" se refiere a radicales hidrocarburo insaturados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Normalmente se usan alquino C_x y alquino C_x-C_y, donde X e Y indican el número de átomos de carbono en la cadena. Por ejemplo, alquino C₂-C₆ incluye alquinos que tienen una
30 cadena de entre 1 y 6 carbonos y al menos un triple enlace, por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, isopentinilo, 1,3-hexadiinilo, n-hexinilo, 3-pentinilo, 1-hexen-3-inilo y similares. Alquino representado junto con otro radical (por ejemplo, como en el arilalquino) significa un radical divalente alquino lineal o ramificado que tiene el número de átomos indicado. La cadena principal del alquino se puede insertar opcionalmente con uno o más
35 heteroátomos, tales como N, O o S.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "halógeno" o "halo" se refiere a un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo. La expresión "radioisótopo halógeno" o "isótopo halo" se refiere a un radionucleido de un átomo seleccionado entre flúor, cloro, bromo y yodo.

40 Un "resto sustituido con halógeno" o "resto sustituido con halo", como grupo aislado o parte de un grupo mayor, significa un resto alifático, alicíclico o aromático, tal como se describe en la presente memoria, sustituido por uno o más átomos "halo", tal como se definen dichos términos en esta solicitud.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "haloalquilo" se refiere a un alquilo sustituido con uno o más átomos "halo". Por ejemplo, un alquilo halosustituido incluye haloalquilo, dihaloalquilo, trihaloalquilo, perhaloalquilo y similares (por ejemplo, alquilo (C₁-C₃) halosustituido incluye clorometilo, diclorometilo, difluorometilo, trifluorometilo (-
45 CF₃), 2,2,2-trifluoroetilo, perfluoroetilo, 2,2,2-trifluoro-1,1-dicloroetilo, y similares).

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico fusionado de 8 a 12 miembros o tricíclico fusionado de 11 a 14 miembros. El arilo C_x y el arilo C_x-C_y se usan normalmente cuando X e Y indican el número de átomos de carbono en el sistema de anillo. En algunas realizaciones, 1, 2, 3 o 4 átomos de hidrógeno de cada anillo pueden sustituirse por un sustituyente.

50 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico fusionado de 8 a 12 miembros o tricíclico fusionado de 11 a 14 miembros que tiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, de 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico, o de 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono) y de 1 a 3, de 1 a 6 o de 1 a 9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente. El heteroarilo C_x y el heteroarilo C_x-C_y se usan normalmente cuando X e Y indican
55 el número de átomos de carbono en el sistema de anillo. En algunas realizaciones, 1, 2, 3 o 4 átomos de hidrógeno de cada anillo pueden sustituirse por un sustituyente.

Los ejemplos de grupos arilo o heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, imidazolilo, tiazolilo, pirazolilo, piridazinilo, pirazinilo, triazinilo, tetrazolilo, indolilo, bencilo, fenilo, naftilo, antraceno, azuleno, fluoreno, indano, indeno, naftilo, fenilo, tetrahidronaftilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, carbazolilo 4aH, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizínilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilendioxfenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridoxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, 4H-quinolizínilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo y xantenilo, y similares.

Los heteroarilos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los derivados de benzo[b]furano, benzo[b]tiofeno, bencimidazol, imidazo[4,5-c]piridina, quinazolina, tieno[2,3-c]piridina, tieno[3,2-b]piridina, tieno[2,3-b]piridina, indolizina, imidazo[1,2-a]piridina, quinolina, isoquinolina, ftalazina, quinoxalina, naftiridina, quinolizina, indol, isoindol, indazol, indolina, benzoxazol, benzopirazol, benzotiazol, imidazo[1,5-a]piridina, pirazolo[1,5-a]piridina, imidazo[1,2-a]pirimidina, imidazo[1,2-c]pirimidina, imidazo[1,5-a]pirimidina, imidazo[1,5-c]pirimidina, pirrolo[2,3-b]piridina, pirrolo[2,3-c]piridina, pirrolo [3,2-c] piridina, pirrolo [3,2-b] piridina, pirrolo[2,3-d]pirimidina, pirrolo[3,2-d]pirimidina, pirrolo[2,3-b]pirazina, pirazolo[1,5-a]piridina, pirrolo[1,2-b]piridazina, pirrolo[1,2-c]pirimidina, pirrolo[1,2-a]pirimidina, pirrolo[1,2-a]pirazina, triazo[1,5-a]piridina, pteridina, purina, carbazol, acridina, fenazina, fenotiazeno, 1,2-dihidropirrolo [3,2,1-hi]indol, indolizina, pirido[1,2-a]indol, 2(H)-piridinona, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, bencitiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizínilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilendioxfenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolidilo, oxepanilo, oxetanilo, oxindolilo, pirimidinilo, fentridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridoxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizínilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo y xantenilo. Algunos grupos heteroarilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, piridilo, furilo o furanilo, imidazolilo, bencimidazolilo, pirimidinilo, tiofenilo o tienilo, piridazinilo, pirazinilo, quinolinilo, indolilo, tiazolilo, naftiridinilo, 2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-ilo, tetrahidroisoquinolinilo y similares.

El arilo y los heteroarilos pueden sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes en una o más posiciones con, por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfato, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, -CF₃, -CN o similares.

El término "ciclilo" o "cicloalquilo" se refiere a grupos hidrocarburo cíclicos saturados y parcialmente insaturados que tienen de 3 a 12 carbonos, por ejemplo, de 3 a 8 carbonos y, por ejemplo, de 3 a 6 carbonos. El arilo C_x y el arilo C_x-C_y se usan normalmente cuando X e Y indican el número de átomos de carbono en el sistema de anillo. Adicionalmente, el grupo cicloalquilo puede sustituirse opcionalmente, por ejemplo, con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes. El ciclilo C₃-C₁₀ incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,5-ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, biciclo[2.2.2]octilo, adamantan-1-ilo, decahidronaftilo, oxociclohexilo, dioxociclohexilo, tiociclohexilo, 2-oxobiciclo[2.2.1]hept-1-ilo y similares.

El término "heterociclilo" se refiere a un sistema de anillo no aromático monocíclico de 5 a 8 miembros, bicíclico de 8 a 12 miembros o tricíclico de 11 a 14 miembros que tiene de 1 a 3 heteroátomos si es monocíclico, de 1 a 6 heteroátomos si es bicíclico, o de 1 a 9 heteroátomos si es tricíclico, dichos heteroátomos seleccionados entre O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y de 1 a 3, de 1 a 6 o de 1 a 9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente). El heteroarilo C_x y el heteroarilo C_x-C_y se usan normalmente cuando X e Y indican el número de átomos de carbono en el sistema de anillo. En algunas realizaciones, 1, 2 o 3 átomos de hidrógeno de cada anillo pueden sustituirse por un sustituyente. Los ejemplos de grupos heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, piperazinilo, pirrolidinilo, dioxanilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, piperidilo, 4-morfolilo, 4-piperazinilo, pirrolidinilo, perhidropirrolizínilo, 1,4-diazaperhidroepinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxanilo, y similares.

Los términos "bicíclico" y "tricíclico" se refieren a conjuntos de anillos policíclicos fusionados, puenteados o unidos mediante un enlace simple.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "anillo fusionado" se refiere a un anillo que está unido a otro anillo para formar un compuesto que tiene una estructura bicíclica cuando los átomos del anillo que son comunes a ambos anillos están unidos directamente entre sí. Los ejemplos no exclusivos de anillos fusionados comunes incluyen decalina, naftaleno, antraceno, fenantreno, indol, furano, benzofurano, quinolina, y similares. Los compuestos que tienen sistemas de anillos fusionados pueden ser saturados, parcialmente saturados, cíclicos, heterociclicos, aromáticos, heteroaromáticos, y similares.

El término "ciano" significa el radical -CN.

- 10 El término "heteroátomo" se refiere a un átomo que no es un átomo de carbono. Los ejemplos particulares de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, oxígeno, azufre y halógenos. Un "resto heteroátomo" incluye un resto en el que el átomo por el que se une el resto no es un carbono. Los ejemplos de restos heteroátomo incluyen -N=, -NR^N-, -N⁺(O)=, -O-, -S- o -S(O)₂-, -OS(O)₂- y -SS-, en donde R^N es H u otro sustituyente.

El término "hidroxi" significa el radical -OH.

- 15 El término "nitro" significa el radical -NO₂.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "aromático" significa un resto en el que los átomos constituyentes forman un sistema de anillo insaturado, todos los átomos del sistema de anillo están hibridados sp² y el número total de electrones pi es igual a 4n+2. Un anillo aromático puede ser de manera que los átomos del anillo son solo átomos de carbono (por ejemplo, arilo) o pueden incluir átomos de carbono y no de carbono (por ejemplo, heteroarilo).

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "sustituido" se refiere a la sustitución independiente de uno o más (normalmente 1, 2, 3, 4 o 5) de los átomos de hidrógeno del resto sustituido por sustituyentes seleccionados independientemente entre el grupo de sustituyentes abajo enumerados en la definición de "sustituyentes" o especificados de otro modo. En general, un sustituyente que no es hidrógeno puede ser cualquier sustituyente que se pueda unir a un átomo del resto determinado que se especifica para ser sustituido. Los ejemplos de sustituyentes incluyen, pero no se limitan a, acilo, acilamino, aciloxi, aldehído, alicíclico, alifático, alcanosulfonamido, alcanosulfonilo, alcarilo, alquenilo, alcoxi, alcocarbonilo, alquilo, alquilamino, alquilcarbonoilo, alquileo, alquilideno, alquiltíos, alquinilo, amida, amido, amino, aminoalquilo, aralquilo, aralquilsulfonamido, arenosulfonamido, arenosulfonilo, aromático, arilo, arilamino, arilcarbonoilo, ariloxi, azido, carbamoilo, carbonilo, carbonilos (incluyendo cetonas, carboxi, carboxilatos, CF₃, ciano (CN), cicloalquilo, cicloalquileo, éster, éter, haloalquilo, halógeno, halógeno, heteroarilo, heterociclico, hidroxi, hidroxialquilo, imino, iminocetona, cetona, mercapto, nitro, oxaalquilo, oxo, oxoalquilo, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), grupos sililo, sulfonamido, sulfonilo (incluyendo restos sulfato, sulfamoilo y sulfonato), toles y ureido, cada uno de los cuales también puede estar opcionalmente sustituido o no sustituido. En algunos casos, dos sustituyentes, junto con el o los carbonos a los que están unidos, pueden formar un anillo.

- 35 Los términos "alcoxilo" o "alcoxi", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a un grupo alquilo, tal como se ha definido más arriba, que tiene un radical de oxígeno unido al mismo. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, terc-butoxi, n-propiloxi, isopropiloxi, n-butiloxi, isobutiloxi, y similares. Un "éter" son dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que convierte ese alquilo en un éter es o se parece a un alcoxilo, tal como puede representarse por uno de -O-alquilo, -O-alquenilo y -O-alquinilo. El aroxi se puede representar por -O-arilo u O-heteroarilo, en donde arilo y heteroarilo son como se definen más abajo. Los grupos alcoxi y aroxi pueden sustituirse como se ha descrito más arriba por alquilo.

El término "alquilarilo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo. El término "alquilheteroarilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un heteroarilo.

- 45 El término "alquiltío" se refiere a un grupo alquilo, tal como se ha definido más arriba, que tiene un radical azufre unido al mismo. En realizaciones preferidas, el resto "alquiltío" está representado por uno de -S-alquilo, -S-alquenilo y -S-alquinilo. Los grupos alquiltío representativos incluyen metiltío, etiltío y similares. El término "alquiltío" también abarca grupos cicloalquilo, grupos alqueno y cicloalqueno y grupos alquino. "Arltío" se refiere a grupos arilo o heteroarilo.

- 50 El término "acilo" se refiere a un sustituyente alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo, heterociclicarbonilo o heteroarilcarbonilo, cualquiera de los cuales puede sustituirse adicionalmente por sustituyentes. Los grupos acilo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, alcanoilo (C₁-C₆) (por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproilo, t-butilacetilo, etc.), (C₃-C₆) cicloalquilcarbonilo (por ejemplo, ciclopropilcarbonilo, ciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, etc.), carbonilo heterocíclico (por ejemplo, pirrolidinilcarbonilo, pirrolid-2-onal-5-carbonilo, piperidinilcarbonilo, piperazinilcarbonilo, tetrahidrofuranilcarbonilo, etc.), aroilo (por ejemplo, benzoilo) y heteroarilo (por ejemplo, tiofenil-2-carbonilo, tiofenil-3-carbonilo, furanil-2-carbonilo, furanil-3-carbonilo, 1H-pirroil-2-carbonilo, 1H-pirroil-3-carbonilo, benzo[b]tiofenil-2-carbonilo, etc.). Además, la porción alquilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo y heteroarilo del grupo acilo puede ser cualquiera de los grupos descritos en las definiciones respectivas.

5 El término "alquilamino" significa un resto nitrógeno que tiene al menos un radical alifático, ciclico o heterociclico insaturado lineal o ramificado unido al nitrógeno. El término "alquilamino" incluye "alquenilamino", "alquilamino", "ciclicilamino" y "heterociclicilamino". El término "arilamino" significa un resto nitrógeno que tiene al menos un radical arilo unido al nitrógeno. Por ejemplo, -Nharilo y -N(arilo)₂. El término "heteroarilamino" significa un resto nitrógeno que tiene al menos un radical arilo unido al nitrógeno. Por ejemplo, -NHheteroarilo y -N(heteroarilo)₂. Opcionalmente, dos sustituyentes junto con el nitrógeno también pueden formar un anillo. A menos que se indique lo contrario, los compuestos descritos en la presente memoria que contienen restos amino pueden incluir derivados protegidos de los mismos. Los grupos protectores adecuados para restos amino incluyen acetilo, tercbutoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y similares.

10 La expresión "mono- o dialquilamino" significa -NH(alquilo) o -N(alquil)(alquilo), respectivamente, tal como -NHCH₃, -N(CH₃)₂, y similares. Por ejemplo, los grupos amino representativos incluyen -NHCH₃, -N(CH₃)₂, -NH(alquiloC₁-C₁₀), -N(alquiloC₁-C₁₀)₂ y similares.

15 Con respecto a todas las definiciones proporcionadas en la presente memoria, se señala que las definiciones deben interpretarse como abiertas en el sentido de que pueden incluirse otros sustituyentes además de los especificados. Por lo tanto, un alquilo C₁ indica que hay un átomo de carbono pero no indica cuáles son los sustituyentes en el átomo de carbono. Por lo tanto, un alquilo C₁ comprende metilo (es decir, -CH₃) así como -CR_aR_bR_c, donde R_a, R_b y R_c pueden ser cada uno independientemente hidrógeno o cualquier otro sustituyente en el que el átomo alfa con respecto al carbono sea un heteroátomo o ciano. Por lo tanto, CF₃, CH₂OH y CH₂CN son todos alquilos C₁.

20 A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en la presente memoria pretenden incluir compuestos que difieren solo en presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen la presente estructura, excepto la sustitución de un átomo de hidrógeno por un deuterio o tritio, o la sustitución de un átomo de carbono por un carbono enriquecido en ¹³C o ¹⁴C, están dentro del alcance de la invención.

25 Una "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en la presente memoria, pretende abarcar cualquier compuesto descrito en la presente memoria que se utilice en forma de una sal del mismo, especialmente cuando la sal confiere al compuesto propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con la forma libre del compuesto o una forma de sal diferente del compuesto. La forma de sal farmacéuticamente aceptable también puede conferir inicialmente propiedades farmacocinéticas deseables al compuesto que no poseía previamente, e incluso puede afectar positivamente a la farmacodinámica del compuesto con respecto a su actividad terapéutica en el cuerpo. Un ejemplo de una propiedad farmacocinética que puede verse afectada favorablemente es la manera en que el compuesto se transporta a través de las membranas celulares, lo que a su vez puede afectar directa y positivamente a la absorción, distribución, biotransformación y excreción del compuesto. Si bien la vía de administración de la composición farmacéutica es importante, y varios factores anatómicos, fisiológicos y patológicos pueden afectar de manera crítica a la biodisponibilidad, la solubilidad del compuesto depende normalmente del carácter de la forma de sal particular del mismo que se ha utilizado. Un experto en la materia apreciará que una solución acuosa del compuesto proporcionará la absorción más rápida del compuesto en el cuerpo de un individuo que está siendo tratado, mientras que las soluciones y suspensiones lipídicas, así como las formas de dosificación sólidas, darán como resultado una absorción menos rápida del compuesto.

40 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isotiónico y similares. Véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977). Las sales ejemplares también incluyen sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares. Los ácidos adecuados que son capaces de formar sales con los compuestos de la divulgación incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares; y ácidos orgánicos tales como ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, 4,4'-metileno-bis(ácido 3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido acético, ácido antranílico, ácido benzenosulfónico, ácido benzoico, ácido canforsulfónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido etanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido heptanoico, ácido hidroxinaftoico, ácido láctico, ácido laurilsulfúrico, ácido maleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido mucónico, ácido naftalenosulfónico, ácido o- (4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido oxálico, ácido p-clorobenzenosulfónico, ácido propiónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido butilacético terciario, ácido trifluoroacético, ácido trimetilacético, y similares. Las bases adecuadas capaces de formar sales con los compuestos de la divulgación incluyen bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, carbonato de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, y similares; y bases orgánicas tales como mono-, di- y tri-alquilaminas y arilaminas (por ejemplo, trietilamina, diisopropilamina, metilamina, dimetilamina, N-metilglucamina, pirdina, picolina, diciohexilamina, N, N'-dibenciletilendiamina, y similares) y etanolaminas opcionalmente sustituidas

(por ejemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina y similares).

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se usan en la presente memoria, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección, infusión u otras técnicas de inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro espinal e intraesternal, sin limitación. Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", tal como se usan en la presente memoria, significan la administración de una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor tal como se describe en la presente memoria (por ejemplo, los inhibidores específicos de CHK2 y CAM, o inhibidores de p70S6K o p90S6K) de manera que entra en el sistema del animal y, por lo tanto, está sometida al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo la administración subcutánea.

Las expresiones "estadísticamente significativo" o "significativamente" se refieren a la significación estadística y generalmente significa una desviación estándar de dos desviaciones (2SD) por debajo de lo normal, o una actividad inferior, por ejemplo, la inhibición de la actividad de p70S6K, p90S6K, Chk2 o calmodulina. Las expresiones se refieren a la evidencia estadística de que hay una diferencia. Se define como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando la hipótesis nula es realmente cierta. La decisión se toma con frecuencia utilizando el valor p.

El término "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento, circunstancia o sustituyente descritos posteriormente pueden tener lugar o no, y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia tienen lugar y casos en los que no tiene lugar.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento. Por lo tanto, en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto lo imponga claramente de otro modo. Así, por ejemplo, la referencia a una composición farmacéutica que comprende "un agente" incluye la referencia a dos o más agentes.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "que comprende" significa que también pueden estar presentes otros elementos además de los elementos definidos presentados. El uso de "que comprende" indica inclusión más que limitación. La expresión "que consiste en" se refiere a las composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos tal como se describen en la presente memoria, que excluyen cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos requeridos para una realización determinada. La expresión permite la presencia de elementos que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas o funcionales de esa realización de la invención.

Tal como se utilizan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto lo imponga claramente de otro modo. Así, por ejemplo, las referencias al "método" incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo descrito en la presente memoria y/o que resultarán evidentes para los expertos en la materia al leer esta descripción, etc.

Salvo en los ejemplos de operación, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en la presente memoria deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa en relación con porcentajes, puede significar ± 1 %. La presente invención se explica además en detalle mediante lo siguiente, incluyendo los Ejemplos, pero el alcance de la invención no debe limitarse a los mismos.

Tal como se usa en la presente memoria, "rps6" se refiere a la proteína ribosómica S6 (rpS6), un componente de la subunidad ribosómica 40S que se cree que participa en la regulación de traducción. Si bien la verdadera función de la rpS6 se está investigando actualmente, los estudios han demostrado que participa en la regulación del tamaño celular, la proliferación celular y la homeostasis de la glucosa. Los estudios muestran que las quinasas S6 de la proteína ribosómica p70 (S6K1 y S6K2) y las quinasas S6 de la proteína ribosómica p90 (RSK) fosforilan la rpS6 y que la S6K1 y la S6K2 predominan en esta función. Acceso a Genebank, NM_001010 (Véase, por ejemplo, Magnuson B1, et al. (2012). "Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signaling networks". Biochemical Journal 441 (1): 1-21).

P90S6K y P70S6K (no forman parte de la invención reivindicada)

La quinasa s6 ribosómica (rsk) es una familia de proteínas quinasas. Hay dos subfamilias de rsk, 1) la p90rsk denominada p90S6K en la presente memoria, también conocida como proteína quinasa-1 activada por MAPK (MAPKAP-K1), y 2) la p70rsk denominada p70S6K en la presente memoria, también conocida como quinasa S6-H1 o simplemente quinasa S6. La Rsk recibe su nombre de la proteína ribosómica s6, que forma parte de la maquinaria de traducción, pero se han identificado varios otros sustratos, incluyendo otras proteínas ribosómicas.

Los sustratos citosólicos de la p90S6K incluyen la proteína fosfatasa 1; la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3); la L1 CAM, una molécula de adhesión a las células neurales; Son of Sevenless, el factor de intercambio Ras; y Myt1, un inhibidor del cdc2, entre otros (Morten Frödin y Steen Gammeltoft). 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 151(1-2): 65-77). En ciertas realizaciones, la actividad de la p90S6K se evalúa usando estos sustratos y se monitoriza la fosforilación, por ejemplo en ensayos *in vitro*. Las RSKs son serina/treonina quinasas y se activan por la vía MAPK/ERK.

La fosforilación por RSK (p90S6K) de SOS1 (Son of Sevenless) en las serinas 1134 y 1161 crea un sitio de acoplamiento 14-3-3. Esta interacción de fosfo SOS1 y 14-3-3 regula negativamente la vía Ras-MAPK. La p90rsk también regula factores de transcripción incluyendo la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB); el receptor- α de estrógenos (ER α); I κ B α /NF- κ B; y c-Fos (Morten Frödin y Steen Gammeltoft *Supra*). Existen varias isoformas, variantes, de la quinasa S6 ribosómica (RSK) de 90 kDa, es decir, RSK1, RSK2, RSK3 y RSK 4 (las mutaciones de estas isoformas son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Lara et al. 'A review of the p90-RSK family members: Common functions and isoform specificity', *Cancer Research* 73(17) September 1, 2013, OF1-8). Las secuencias de la proteína humana p90S6K incluyen, por ejemplo, las que se encuentran en los números de Acceso de Genebank Q15418.2 (GI: 20178306); NP_066958.2 (GI: 19923570); NP_001305865.1 (GI: 974576789); NP_001305867.1 (GI: 974576791); NP_002944.2 (GI: 20149547); XP_005246023.1 (GI: 530361302). En ciertas realizaciones, el inhibidor de p90S6K inhibe directamente la p90S6K al unirse directamente a la p90S6K e inhibir su actividad de quinasa.

p70S6 quinasa (p70S6K) (no forma parte de la invención reivindicada)

La proteína ribosómica S6 quinasa beta-1 (S6K1), también conocida como p70S6 quinasa (p70S6K), en humanos está codificada por el gen RPS6KB1. Es una serina/treonina quinasa que actúa aguas abajo de la PIP3 y de la quinasa-1 dependiente de los fosfoinosítidos en la ruta de la quinasa PI3 (Chung J, Cramer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. (1994). "PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase". *Nature* 370 (6484): 71-75; Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J. (1992). "Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases." *Cell* 69 (7): 1227-1236). Se sabe que el mTOR fosforila p70S6K en la treonina 389 que tiene y se correlaciona con la inhibición de la autofagia en diversas situaciones. En ciertas realizaciones, los inhibidores de mTOR son los inhibidores de p70S6K. En realizaciones alternativas, el inhibidor de p70S6K inhibe directamente la p70S6K al unirse directamente a la p70S6K e inhibir su actividad de quinasa.

Los sustratos de p70S6K incluyen la proteína ribosómica S6 y otras. La fosforilación de S6 induce la síntesis de proteínas en el ribosoma. En ciertas realizaciones, la actividad de p70S6K se evalúa usando estos sustratos y se monitoriza la fosforilación, por ejemplo en ensayos *in vitro*. Las secuencias de proteínas humanas p70S6K incluyen, por ejemplo, las que se encuentran en los números de Acceso de Genebank NP_001258971.1; NP_001258972.1; NP_001258973.1; NP_001258989.1; NP_003152.1. Las secuencias de ARNm de referencia incluyen, por ejemplo, NM_001272042; NM_001272043; NM_001272044; NM_001272060; NM_003161.

Inhibidores de p90S6K y p70S6K (no forman parte de la invención reivindicada)

En la presente memoria se describen composiciones para su uso en métodos para tratar a un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, que comprenden una cantidad eficaz de un inhibidor de la S6 quinasa ribosómica, RSK (p90S6K), para disminuir la actividad de la p90S6K y disminuir la p53 activa en al menos una de las células CD34+, células eritroides o células diferenciadas eritroides en el individuo.

Se puede usar cualquier inhibidor de p90S6K. Algunos inhibidores conocidos de p90S6K incluyen, por ejemplo, los descritos en Shiliang Li et al. "Identification of Inhibitors against p90 Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) through Structure-Based Virtual Screening with the Inhibitor-Constrained Refined Homology Model" *J. Chem. Inf. Model.*, 2011, 51 (11), pp 2939-2947. En las siguientes patentes y publicaciones se describen ejemplos no limitativos de inhibidores: US7605241, PCT/US2006/000709. Muchos están disponibles comercialmente, por ejemplo, Kempferol, nombre químico: 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona; y BRD739, nombre químico: 1-[(2-feniletil)amino]-3H-nafto[1,2,3-de]quinolin-2,7-diona; PF 4708671, nombre químico: 2-[[4-(5-etilpirimidin-4-il)piperazin-1-il]metil]-5-(trifluorometil)-1H-benzo[d]imidazol y SL 0101-1 nombre químico: 3-[(3,4-di-O-acetil-6-desoxi- α -L-manopiranosil)oxi]-5,7-dihidro-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona, disponibles en Tocris Bioscience (Avonmouth, Bristol, BS11 9QD, Reino Unido); y un inhibidor de FMK RSK (específico para la p90 de RSK) tal como se describe en: TL Nguyen et al. "Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors" *Anticancer Agents Med. Chem.* 2008, 8(7), 710-716, y están disponibles, por ejemplo, en Axon Medchem BV, Groningen, Países Bajos.

El inhibidor de p90S6K es BI-D1870 (BI). El BI tiene la fórmula molecular (MF) C₁₈H₁₉FN₄O₂ y es un inhibidor potente y específico de cada una de las isoformas de la quinasa S6 ribosómica (RSK) p90 *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, inhibe RSK1, RSK2, RSK3 y RSK4 *in vitro* (valores de IC₅₀ 31 nM, 24 nM, 18 nM y 15 nM, respectivamente) (disponible en Axon Medchem BV, Groningen, Países Bajos). El BI-D1870 (BI) tiene la siguiente estructura:

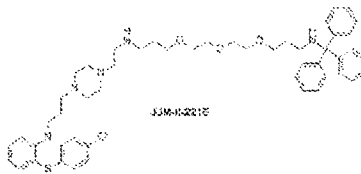
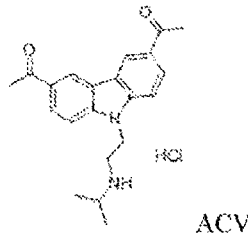
Las quinasas de punto de control (Chk) (por ejemplo, Chk1 y Chk2) son serina/treonina quinasas que participan en el control del ciclo celular. Son componentes esenciales para retrasar la progresión del ciclo celular en las células normales y dañadas y pueden actuar en los tres puntos de control del ciclo celular.

5 Tal como se usa en la presente memoria, "CCT" se refiere al diclorhidrato de CCT 241533, disponible en Tocris biosciences Supra. El CCT es un potente inhibidor de la Chk2 (IC50 = 3 nM). Muestra una selectividad >63 veces mayor para Chk1 que para Chk2 y un panel de otras 84 quinasas. El CCT inhibe la activación de Chk2 en respuesta al daño del ADN inducido por el etopósido en células HT29 y bloquea la apoptosis de los timocitos de ratón inducida por radiación ionizante.

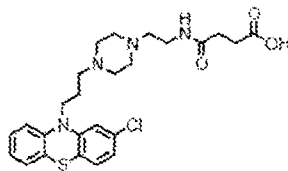
Compuestos de fenotiazina

10 Una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de la calmodulina para el individuo para disminuir la p53 activa en al menos una de las células CD34+, células eritroides o células diferenciadas eritroides en el individuo, en donde el inhibidor de la calmodulina es un compuesto de fenotiazina, en donde el compuesto de fenotiazina se selecciona entre el grupo que consiste en ACV-1-235 (ACV); JJM-II-221E (221E); y DB1026 (PerSuCC), que tienen las siguientes estructuras:

15



221E

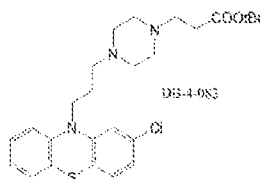


20 PerSucc

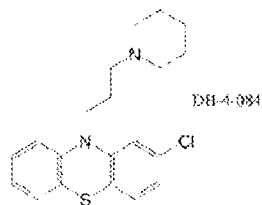
Una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor de la calmodulina para disminuir la p53 activa en al menos una de las células CD34+, células eritroides o células diferenciadas eritroides en el individuo, en donde el inhibidor de la calmodulina es un compuesto de fenotiazina, y en donde el compuesto de fenotiazina se selecciona entre el grupo que consiste en DB-4-083 (083); DB-4-084 (084); DB-4-088-2 (088-2); DB-4-088-3 (088-3); DB-4-086 (086); DB-4-087-2 (087-2); DB-4-087-3 (087-3); DB-4-089 (089), que tienen las siguiente estructuras:

25

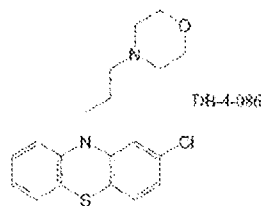
DB-4-083:



DB-4-084:

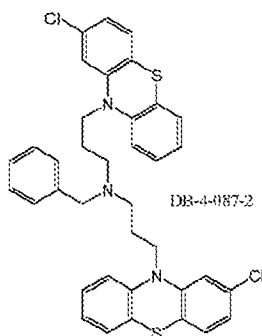


DB-4-086:

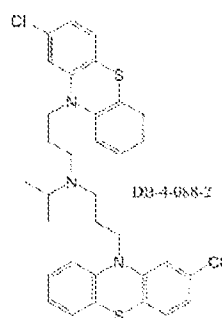


5

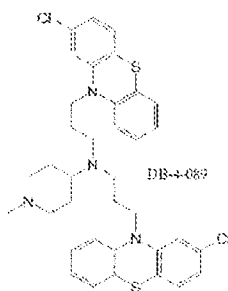
DB-4-087-2:



DB-4-088-2:

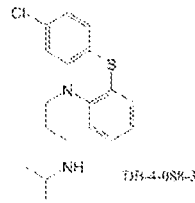


DB-4-089:

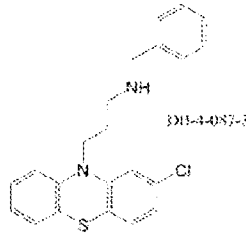


10

DB-4-088-3:

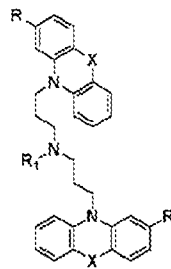


DB-4-087-3:



5

En ciertas realizaciones, el compuesto de fenotiazina para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA, es un compuesto de la Fórmula (I):



FÓRMULA (I)

10 en donde:

X es O o S;

R¹ es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclilo, heterocicilos, acilo, arilo, heteroarilo, alquilheteroarilo o alquilarilo;

cada R es independientemente H, halo, alquilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, CN, OH, NH₂, alquilamino, dialquilamino, CO₂H, acilo, SH, tioalcoxi, SO₂H o SO₃H; e

15 isómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En ciertas realizaciones, X es S en los compuestos de la Fórmula (I). En algunas otras realizaciones, X es O en los compuestos de la Fórmula (I).

20 El grupo R¹ en los compuestos de la Fórmula (I) se puede seleccionar entre el grupo que consiste en H, alquilo, ciclilo, heterocicilos, acilo, arilo, heteroarilo, alquilheteroarilo y alquilarilo. Opcionalmente, el alquilo, el ciclilo, los heterocicilos, el acilo, el arilo, el heteroarilo, el alquilheteroarilo y el alquilarilo del grupo R¹ pueden sustituirse con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes.

En algunas realizaciones, R¹ es un alquilo C₁-C₆. Los ejemplos de alquilos para el grupo R¹ incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, sec-butilo, isobutilo, pentilo y hexilo. En algunas realizaciones, R¹ es isopropilo.

25 En algunas otras realizaciones, R¹ es un alquilarilo opcionalmente sustituido, por ejemplo un alquilarilo C₁-C₆, que puede sustituirse opcionalmente. Los ejemplos de arilo para el alquilarilo del grupo R¹ incluyen alquilfenilo C₁-C₆. En algunas realizaciones, R¹ es bencilo.

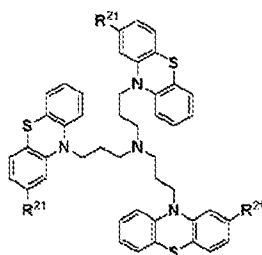
En otras realizaciones más, R^1 es un heterociclilo, opcionalmente sustituido con uno, dos, tres o cuatro sustituyentes. Los heterociclilos ejemplares para el grupo R^1 incluyen, pero no se limitan a, piperidinilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R^1 es 4-piperidinilo, opcionalmente sustituido en el átomo N. Por ejemplo, R^1 es N-metilpiperidin-4-ilo.

5 En compuestos de la Fórmula (I), los grupos R pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, halo, alquilo, haloalquilo, CN, OH, NH_2 , alquilamino, dialquilamino, CO_2H , acilo, SH, tioalcoxi, SO_2H y SO_3H . En algunas realizaciones, cada R es independientemente H, halo, alquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , OH, alcoxi C_1-C_6 , NH_2 , NO_2 , alquilamino C_1-C_6 , di(alquilo C_1-C_6)amino, CN o CO_2H .

10 En algunas otras realizaciones, cada R es independientemente H, Cl, F, Br, metilo, trifluorometilo, OH, NH_2 , NO_2 , CN o CO_2H .

En algunas realizaciones de los compuestos de la Fórmula (I), R^1 es alquilo, heterociclilo o alquilarilo, cada uno de los cuales puede sustituirse opcionalmente; y cada R es H, halo, alquilo o haloalquilo.

En algunas realizaciones, el compuesto de fenotiazina para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA, es un compuesto de la Fórmula II:



15

FÓRMULA (II)

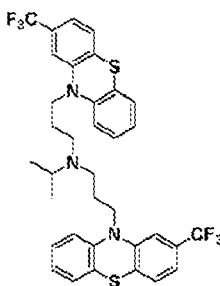
en donde:

cada R^{21} se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halo, alquilo, haloalquilo, CN, OH, NH_2 , alquilamino, dialquilamino, CO_2H , acilo, SH, tioalcoxi, SO_2H y SO_3H ;

20 isómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

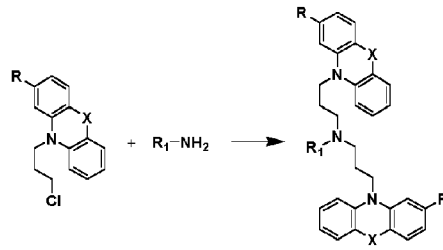
En compuestos de la Fórmula (II), todos los R^{21} pueden ser iguales, todos diferentes o dos iguales y uno diferente. En algunas realizaciones, cada R^{21} es independientemente H, halo, alquilo C_1-C_6 , haloalquilo C_1-C_6 , OH, alcoxi C_1-C_6 , NH_2 , NO_2 , alquilamino C_1-C_6 , di(alquilo C_1-C_6)amino, CN o CO_2H . Por ejemplo, cada R^{21} puede ser independientemente H, Cl, F, Br, metilo, trifluorometilo, OH, NH_2 , NO_2 , CN o CO_2H .

25 En una realización, el compuesto de fenotiazina para tratar trastornos ribosómicos y ribosomopatías, por ejemplo la DBA, es el compuesto de estructura:

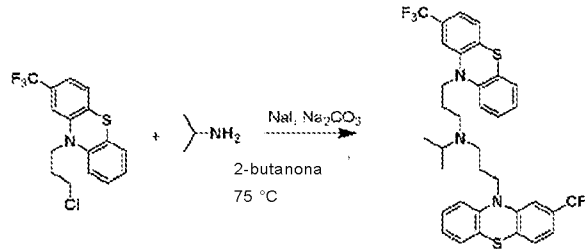


30

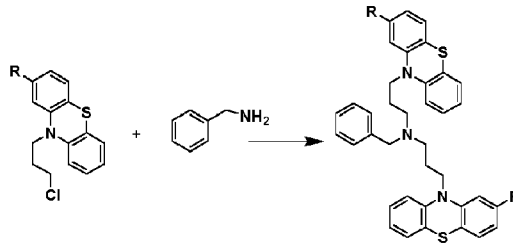
Los compuestos de las Fórmulas I y II se pueden sintetizar utilizando reacciones de acoplamiento bien conocidas en la técnica mediante la alquilación de una amina con la fenotiazina apropiada, tal como se muestra en los Esquemas 1-3.



ESQUEMA 1



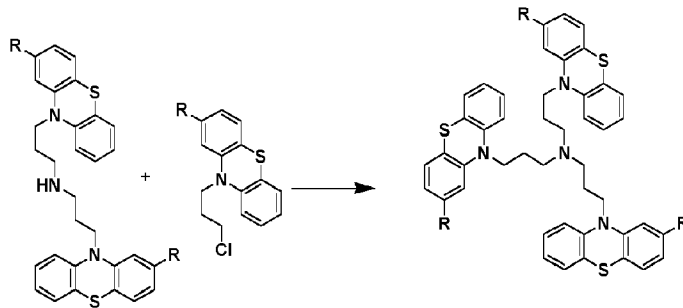
ESQUEMA 2



ESQUEMA 3

5

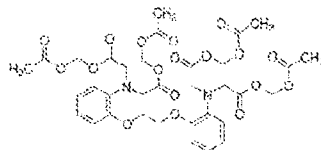
Los compuestos de la Fórmula II se pueden sintetizar mediante una aminoalquilación adicional del producto del Esquema 1 de la siguiente manera:



ESQUEMA 4

10

Una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, que comprende una cantidad eficaz del bloqueador de los canales de calcio BAPTA-AM para disminuir la p53 activa en al menos una de las células CD34+, en donde el BAPTA-AM tiene la siguiente estructura:



15 Inhibidores de ARNi de p90S6K y p70S6K y rbs6

5 Tal como se describe en la presente memoria, la inhibición de las proteínas rsk p90S6K y p70S6K y los inhibidores de rps6 pueden usarse en una composición para su uso en los métodos para el tratamiento de los trastornos de proteínas ribosómicas y la ribosomopatía. El inhibidor no es un compuesto de molécula pequeña, sino más bien un inhibidor de proteínas, y el inhibidor es cualquier ácido nucleico que inhiba la función de p90S6K y p70S6K o la expresión de p90S6K y p70S6K a partir de su gen. Un inhibidor de p90S6K y p70S6K es un agente silenciador de genes.

10 El p90S6K humano también se conoce con los alias; HU-1, MAPKAPK1A, RSK, RSK1, p90Rsk, la proteína ribosómica S6 quinasa de 90 kDa, la proteína quinasa activada por la 1MAP quinasa, la proteína quinasa activada por 1aMAPK 1aMAPKAP quinasa, está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos, cromosoma 1, NC_000001.11 (26529758..26575029). Una variante de la proteína ribosómica S6 quinasa A2 (RPS6KA2) de homo sapiens, es decir, la variante transcrita 1, es el ARNm Genbank NM_021135.5, que es la **SEQ ID N.º: 1** en la presente memoria, y tiene un aminoácido de la **SEQ ID N.º: 2**. La inhibición del gen p90S6K puede realizarse mediante el silenciamiento génico de las moléculas de ARNi según los métodos comúnmente conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, un gen que silencia los dúplex de oligonucleótidos de ARNsi dirigidos específicamente a la p90S6K humana puede usarse fácilmente para desactivar la expresión de p90S6K. El ARNm de p90S6K puede seleccionarse con éxito utilizando ARNsi; y los expertos en la materia pueden preparar fácilmente otras moléculas de ARNsi basándose en la secuencia conocida del ARNm diana. En consecuencia, para evitar cualquier duda, un experto en la materia puede diseñar inhibidores de ácidos nucleicos, tales como agentes de ARNi (silenciadores de ARN) para la secuencia de ácido nucleico **SEQ ID N.º: 1**, que es la siguiente:

ORIGEN

20

ES 2 992 231 T3

```

1 aggcgtggcg cgtggccggc gctgggtactc gcaggggagg cggagaagga ggcggagggg
61 gcgattgtgg ccccggccgc ggtggccggc gcggcctgcc ctttgtgacc gcagctcgcg
121 ccccacgccc cgcgcccatg gccgcctgfc cgggctcctt ggccacgctt gcccgccgcg
181 ggacctgagc cccgcgcctg ggatgccggg gatgctgctc ccccgccctt cgggctgctc
241 cgggctgggc gcggggcgat ggacctgagc atgaagaagt tcgccgtgcg caggttcttc
301 tctgtgtacc tgcgcaggaa gtcgcctcc aagagctcca gectgagccg gctcagggaa
361 gaaggcgtcg tgaaggagat agacatcagc catcatgtga aggaggcctt tgagaaggca
421 gatccttccc agtttgagct gctgaaggtt ttaggacaag gatcctatgg aaagtggttc
481 ctggtgagga aggtgaaggg gtccgacgct gggcagctct acgccatgaa ggtccttaag
541 aaagccaccc taaaagtctg ggaccgagtg agatcgaaga tggagagaga catcctggca
601 gaagtgaatc accccttcat tgtgaagctt cattatgcct ttcagacgga aggaaagctc
661 tacctgatcc tggacttcc gcggggaggg gacctcttca cccggctctc caaagaggtc
721 atgttcacgg aggaggatgt caagtctac ctggctgagc tggccttggc tttagaccat
781 ctccacagcc tggggatcat ctacagagat ctgaagcctg agaacatcct ctggatgaa
841 gaagggcaca ttaagatcac agatttcggc ctgagtaagg aggcattga ccacgacaag
901 agagcgtact ccttctgctg gacgatcgag tacatggcgc ccgagtggtt gaaccggcga
961 ggacacacgc agagtgccga ctgggtgctc ttcggcgtgc tcatgtttga gatgtccacg
1021 gggtccttgc cgttccaggg gaaggacagg aaggagacca tggctctcat cctcaaagcc
1081 aaagtgggga tgcgcagtt cctcagtgg gaggcacaga gtttgccttc cctctcttc
1141 aaacggaacc cctgcaaccg gctgggtgct ggcattgacg gagtggagga aattaagcgc
1201 catcccttct ttgtgaccat agactggaac acgctgtacc ggaaggagat caagccaccg
1261 ttcaaaccag cagtgggcag gcctgaggac accttccact ttgaccccca gttcacagcg
1321 cggacgccc cagactctcc tggcgtcccc ccgagtgcaa acgctcatca cctgtttaga
1381 ggattcagct ttgtggctc aagcctgata caggagccct cacagcaaaa tctgcacaaa
1441 gtcccagttc acccaatcgt gcagcagtta cacgggaaca acatccactt caccgatggc
1501 tacgagatca aggaggacat cgggggtggc tcctactcag tgtgcaagcg atgtgtgat
1561 aaagccacag acaccgagta tgccctgaag atcattgata agagcaagag agaccctcgc
1621 gaagagattg agatcctcct gcggtacggc cagcacccca acatcatcac cctcaaggat
1681 gtctatgatg atggcaagtt tgtgtacctg gtaatggagc tgatgctgg tggggagctc
1741 ctggaccgca tctccggca gagatacttc tcggagcgcg aagccagtga cgtcctgtgc
1801 accatcacca agaccatgga ctacctccat tcccaggggg ttgtcatcg agacctgaag
1861 ccgagtaaca tctgtacag ggatgagtcg gggagcccag aatccatccg agtctgcgac
1921 ttcggctttg ccaagcagct gcgcgcgggg aacgggctgc tcatgacacc ctgctacacg
1981 gccaatctcg tggccccgga ggtcctgaag cgtcaaggct atgatgcggc gtgtgacatc
2041 tggagtttgg ggatcctggt gtacaccatg ctggcaggat ttaccocctt tgcaaatggg
2101 ccagacgata cccctgagga gattctggcg cggatcggca gtgggaagta tgccctttct
2161 gggggaaact gggactcgat atctgacgca gctaaagacg tcgtgtccaa gatgtccac
2221 gtggaccctc atcagcgcct gacggcgatg caagtgtca aacaccctgt ggtgtcaac
2281 agagagtacc tgtccccaaa ccagctcagc cgacaggacg tgcacctggt gaaggcgcg
2341 atggccgcca cctactttgc tctaacaga acacctcagg ccccgggctt ggagcccgtg
2401 ctgtcatcca acctggetca gcgcagaggc atgaagagac tcacgtccac gcggctgtag
2461 cgggtgggac cctggcccca gcgtcccctg ccagcatcct cgtgggctca cagaccccgg
2521 cctcggagcc cgtctggcac ccagagtgac cacaagtcca gcaggaggc ggcgccgc
2581 ctgcctgtgt ccgtgtttt ttttccagc cgggagaggg tctgacctg gggcttctc
2641 caagcctcac tgcgccagcc tccccgccg ctctcttttc tcccagcga aaccaaatgc
2701 gcccttcaac ctgcctgccc cgtgcgagge cgggggcttc tttcagagcc cgcggctcct
2761 ctcatatcag gcttctggtt ctgcccagag atctgttttc caattatgaa gccggctcgt
2821 ttggtcagac tcccagacc cacgtcccag gtaccgggtg gaaagtggc agtgcgaggg
2881 cgcagccatt ggtggttgc gggcccaga gggctgggtt gacctggcat cccgggctc
2941 cccacgggct ggatgacggg gttggcactg tggcgtccag gaggagatgc ctggttctgc
3001 ccaaaataat ccaaaagacc gtttctctct cgccttccag ttttgcctg aggtgtctgg

```

3061 tagcccatcc tttcctctgt ccagattca aatgaggagt aagagcccag acgagagga
 3121 ggcaggctgg atctttgcct tgagagctcc gtgtcaccag gatggaaggg ggtgcctctc
 3181 ggaggagcct gtgtccacct ccagctctcg ctttccccgg ggggccaagc gcactgggct
 3241 gccgtctgtc cccagctccc gtggccacac agctatctgg aggetttgca gggagtcgtg
 3301 ggttctcgca cctgctcagc cctgtgtcgg ctctctgtgt gctcacctaa agctgtggtt
 3361 ttgctgtggt cacttcgatt tttctggtct gtggagaaac tgtgaattgg agaaatggag
 3421 ctctgtggct tcccacccaa accttctcag tccagctgga ggctggaggg agacacaggc
 3481 cccacccagc agactgaggg gcagaggcac aggtgggagg gcagcggaga tcagcgtgga
 3541 caggagcagat gcactttgta gatgctgtgg ctttgtgttg cgttttgtgt ctctgttgca
 3601 cagatctggt ttttcacact gatccgtatt ccctgggtg tgcacacagg gcgggtgtgg
 3661 ggcatttagg ccatgctgtg ctctacttca ttgagtaaaa tgcagtgaga ggttccgggc
 3721 agcaggatcg acgcccagtc cagccggcag agggaacaca cgggtccttc attgtcctgt
 3781 aagggtgttg aagatgctcc ctggcggccc ccaagcagac tagatgggag gaggcggccg
 3841 tcagcccctc accctgcac actgaagagc ggcgcctctg cagcaagcag ggcctcagga
 3901 ggtgcccgtt ggcacagcc aggttttccc taagaagatg ttattttggt gggtttgtt
 3961 cccctccat ctcgattctc gtacccaact aaaaaaaaaa aaataaagaa aaaatgtgct
 4021 gcgttctgaa aaataactcc tttagctgggt ctgattgttt tcagacctta aaatataaac
 4081 ttgtttcaca agctttaatc catgtggatt ttttttttct tagagaacca caaaacataa
 4141 aaggagcaag tcggactgaa tacctgtttc catagtgcc acagggtatt cctcacattt
 4201 tctccataga agatgctttt tcccaaggct agaacgactt ccaccatgat gaatttgctt
 4261 tttaggtctt aattatttca cttcttttta gaaacttagg aagaagtgga taatcctgag
 4321 gtcacacaat ctgtcctccc agaaatgaac aaaagtcac accttttctg cttgctacac
 4381 aggcaacgat tccccatca gctgcccgga cctttggcc tggcttgggt tgcaggcctg
 4441 tctgtttgct taaagtcaat gggttctggt gcagggagtg agaagtggg gaagtgaag
 4501 gaaagcagc cgtgagaaag cggccacggt tttcctcct tgtgtgccc gggggacca
 4561 gctcatggtc ttttccagtc atcccagtt gtacagactt agcttctgaa ctctaagaat
 4621 gccaaaggga ccgacgagac tccccatcac agcagactct gtccttacct gtatttgatg
 4681 tgcacacagc gaggagaaca ctggcttggc cctgctccgc tgagtgtctg taaaatacct
 4741 ctactttccc tcccatatcc agaacaaaat gatacttgac atccttccac aaaagtcaagc
 4801 ctaaagaagt tatggtatca tatgttaaac taagctttca aaaaccttag tgaatatgca
 4861 agtgactgct ttcaagcagc agtcgacatg taaatgaagg tgttcttaga attcgcattt
 4921 tgcagctca gcgcacctcc acaacgaatg aaatgctccg tatgatttgc acaaatgaca
 4981 tagacctccc caaaagttaa ctggctctcc ttcctcacac agttcatcat aacctaaccc
 5041 cccacccccg ggtcatgaaa atcacagaac ttataaacac attgaacctt agatctcagg
 5101 ctctctgacc taccgccagt ggccccttgc tggccaccct atagggctct ccttccctgg
 5161 cagcccccca tgtgggagaa atacctgatt ctcccactct gcagtgggag agctttgctg
 5221 aattccatcc caaagtcaaa catgggcaag aggtgaggat ttcactttta cctcaagtc
 5281 cgatttctct gtgattttaa actaactgtg tatgtattga tgtttgaa attglttgaa
 5341 ttttaaagtg ataatagtac ttaatgttat ccagatttgt tcattaaatg gtgttacct
 5401 aaagctgac ttgggatttt tacctaaccg tttactgatt ctctcaagca catggcaag
 5461 ttgatttgc actccgttca tttctgacac gttttgctgc ctctacctt tctaagcgtc
 5521 atgcaaatc gagaatggag aaggacgctg ccggctcctg agcgggtgtg agaggcgga
 5581 aggtggactc cagcgcagct tgaggggctg aggacggagg ctgcagcctc tgtctcgtt
 5641 tactgagcac gcttctctgc ctgcctcctg actcagact ttgttcactg gtcacagct
 5701 tatgtttaca catcattttt atgttctctg tttgtaattc atgtttgaga tgggtggcca
 5761 ctgtacagat atttattacg ctttccagac tttctgaata gattttttt aataaacatg

5821 gttttatgaa gtttaacttt tttctagcct aacatataaa aaaaaaaaaa * (SEQ ID N.º: 1)

La SEQ ID N.º: 1 codifica la siguiente secuencia de aminoácidos, es decir, la SEQ ID N.º: 2:

MDLSMKKFAVRRFFSVYLRRKRSRKSLSRLEEEGVVKEIDIS
 HHVKEGF EKADPSQFELLKVLGQGSYGKVFVLRKVKGSDAGQLYAMKVLKATLKVVD
 RVRSKMERDILAEVNHFFIVKLHYAFQTEGKLYLILDFLRGGDLFTRLSKEVMFTEED
 VKFYLAELALALDHLHSLGI TYRDLKPENILDEEGHIKITDFGLSKEAIDHDKRAYS
 FCGTIEYMAPEVNVNRRGHTQSADWWSFGVLMFEMLTGSLPFQCKDRKETMALILKAKL
 GMPQFLSGEAQSLLRALFKRNPENRNLGAGIDGVEEIKRHPFFVTIDWNTLYRKEIKPP
 FKPAVGRPEDTFHFDEFTARTPTDS PGVPPSANAHHLFRGFSFVASSLIQEPSQQDL

 HKVPVHPIVQQLHGNNIHFTDGYEIKEDI GVGSYSVCKRCVHKATDTEYAVKIIDKSK
 RDPSEEIEILLRYGQHPNII TLKDVYDDGKVFVYLVME LMRGELLDRILRQRYFSERE
 ASDVLCITTKTMDY LHSQGVVHRDLKPSNII LYRDESGSPESIRVCDFFGFAKQLRAGNG
 LLMTPCYTANFVAPEVLKRQGYDAACDIWSLGI LLYTMLAGFTPFANGPDDTPEEILA
 RIGSGKYALSGGNWDSISDAAKDVVSKMLHVDPHQRLTAMQVLKHPWVNVNREYLSPNQ
 LSRQDVHLVKGAMAATYFALNRTPQAPRLEPVLSSNLAQRGMKRLTSTRL

5

(SEQ ID N.º: 2)

La p70S6K humana también se conoce con los alias: p70 S6KA; p70 (S6K)-alfa; p70-alfa; p70-S6K; PS6K; S6K; S6K-beta-1; S6K1; STK14A; y RPS6KB1 y está codificada, por ejemplo, por la proteína ribosómica S6 quinasa B1 de Homo sapiens (RPS6KB1), variante de transcripción 1, Acceso ARNm: NM_001272060.1 GI: Secuencia de ácido nucleico 440546415 (SEQ ID N.º: 3), y tiene un aminoácido de (SEQ ID N.º: 4). La inhibición del gen de p70S6K puede

10

realizarse mediante el silenciamiento génico de moléculas de ARNi de acuerdo con métodos comúnmente conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, un gen que silencia dúplex de oligonucleótidos de ARNsi dirigidos específicamente a la p70S6K humano puede usarse fácilmente para desactivar la expresión de p70S6K. El ARNm de p70S6K puede seleccionarse con éxito utilizando ARNsi; y los expertos en la materia pueden preparar fácilmente otras moléculas de ARNsi basándose en la secuencia conocida del ARNm diana. En consecuencia, para evitar cualquier duda, un experto en la materia puede diseñar inhibidores de ácidos nucleicos, tales como agentes de ARNi (silenciadores de ARN) para la secuencia de ácido nucleico de NM_001272060, que es la siguiente:

5

```

1 gtttggtctc acggaacct gtacgcatgc tctacgctg aacttttagga gccagtctaa
61 ggcctaggcg cagacgcact gaggcctaagc agccgggtgat ggcggcagcg gctgtggtgg
121 ctgcgggcggg tccgggcccc tgagggcagc aaggaggcgg gacggccttt acccagcccc
181 ggacttccga gacaggggaag ctgaggacat ggcaggagtg tttgacatag acctggacca
241 gccagaggac gcgggctctg aggatgagct ggaggagggg ggtcagttaa atgaaagcat
301 ggaccatggg ggagttggac catatgaact tggcatggaa cattgtgaga aatttgaat
361 ctcagaaact agtgtgaaca gaggggccaga aaaaatcaga ccagaatgtt ttgagctact
421 tcgggtactt ggtaaagggg gctatggaaa ggtttttcaa gtacgaaaag taacaggagc
481 aaatactggg aaaatatttg ccatgaagggt gcttaaaaag gcaatgatag taagaaatgc
541 taaagataca gctcatacaa aagcagaacg gaatattctg gaggaagtaa agcatccctt
601 catcgtggat ttaatttatg cctttcagac tgggtgaaaa ctctacctca tccttgagta
661 tctcagtgga ggagaactat ttatgcagtt agaaagagag ggaatattta tggaaagacac
721 tgctctgctt tacttggcag aaatctccat ggctttgggg catttacatc aaaaggggat
781 catctacaga gacctgaagc cggagaatat catgcttaat caccaaggtc atgtgaaact
841 aacagacttt ggactatgca aagaatctat tcatgatgga acagtccacac acacattttg
901 tggacaata gaatacatgg cccctgaaat cttgatgaga agtggccaca atcgtgctgt
961 ggattggtgg agtttgggag cattaatgta tgacatgctg actggagcac cccattcac
1021 tgggggagaat agaaagaaaa caattgacaa aatcctcaaa tgtaaaactca atttgctcc
1081 ctacctcaca caagaagcca gagatctgct taaaaagctg ctgaaaagaa atgctgcttc
1141 tcgtctggga gctggtctctg gggacgctgg agaagttcaa gctcatccat tctttagaca
1201 cattaactgg gaagaacttc tggctcgaaa ggtggagccc ccctttaaac ctctgttgca
1261 atctgaagag gatgtaagtc agtttgatc caagtttaca cgtcagacac ctgtcgacag
1321 ccagatgac tcaactctca gtgaaagtgc caatcaggtc tttctgggtt ttacatatgt
1381 ggctccatct gtacttgaaa gtgtgaaaga aaagttttcc tttgaaccaa aaatccgatc
1441 acctcgaaga tttattggca gccacgaac acctgtcagc ccagtcaaat tttctcctgg
1501 ggattttctgg ggaagaggtg cttcggccag cacagcaaat cctcagacac ctgtggaata
1561 cccaatggaa acaagtggca tagagcagat ggatgtgaca atgagtgggg aagcatcggc
1621 accacttcca atacgacagc cgaactctgg gccatacaaa aaacaagctt ttcccatgat
1681 ctccaaacgg ccagagcacc tgcgtatgaa tctatgacag agcaatgctt ttaatgaatt
    
```

ES 2 992 231 T3

1741 taaggcaaaa aaggtggaga gggagatgty tgagcatcct gcaaggtgaa acgactcaaa
1801 atgacagttt cagagagtca atgtcattac atagaacact tcagacacag gaaaaataaa
1861 cgtggatttt aaaaaatcaa tcaatggtgc aaaaaaaaaac ttaaagcaaa atagtattgc
1921 tgaactctta ggacacatcaa ttaattgatt cctcgcgaca tcttctcaac cttatcaagg
1981 attttcatgt tgatgactcg aaactgacag tattaagggt aggatgtgc ttctgaatca
2041 ctgttgagtt ctgatttgtt tgaagaaggg ttatcctttc attaggcaaa gtacaaaatt
2101 gcctataata cttgcaacta aggacaaatt agcatgcaag cttggtcaaa cttttccag
2161 caaaatggaa gcaaaagacaa aagaaactta ccaattgatg ttttacgtgc aaacaacctg
2221 aatccttttt ttatataaat atataatttt caaatagatt tttgattcag ctcattatga
2281 aaaacatccc aaactttaaa atgcgaaatt attggttggt gtgaagaaag ccagacaact
2341 tctgtttctt ctcttgggtga aataataaaa tgcaaatgaa tcattgttaa ccacagctgt
2401 ggctcgtttg agggattggg gtggacctgg ggtttatttt cagtaacca gctgcaatc
2461 ctgtctgtaa tatgagaaaa aaaaaatgaa tctatttaat catttctact tgcagtactg
2521 ctatgtgcta agcttaactg gaagccttgg aatgggcata agttgtatgt cctacatttc
2581 atcattgtcc cgggcctgca ttgcaactgga aaaaaaaaaatc gccacctggt cttacaccag
2641 tatttggttc aagacaccaa atgtcttcag cccatggctg aagaacaaca gaagagagtc
2701 aggataaaaa atacatactg tggctcgcaa ggtgaggag atagggatat ccaggggag
2761 aggggtgttg tgtggcccac tctctgtcta atctctttac agcaaatgg taagattttc
2821 agttttactt ctttctactg tttctgctgt ctaccttct tatanatttt tcccaacag
2881 ttttaaaaag aaaaaaggt ctattttttt ttctcctata cttgggtac atttttgat
2941 tgtaaaaata tttgatggcc tttgatgaa tgtcttcac agtaaagaaa acttagtggc
3001 ttaatttagg aaacatgtta acaggacact atgtttttga aattgtaaca aaatctacat
3061 aaatgattta caggttaaaa gaataaaaaa aaaggtaact ttacctttc taaatatttc
3121 ctgccttaaa gagagcattt ccatgacttt agctgggtgaa aggttttaat atctgcagag
3181 ctttataaaa atataattca gtgcatactg gtataataga tgatcatgca gttgcagttg
3241 agttgtatca cttttttgt ttgtctttta taatgtcttc agtctgagtg tgcaaatgca
3301 atttgtaata ttttgcaacc ctaggatttt tttaaataga tgcctgttgc tatgttttca
3361 aacctttttg agccatagga tccaagccat aaaattcttt atgcatggtt aattcagtc
3421 gaaaagagca aggcctttgct ttttgaaatt gcaactcaaa tgagatggga tgaaatccta
3481 tgacagtaag caaaaacaga accatgaaaa atgattggac atacacctt tcaattgtgg
3541 caataattga aagaatcgat aaaagttcat ctttgacag aaagccttta aaaaaaaat
3601 cactccctct tccccctcct cccttattgc agcagcctac tgagaacttt gactgtgtct
3661 ggtaaattag aagctacaat aataattaag ggcagaaatt atacttaaa agtgcagatc
3721 cttgttcttt gacaatttgt gatgtctgaa ataacagAAC cgaagAAC gttgtgat
3781 gtacagggcat tatttcagac tgtaaatggc ttgtgatact cttgatactt gttttcaaat
3841 atgtttacta actgtagtgt tgactgcctg accaaattcc agtgaactt atacacaaa
3901 atattcttcc taggtcctat ttgctagtaa catgagcact gtgattggct ggctataacc
3961 acccagttt aaccattttc ataattagta gtgcccagca tagtggcaaa cactgcaact
4021 tttctgcata aaaaacatta attgcacagc taccatccac acaaatatc agttttctg
4081 acttcacatt tattaagtga aatttatctt ccatgctgtg gaaagtttat tgagaacttg
4141 tttcataaat ggatatccct actatgactg tgaaaacatg tcaagtgtca cattagtgtc
4201 acagacagaa agcacacacc tatgcaatat ggcttatcta tatttatttg taaaaatcca
4261 agcatagttt aaaatatgat gtcgatatta ctagtcttga gtttctaaga ggttctttta
4321 tgttatacca ggtaagtgtt taaaagagat taagtgcctt tttttcatca cttgattatt
4381 ttcttttaaa tcagctatta caggatattt ttttatttta tacatgctgt tttttaatta
4441 aaatataatc actgaagttt actaatttga ttttataagg tttgtagcat tacagaataa
4501 ctaaactggg atttataaac cagctgtgat taacaatgta aagtattaat tattgaactt
4561 tgaaccagat ttttaggaaa attatgttct ttttccccct ttatggtcct aactaatttg
4621 aatccttcaa gaaggatttt tccatactat tttttaagat agaagataat ttgtgggcag
4681 ggtggagga tgcatgtatg atactccata aattcaacat tctttactat aggtaatgaa
4741 tgattataaa caagatgcat cttagatagt attaatatac tgagccttgg attatatatt
4801 taatatagga cctattttga atattcagtt aatcataagg ttcttagctt acaagggcta
4861 gatctaagat tattcccatg agaaatgttg aatttatgaa gaatagattt taaggctttg
4921 aaaatgggta atttctcaaa aacatcaatg tccaaacatc tacctttttt cataggagta
4981 gacactagca agctggacaa actatcacaa aagtatttgt cacacataac ctgtgtctg
5041 ttgctgatta atacagtact ttttcttgtg tgattcttaa cattatagca caagtattat
5101 ctcagtggat tatccggaat aacatctgaa agatgggttc atctatgttt gtgtttgctc

5161 tttaaactat tgtttctcct atcccagtt cgctttgcat ctatcagtaa ataaaattct
5221 tcagctgcct tattaggagt gctatgagg taacacctgt tctgcttttc atctgtatt
5281 tagttgactg tattatttga tttcggattg aatgaatgta aatagaaatt aaatgcaaat

5341 tggatgac ataaaaaaaaa aaaaaaa (SEQ ID N.º: 3)

La **SEQ ID N.º: 3** codifica la **SEQ ID N.º: 4**, que es la siguiente:

```
MAGVFDIDLQPEDAGSEDELEEGGQLNESMDHGGVGPYELGME
HCEKFEISETSVNRGPEKIRPECFELLRVLGKGGYGKVFQVRKVTGANTGKI FAMKVL
KKAMIVRNAKDTAHTKAERNILEEVKHPFIVDLIYAFQTGGKLYLILEYLSGGELFMQ
LEREGIFMEDTACFYLAETSMALGHLHQKGI IYRDLKPENIMLNHQGHVKLTDGFLCK
ESIHDGTVTHTFCGTIEYMAPEIILMRSGHNRAVDWWSLGALMYDMLTGAPPFTGENRK
KTIDKILKCKLNLPPYLTQEARDLLKLLKRNAAASRLGAGPGDAGEVQAHPPFRHINW
EELLARKVEPPFKPLLQSEEDVSQFDSKFTRQTPVDSDDSTLSEANQVFLGFTYVA
PSVLESVKEKFSFEPKIRSPRRFISGPRTPVSPVKFSPGDFWGRGASASTANPQTPVE
YPMETSGIEQMDVMTMSGEASAPLPIRQPNSGPYKKQAFPMISKRPEHLRMNL
```

(SEQ ID N.º: 04).

- 5 Se inhibe la Rps6. La inhibición del gen de RPS6 puede realizarse mediante el silenciamiento génico de moléculas de ARNi de acuerdo con métodos comúnmente conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, un gen que silencia dúplex de oligonucleótidos de ARNsi dirigido específicamente a la rps6 humana (GenBank N.º: NM_001010.2) se puede usar fácilmente para desactivar la expresión de rps6. El ARNm de rps6 puede seleccionarse con éxito como diana utilizando ARNsi; y los expertos en la materia pueden preparar fácilmente otras moléculas de ARNsi basándose en la secuencia conocida del ARNm diana. En consecuencia, para evitar cualquier duda, un experto en la materia
- 10 puede diseñar inhibidores de ácidos nucleicos, tales como agentes de ARNi (silenciadores de ARN) para la secuencia de ácido nucleico **SEQ ID N.º: 5**, que es la siguiente:

```
l cctctttcc gtagcgcctc ggaggcgttc agctgcttca agatgaaget gaacatctcc
61 ttcccagcca ctggctgcca gaaactcatt gaagtggacg atgaacgcaa acttcgtact
121 ttctatgaga agcgtatgce cacagaagtt gctgctgacg ctctgggtga agaattggaag
181 ggitatgtgg tccgaatcag tggtaggaac gacaaacaag gtttcccat gaagcagggt
241 gtcttgacc atgcccgtgt ccgctgcta ctgagtaag ggcaatctcg ttacagacca
301 aggagaactg gaganagaaa gaganaatca gitcgtggtt gcaattgiga tcaaatctg
361 agcgttctca actlgtgtat tglaaaaaaaa ggagagaagg atattctctgg actgactgat
421 actacagtgc ctgcccgcct ggcccacaaa agagctagca gaatccgcaa actitcaat
481 ctctctaaag aagatgatgt ccgccagtat gttgtaagaa agccctlaaa taagaagggt
541 aagaaacta ggaccaaaag acccaagatt cagcgtcttg ttactccacg tctctctgag
601 cacaaacggc ggcgtatgce tctgaagaag cagcgtacca agaaaaataa agaaggagct
661 gcagaatatg ctaaacitft ggccaagaga atgaaggagg ctaaggagaa gcccaggaa
721 caaattgcga agagacgcag actttctct ctgagagct ctacttctaa gcttgaatcc
```

781 agtcagaaat aagattttt gagtaacaaa taataagat cagactctg (SEQ ID N.º: 5).

Se pueden seleccionar como diana otras variantes de estas secuencias de ácido nucleico ejemplificadas.

- 15 Un inhibidor de p90S6K y p70S6K, o rps6, puede ser cualquier agente que inhiba la función de p90S6K y p70S6K, tal como anticuerpos, moléculas de ARNi silenciadoras de genes y similares. Los anticuerpos neutralizantes comerciales y los fragmentos de anticuerpos contra p90S6K, p70S6K y rps6 están incluidos para su uso en la presente memoria.

- 20 Un experto en la materia puede probar si un determinado compuesto actúa como un inhibidor de p90S6K y p70S6K. Los sistemas de ensayo para determinar la actividad de p90S6K y p70S6K de ciertos compuestos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichos sistemas de ensayo se describen en Roux et al. 'Phosphorylation of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase Docking and RSK Activity' Mol Cell Biol. julio de 2003; 23 (14): 4796-4804; y Sapkota et al. 'BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms *in vitro* and *in vivo*' Biochem J. 1 de enero de 2007; 401(Pt 1): 29-38. Véase también Masuda-Robens et al. 'Assays for monitoring p70 S6 kinase and RSK activation'. Methods Enzymol. 2001;333:45-55. También existen ensayos comerciales disponibles en la técnica, por ejemplo, el kit de actividad de p70 S6K - ADI-EKS-470 - Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY); y el Kit de Actividad de p70 S6K (ab139438) de Abcam (Cambridge, MA).

- 25 Además, como se describe en la presente memoria, la capacidad de rescatar al menos uno de los defectos morfológicos, hematopoyéticos o endoteliales en el embrión de pez cebra Rps29 -/- y/o prevenir la función de p53 y la acumulación nuclear en la línea celular de cáncer de pulmón A549 que tienen RPS 19 desactivada por ARNsi, o reducir los niveles de p21 o aumentar los marcadores eritroides en las células CD34+ que tienen RPS 19 desactivada por ARNsi es un medio para monitorizar la actividad de los inhibidores de p90S6K y p70S6K.

- 35 Un experto en la materia puede evaluar el inhibidor de calmodulina específico descrito en la presente memoria (por ejemplo, los derivados de fenotiazina de la **Figura 24** o la **Figura 33**, o PerSucc, 221E o ACV de la **Figura 32**, o los compuestos de la Fórmula I y la Fórmula II utilizando ensayos bien conocidos en la técnica, por ejemplo la inhibición de la calmodulina puede determinarse, entre otras cosas, en el siguiente ensayo *in vitro*, que midió la activación dependiente de la calmodulina de la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK). La MLCK activada fosforila la cadena ligera de miosina de la molleja de pollo. Si se inhibe la calmodulina, se reduce la tasa de fosforilación de la cadena ligera de miosina. Para probar esto se lleva a cabo el siguiente experimento (según Itoh et al. Biochem. Pharm.

1986,35:217-220). La mezcla de reacción (0.2 ml) contiene Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), ATP [γ -³²P] 0.05 mM (1pCi/tubo de ensayo), MgCl₂ 5 mM, cadena ligera de miosina 10 μ M, calmodulina 24 nM y CaCl₂ 0.1 mM. La concentración de MLCK (actividad específica: 4.5 moles/min/mg) de la molleja de pollo es de 0.1 μ g/ml. La incubación se lleva a cabo a 30 °C durante 4 min. La reacción se termina mediante adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 20 %. A continuación se añaden 0.1 ml de albúmina sérica bovina (1 mg/ml) a la mezcla de reacción. La muestra se centrifuga luego durante 10 minutos, el sedimento se resuspende en ácido tricloroacético al 5 %. El sedimento final se disuelve en 2 ml de NaOH 1 N y la radiactividad se mide en un contador de centelleo líquido. La MLCK tratada con tripsina se puede preparar tal como se describe en Itoh et al. J Pharmacol. Exp. Ther. 1984,230, p737. La reacción se inicia mediante la adición del ATP y se lleva a cabo en presencia de los inhibidores potenciales o, como control, en presencia de su disolvente. En el ensayo arriba indicado se probarán diferentes concentraciones de los compuestos. La concentración del compuesto que da como resultado una disminución del 50 % de la actividad de quinasa será la concentración IC₅₀.

Un inhibidor de p90S6K y p70S6K, rps6, o los inhibidores de Chk2 e inhibidores de Cam específicos tal como se describen en la presente memoria pueden inhibir o disminuir la actividad de las RSK, rps6, Chk2 o Cam indicadas en al menos aproximadamente un 10 %, en relación con el nivel de actividad en ausencia de inhibidores, por ejemplo, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso un 100 %. En ciertas realizaciones, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden disminuir la expresión de la proteína respectiva en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso un 100 %, en comparación con la expresión en ausencia del inhibidor.

La expresión de p90S6K y p70S6K o Chk2 o Cam o rps6 incluye la cantidad del ARN respectivo transcrito de un gen, que codifica la proteína, y/o la cantidad de la cantidad de proteína que se obtiene mediante traducción del ARN transcrito de un gen. Por ejemplo, un inhibidor de p90S6K y p70S6K tal como se describe en la presente memoria puede inhibir la expresión de p90S6K, p70S6K, Chk2 o Cam o rps6 en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso un 100 %, en comparación con un nivel de referencia en ausencia del inhibidor.

Además, la capacidad de un compuesto para inhibir p90S6K y p70S6K también se puede evaluar midiendo una disminución o una inhibición de la actividad de quinasa biológica en comparación con un control negativo, por ejemplo la condición experimental en ausencia de los inhibidores. Por consiguiente, un inhibidor de p90S6K y p70S6K tal como se describe en la presente memoria puede inhibir la actividad de quinasa biológica de p90S6K y p70S6K en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso un 100 %, en comparación con un nivel de referencia en ausencia del inhibidor.

La capacidad de los inhibidores para inhibir p90S6K o p70S6K, rps6 o Chk2, o Cam, se evalúa rescatando al menos uno de los defectos morfológicos, hematopoyéticos o endoteliales en el embrión de pez cebra Rps29 -/- y/o evitando la función de p53 y la acumulación nuclear en la línea celular de cáncer de pulmón A549 que tiene la RPS 19 desactivada por ARNsi, o reducir los niveles de p21 o aumentar los marcadores eritroides en las células CD34+ que tienen la RPS19 desactivada por ARNsi, tal como se demuestra en los Ejemplos de la presente memoria, en comparación con una afección de referencia sin tratamiento con dicho inhibidor.

Un experto en la materia puede determinar las dosis del inhibidor que han de ser administradas dependiendo de la gravedad clínica de la enfermedad, la edad y el peso del paciente, la exposición del paciente a afecciones que puedan precipitar brotes de psoriasis, y otros factores farmacocinéticos generalmente conocidos en la técnica, tales como el metabolismo hepático y renal. La interrelación de las dosis para animales de diversos tamaños y especies y para los seres humanos en función de los mg/m³ de área superficial se describe en E. J. Freireich et al., "Quantitative Comparison of Toxicity of Anticancer Agents in Mouse, Rat, Hamster, Dog, Monkey and Man," Cancer Chemother. Rep. 50: 219-244 (1966). Se pueden realizar ajustes en el régimen de dosificación para optimizar la respuesta terapéutica. Las dosis se pueden dividir y administrar diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según la situación terapéutica.

Normalmente, estos fármacos se administrarán por vía oral y se pueden administrar en forma de píldora o líquido convencional. Si se administran en forma de píldora, se pueden administrar en formulaciones convencionales con excipientes, cargas, conservantes y otros ingredientes típicos usados en formaciones farmacéuticas en forma de píldora. Normalmente, los fármacos se administran en una formulación convencional farmacéuticamente aceptable, normalmente incluyendo un vehículo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales conocidos en la

técnica pueden incluir alcoholes, por ejemplo alcohol etílico, proteínas séricas, albúmina sérica humana, liposomas, tampones tales como fosfatos, agua, solución salina estéril u otras sales, electrolitos, glicerol, hidroximetilcelulosa, propilenglicol, polietilenglicol, polioxietilensorbitán, otros agentes tensioactivos, aceites vegetales y agentes antibacterianos o antifúngicos convencionales, tales como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. Un vehículo farmacéuticamente aceptable dentro del alcance de la presente invención cumple con los estándares industriales en cuanto a esterilidad, isotonicidad, estabilidad y no pirogenicidad.

La formulación farmacéuticamente aceptable también puede estar en forma de píldora, comprimido o pastilla, tal como se conoce en la técnica, y puede incluir excipientes u otros ingredientes para una mayor estabilidad o aceptabilidad. Para los comprimidos, los excipientes pueden ser diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco, junto con el inhibidor descrito en la presente memoria y otros ingredientes.

Los fármacos también se pueden administrar en forma líquida en formulaciones convencionales, que pueden incluir conservantes, estabilizantes, colorantes, saborizantes y otros ingredientes farmacéuticos generalmente aceptados. Normalmente, cuando los fármacos se administran en forma líquida, estarán en solución acuosa. La solución acuosa puede contener tampones y puede contener alcoholes tales como alcohol etílico u otros compuestos farmacéuticamente tolerados.

Alternativamente, los fármacos se pueden administrar mediante inyección por una de varias vías bien conocidas en la técnica. Sin embargo, generalmente se prefiere administrar los fármacos por vía oral.

Los fármacos se pueden administrar desde una vez al día hasta al menos cinco veces al día, dependiendo de la gravedad de la enfermedad, la dosis total que ha de ser administrada y el criterio del médico tratante. En algunos casos no es necesario administrar los fármacos a diario, sino que se pueden administrar cada dos días, cada tres días o según otros programas similares. Sin embargo, generalmente se prefiere administrar los fármacos a diario.

Tal como se usa en la presente memoria, un "profármaco" se refiere a un compuesto que se puede convertir mediante algún proceso químico o fisiológico (por ejemplo, procesos enzimáticos e hidrólisis metabólica) en un inhibidor funcionalmente activo (por ejemplo, inhibidores de rps6; inhibidores de p90S6K o p70S6K; o inhibidores SL de RSk p90, o B1; inhibidor PF de p70s6K; inhibidor de Cam, TF y FLU; quelante de Ca²⁺ BABTA; inhibidores chk2 de CCT y III, y los inhibidores PerSuc, 221E y ACV; o, por ejemplo, los inhibidores de la Figura 33, o los compuestos de la Fórmula I o la Fórmula II.

Por lo tanto, el término "profármaco" también se refiere a un precursor de un compuesto biológicamente activo que es farmacéuticamente aceptable. Un profármaco puede ser inactivo cuando se administra a un individuo, es decir, un éster, pero convertirse *in vivo* en un compuesto activo, por ejemplo, mediante hidrólisis en el ácido carboxílico libre o el hidroxilo libre. El compuesto profármaco a menudo ofrece ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo. El término "profármaco" también pretende incluir cualquier vehículo unido covalentemente que libere el compuesto activo *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un individuo. Los profármacos de un compuesto activo se pueden preparar modificando grupos funcionales presentes en el compuesto activo de tal modo que las modificaciones se escindan, ya sea en manipulación rutinaria o *in vivo*, en el compuesto activo precursor. Los profármacos incluyen compuestos en los que un grupo hidroxilo, amino o mercapto está unido a cualquier grupo que, cuando el profármaco del compuesto activo se administra a un individuo, se escinde para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre o mercapto libre, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados acetato, formiato y benzoato de un alcohol o derivados acetamida, formamida y benzamida de un grupo funcional amina en el compuesto activo, y similares. Véase Harper, "Drug Latentiation" in Jucker, ed. Progress in Drug Research 4:221-294 (1962); Morozowich et al., "Application of Physical Organic Principles to Prodrug Design" in E. B. Roche ed. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs, APHA Acad. Pharm. Sci. 40 (1977); Bioreversible Carriers in Drug Design, Theory and Application, E. B. Roche, ed., APHA Acad. Pharm. Sci. (1987); Design of Prodrugs, H. Bundgaard, Elsevier (1985); Wang et al. "Prodrug approaches to the improved delivery of peptide drug" in Curr. Pharm. Design. 5(4):265-287 (1999); Pauletti et al. (1997) Improvement in peptide bioavailability: Peptidomimetics and Prodrug Strategies, Adv. Drug. Delivery Rev. 27:235-256; Mizen et al. (1998) "The Use of Esters as Prodrugs for Oral Delivery of (3-Lactam antibiotics," Pharm. Biotech. II, 345-365; Gagnault et al. (1996) "Designing Prodrugs and Bioprecursors I. Carrier Prodrugs," Pract. Med. Chem. 671-696; Asgharnejad, "Improving Oral Drug Transport", en Transport Processes in Pharmaceutical Systems, G. L. Amidon, P. I. Lee y E. M. Topp, Eds., Marcell Dekker, p. 185-218 (2000); Balant et al., "Prodrugs for the improvement of drug absorption via different routes of administration", Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin., 15(2): 143-53 (1990); Balimane y Sinko, "Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues", Adv. Drug Delivery Rev., 39(1-3): 183-209 (1999); Browne, "Fosphenytoin (Cerebyx)", Clin. Neuropharmacol. 20(1): 1-12 (1997); Bundgaard, "Bioreversible derivatization of drugs- principle and applicability to improve the therapeutic effects of drugs", Arch. Pharm. Chemi 86(1): 1-39 (1979); Bundgaard H. "Improved drug delivery by the prodrug approach", Controlled Drug Delivery 17: 179-96 (1987); Bundgaard H. "Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs", Arfv. Drug Delivery Rev. 8(1): 1-38 (1992); Fleisher et al. "Improved oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs", Arfv. Drug Delivery Rev. 19(2): 115-130 (1996); Fleisher et al. "Design of prodrugs for improved gastrointestinal absorption by intestinal enzyme targeting", Methods Enzymol. 112 (Drug Enzyme Targeting, Pt. A):

360-81, (1985); Farquhar D, et al., "Biologically Reversible Phosphate-Protective Groups", Pharm. Sci., 72(3): 324-325 (1983); Freeman S, et al., "Bioreversible Protection for the Phospho Group: Chemical Stability and Bioactivation of Di(4-acetoxy-benzyl) Methylphosphonate with Carboxyesterase," Chem. Soc., Chem. Commun., 875-877 (1991); Friis y Bundgaard, "Prodrugs of phosphates and phosphonates: Novel lipophilic alphaacyloxyalkyl ester derivatives of phosphate- or phosphonate containing drugs masking the negative charges of these groups", Eur. J. Pharm. Sci. 4: 49-59 (1996); Gangwar et al., "Pro-drug, molecular structure and percutaneous delivery", Des. Biopharm. Prop. Prodrugs Analogs, [Symp.] Fecha de Reunión 1976, 409-21. (1977); Nathwani y Wood, "Penicillins: a current review of their clinical pharmacology and therapeutic use", Drugs 45(6): 866-94 (1993); Sinhababu y Thakker, "Prodrugs of anticancer agents", Adv. Drug Delivery Rev. 19(2): 241-273 (1996); Stella et al., "Prodrugs. Do they have advantages in clinical practice?", Drugs 29(5): 455-73 (1985); Tan et al. "Development and optimization of anti-HIV nucleoside analogs and prodrugs: A review of their cellular pharmacology, structure-activity relationships and pharmacokinetics", Adv. Drug Delivery Rev. 39(1-3): 117-151 (1999); Taylor, "Improved passive oral drug delivery via prodrugs", Adv. Drug Delivery Rev., 19(2): 131-148 (1996); Valentino y Borchardt, "Prodrug strategies to enhance the intestinal absorption of peptides", Drug Discovery Today 2(4): 148-155 (1997); Wiebe y Knaus, "Concepts for the design of anti-HIV nucleoside prodrugs for treating cephalic HIV infection", Adv. Drug Delivery Rev.: 39(1-3):63-80 (1999); Waller et al., "Prodrugs", Br. J. Clin. Pharmac. 28: 497-507 (1989).

Los inhibidores descritos en la presente memoria también incluyen sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los inhibidores tal como se describen en la presente memoria, por ejemplo de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Estas sales se pueden preparar *in situ* en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o haciendo reaccionar por separado un inhibidor en su forma de base o ácido libre con un ácido o base orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada durante la purificación posterior. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isotiónico, y similares. Véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19 (1977).

En algunas realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, succinato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares.

Tratamiento de trastornos ribosómicos y ribosomopatías

En algunas realizaciones, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar diversas enfermedades y trastornos asociados con proteínas ribosómicas o ribosomopatías. Por ejemplo, los inhibidores se pueden usar para tratar a un individuo que tiene una mutación en una o más proteínas ribosómicas, o que tiene un nivel reducido de la proteína ribosómica.

En algunas realizaciones, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden usarse en una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico tal como la Anemia de Diamond-Blackfan (DBA). Existe una variedad de tipos de anemia de Diamond-Blackfan, por ejemplo cuando el individuo tiene DBA1, DBA2, DBA3, DBA4, DBA5, DBA6, DBA7 o DBA8. La anemia de Diamond-Blackfan (DBA), también conocida como anemia de Blackfan-Diamond y eritroblastopenia hereditaria, es una aplasia eritroide congénita que generalmente se presenta en la infancia. Los pacientes con DBA tienen recuentos bajos de glóbulos rojos (anemia). El resto de sus células sanguíneas (las plaquetas y los glóbulos blancos) son normales. Esto contrasta con el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond, en el que el defecto de la médula ósea produce principalmente neutropenia, y la anemia de Fanconi, en la que todas las líneas celulares se ven afectadas y provocan pancitopenia. También se pueden producir diversas otras anomalías congénitas. La anemia de Diamond-Blackfan se caracteriza por una anemia (recuento bajo de glóbulos rojos) con una disminución de los progenitores eritroides en la médula ósea. Por lo general, esto se desarrolla durante el período neonatal. Alrededor del 47 % de las personas afectadas también tienen una variedad de anomalías congénitas, incluyendo malformaciones craneofaciales, anomalías del pulgar o de las extremidades superiores, defectos cardíacos, malformaciones urogenitales y fisura del paladar. A veces se observa bajo peso al nacer y retraso generalizado en el crecimiento. Los pacientes con DBA tienen un riesgo moderado de desarrollar leucemia y otras neoplasias malignas.

Por lo general, el diagnóstico de DBA se realiza mediante un hemograma y una biopsia de médula ósea. El diagnóstico de DBA se basa en la anemia, los recuentos bajos de reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros) y la disminución de los precursores eritroides en la médula ósea. Las características que respaldan el diagnóstico de DBA incluyen la presencia de anomalías congénitas, macrocitosis, niveles elevados de hemoglobina fetal y niveles elevados de adenosina desaminasa en los glóbulos rojos. La mayoría de los pacientes son diagnosticados en los dos primeros años de vida. Sin embargo, algunas personas levemente afectadas solo reciben atención después de identificar a un familiar más gravemente afectado. Entre el 20 y el 25 % de los pacientes con DBA pueden identificarse mediante una prueba genética para detectar mutaciones en el gen RPS19. Aproximadamente del 10 al 25 % de los casos de DBA

tienen antecedentes familiares de enfermedad, y la mayoría de las genealogías sugieren un modo de herencia autosómico dominante.

5 Por consiguiente, en algunas realizaciones, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden usarse en una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene una mutación en la proteína ribosómica 19 (RPS 19). El fenotipo de los pacientes con DBA indica un defecto hematológico de las células madre que afecta específicamente a la población progenitora eritroide. La proteína RPS 19 participa en la producción de ribosomas. Las características de la enfermedad pueden estar relacionadas con la naturaleza de mutaciones de la RPS 19. La enfermedad se caracteriza por una herencia dominante y, por lo tanto, surge debido a una pérdida parcial de la función de la proteína RPS 19. I

10 En realizaciones alternativas, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden usarse en una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con una mutación en la proteína ribosómica de al menos una de, pero sin limitarse a, RPS7, RPS10, RPS19, RPS24, PRS26, RPS17, PRS27L RPS29. RPL35A, PRL5 y PPL11. Por ejemplo, una mutación o variante de la RPS19 provoca la DBA1 y una mutación o variante de la RPS24 provoca la DBA3, una mutación o variante de la RPS 17 provoca la DBA4, una mutación o variante de la RPS34A provoca la DBA5, una mutación o variante de la RPL5 provoca la DBA6, una mutación o variante de la RPL11 provoca la DBA7 y una mutación o variante de la RPS7 provoca la DBA8.

15 En algunas realizaciones, un individuo con un trastorno ribosómico tiene una mutación en una proteína ribosómica seleccionada entre el grupo que consiste en: rPL2A, rPL2B, rPL3, rPL4A, rPL4B, rPL7A, rPL7B, rPL 10, rPL11, rPL16A, rPL17A, rPL17B, rPL18A, rPL18B, Rp119A, rPL19, rPL25, rPL29, rPL31A, rPL31B, rPL36A, rPL40A, rPS1A, rPS6A, rPS6B, rPS14A, rPS15, rPS19, rPS23B, rPS25A, rPS26B, rPS29, rPS29B y rPS31.

20 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención se puede usar otro agente terapéutico para tratar el defecto de la proteína ribosómica, seleccionado entre el grupo que consiste en: corticosteroides, transfusiones de sangre y trasplantes de médula ósea. Los corticosteroides se pueden usar para tratar la anemia en la DBA. Las transfusiones de sangre también se pueden usar para tratar la anemia grave en la DBA. Se pueden producir períodos de remisión, durante los cuales no se requieren transfusiones ni tratamientos con esteroides. El trasplante de médula ósea (BMT) puede curar aspectos hematológicos de la DBA y pueden producirse efectos adversos en los pacientes con transfusión (Diamond Blackfan Anemia Foundation; Pospisilova D et al., (2007). "Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. ". Haematologica 92 (5): e66.)

25 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente invención, los inhibidores administrados al individuo aumentan el número de células eritroides CD71+ en el individuo y/o aumenta los niveles de hemoglobina en el individuo.

En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente divulgación, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar a un individuo con un trastorno ribosómico, tal como la DBA, que tiene un síntoma de anemia macrocítica y/o anomalías craneofaciales.

30 En otra realización, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede usarse en una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico tal como mielodisplasia, por ejemplo, pero sin limitarse a la mielodisplasia 5q. La mielodisplasia o síndromes mielodisplásicos (MDS, anteriormente conocidos como preleucemia) son un conjunto diverso de afecciones médicas hematológicas (relacionadas con la sangre) que implican la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas de la clase mielóide, y en las que la médula ósea no funciona normalmente y produce una cantidad insuficiente de células sanguíneas normales.

35 Los pacientes con MDS suelen desarrollar anemia grave y requieren transfusiones de sangre frecuentes. En la mayoría de los casos, la enfermedad empeora y el paciente desarrolla citopenias (recuentos sanguíneos bajos) causadas por una insuficiencia progresiva de la médula ósea. En aproximadamente un tercio de los pacientes con MDS, la enfermedad se transforma en leucemia mielógena aguda (AML), por lo general en cuestión de meses o unos pocos años.

Los síndromes mielodisplásicos son todos trastornos de las células madre de la médula ósea. En el MDS, la hematopoyesis (producción de sangre) es desordenada e ineficaz. La cantidad y la calidad de las células hematopoyéticas disminuyen irreversiblemente, lo que perjudica aún más la producción de sangre.

40 El MDS afecta la producción de cualquier tipo de células sanguíneas y, en ocasiones, de todos los tipos, incluyendo los glóbulos rojos, las plaquetas y los glóbulos blancos (citopenias). Alrededor del 50 por ciento de la mielodisplasia pediátrica se puede clasificar en cinco tipos de MDS: anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos de anillo, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, y leucemia mielomonocítica crónica. El 50 por ciento restante suele presentarse con citopenias aisladas o combinadas, como anemia, leucopenia y/o trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas). Aunque es crónica, la MDS progresa hasta convertirse en leucemia mielóide aguda (AML) en aproximadamente el 30 por ciento de los pacientes.

La edad media en el momento del diagnóstico de un MDS es de entre 60 y 75 años; algunos pacientes tienen menos de 50 años; los diagnósticos de MDS son poco frecuentes en los niños. Los hombres se ven afectados con un poco más de frecuencia que las mujeres. Los signos y síntomas no son específicos y, por lo general, relacionados con las citopenias sanguíneas incluyen, pero no se limitan a:

- 5 (a) Anemia (recuento bajo de glóbulos rojos o disminución de la hemoglobina): cansancio crónico, dificultad para respirar, sensación de escalofrío y, a veces, dolor en el pecho.
- (b) Neutropenia (recuento bajo de neutrófilos): aumento de la susceptibilidad a infecciones.
- (c) Trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas): aumento de la susceptibilidad a la hemorragia y la equimosis (hematomas), así como a hemorragias subcutáneas que provocan púrpura o petequias[5].

10 Muchas personas son asintomáticas y la citopenia sanguínea u otros problemas se identifican como parte de un hemograma de rutina: neutropenia, anemia y trombocitopenia (recuentos bajos de glóbulos blancos y rojos y plaquetas, respectivamente); esplenomegalia o, en raras ocasiones, hepatomegalia; gránulos anormales en células, forma y tamaño nucleares anormales; y/o anomalías cromosómicas, incluyendo translocaciones cromosómicas y un número anormal de cromosomas.

15 Si bien existe cierto riesgo de desarrollar leucemia mielógena aguda, alrededor del 50 % de las muertes se producen como resultado de hemorragia o infección. La leucemia que se produce como resultado de la mielodisplasia es notoriamente resistente al tratamiento.

20 La mielodisplasia 5q (también conocida como síndrome de delección del cromosoma 5q, monosomía del cromosoma 5q o síndrome 5q) es un trastorno poco frecuente causado por la pérdida de una parte del brazo largo (brazo q, banda 5q31.1) del cromosoma 5 humano. La mielodisplasia 5q se caracteriza por anemia macrocítica, a menudo trombocitosis, eritroblastopenia, hiperplasia de megacariocitos con hipoblastación nuclear y una delección intersticial aislada del cromosoma 5. El síndrome 5q se encuentra predominantemente en mujeres de edad avanzada.

25 Algunos individuos con mielodisplasia 5q tienen una disminución en la expresión de Rps 14. La delección de los loci miR-145 y miR-146 se ha asociado con un recuento elevado de plaquetas y una displasia megacariocítica asociada al síndrome 5q. La mielodisplasia 5q afecta a las células de la médula ósea y provoca anemia resistente al tratamiento y síndromes mielodisplásicos que pueden provocar leucemia mielógena aguda. El examen de la médula ósea muestra cambios característicos en los megacariocitos. Son más numerosos de lo habitual, pequeños y mononucleares. Puede haber una hipoplasia eritroide acompañante en la médula ósea. Por consiguiente, un individuo con mielodisplasia 5q puede tener una médula ósea displásica. Los individuos con mielodisplasia 5q pueden tratarse con lenalidomida (Bennett J et al. (2006). "Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 30 5q deletion". N. Engl. J. Med. 355 (14): 1456-65; Raza et al., (2008), "Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q". Blood 111 (1): 86-93.)

35 En algunas realizaciones de todos los aspectos de la presente divulgación, los inhibidores descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar a un individuo con una ribosomopatía, como el síndrome de Shwachman-Diamond, por ejemplo cuando el individuo tiene una mutación en Sbds. En algunas realizaciones, un individuo con el síndrome de Shwachman-Diamond tiene uno o más síntomas seleccionados entre insuficiencia pancreática, disfunción de la médula ósea y deformidades esqueléticas.

40 En otra realización, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede usarse en una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con una ribosomopatía tal como el síndrome de Treacher Collins, por ejemplo cuando el individuo tiene una mutación en TCOF1 (nucleolar). El síndrome de Treacher-Collins es una afección que se transmite de padres a hijos (hereditaria) y provoca problemas en la estructura de la cara. El síndrome de Treacher-Collins es causado por una proteína defectuosa llamada melaza. La afección se transmite de padres a hijos (hereditaria). La gravedad de esta afección puede variar de una generación a otra y de una persona a otra. Los síntomas del síndrome de Treacher-Collins incluyen al menos uno de los siguientes, pero no se limitan a: parte externa de los oídos anormal o casi ausente por completo, pérdida de audición, mandíbula muy pequeña (micrognatia), boca muy grande, defecto en el párpado inferior (coloboma), vello del cuero cabelludo que llega hasta las mejillas, fisura del paladar. En consecuencia, un individuo con Síndrome de Treacher Collins tiene una o más deformidades craneofaciales. Si bien un niño con el Síndrome de Treacher Collins suele mostrar una inteligencia normal, el diagnóstico se puede hacer sobre la base de un examen del niño, que puede revelar una variedad de problemas, incluyendo: (a) forma anormal de los ojos, (b) pómulos planos, (c) hendiduras en la cara, (d) mandíbula pequeña, (e) orejas bajas, (f) orejas con forma anormal, (g) canal auditivo anormal, (h) pérdida de audición, (i) defectos en los ojos (coloboma que se extiende hasta el párpado inferior), (j) disminución de las pestañas del párpado inferior, (k) las pruebas genéticas pueden ayudar a identificar los cambios genéticos relacionados con esta afección. El diagnóstico del Síndrome de Treacher Collins también se basa en hallazgos clínicos y radiográficos, y existe un conjunto de síntomas típicos dentro del Síndrome de Treacher Collins que pueden detectarse mediante una visión clínica crítica. El amplio espectro de enfermedades que tienen características similares hace que a veces sea difícil diagnosticar el TCS. La clasificación OMENS se desarrolló como un enfoque integral y basado en etapas para diferenciar las

enfermedades. Este acrónimo describe cinco manifestaciones dismórficas distintas, a saber, O; asimetría orbitaria, M; hipoplasia mandibular, E; deformidad auricular, N; desarrollo nervioso y S; enfermedad de tejidos blandos.

Selección de individuos para la administración de una composición farmacéutica que comprende el inhibidor

5 Un individuo susceptible o adecuado para el tratamiento con una composición que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede seleccionarse basándose en la disminución de los niveles de células hematopoyéticas y la disminución de la expresión de flk1 en células CD34+, en comparación con los niveles normales de referencia de control de células hematopoyéticas y el nivel de expresión de flk1 de un individuo normal. Además, un individuo susceptible o adecuado para el tratamiento con una composición que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede seleccionarse en función del aumento de los niveles de expresión de p21 en células CD34+ en comparación con un nivel de expresión de p21 de referencia de control. En algunas realizaciones, un individuo susceptible o adecuado para el tratamiento con una composición que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede seleccionarse en función de la disminución de la expresión de CD71+ y la disminución de la expresión de la glicoforina A (GPA) en células CD34+ en comparación con un nivel de expresión de CD71+ y GPA de referencia de control, por ejemplo en una muestra de un individuo normal que no tiene un trastorno ribosómico o ribosomopatía. En algunas realizaciones, los niveles de referencia normales se basan en el nivel de células hematopoyéticas, la expresión de flk 1, la expresión de CD71+, la expresión de GPA, los niveles de expresión de p21 en una muestra de un individuo normal que no tiene un trastorno ribosómico o ribosomopatía, o una línea celular de control, o células de una muestra de tejido normal, donde la muestra de tejido es una muestra de tejido biológico de una muestra biológica de tejido compatible con especie y edad.

20 En algunas realizaciones, los niveles de expresión de flk1, expresión de CD71+, expresión de GPA y niveles de expresión de p21 se miden en una muestra biológica que comprende células hematopoyéticas o células eritroides o células eritroides diferenciadas. En algunas realizaciones, una muestra biológica obtenida del individuo comprende células cancerosas y puede ser una muestra biológica que es una muestra de suero, plasma, sangre o tejido. En realizaciones alternativas, la muestra biológica incluye, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirados del pezón, líquido linfático, secreciones externas de la piel, vías respiratorias, internas y genitourinarias, bilis, lágrimas, sudor, saliva, órganos, células lácteas y células de ascites primarias, muestra de tejido de biopsia, una muestra de tejido de biopsia cultivada *in vitro* o *ex vivo*.

Composiciones farmacéuticas que comprenden el inhibidor

30 Un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede usarse en una cantidad de aproximadamente 0.001 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0.005 a 8 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0.01 a 6 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0.1 a 0.2 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones se puede usar un inhibidor en una cantidad de aproximadamente 0.1 a 1000 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, el inhibidor descrito en la presente memoria se puede usar a una concentración de aproximadamente 0.001 mg/ml o 0.1 mg/ml o una concentración superior a 0.1 mg/ml. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende al menos un inhibidor en una concentración de aproximadamente 0.01 µM a 300 µM, o de aproximadamente 0.1 µM a 150 µM, o de aproximadamente 1 µM a 50 µM, o de aproximadamente 1 µM a 25 µM. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada.

40 Dependiendo de las vías de administración, un experto en la materia puede determinar y ajustar en consecuencia una dosis eficaz de un inhibidor descrito en la presente memoria a un individuo, tal como un individuo humano, determinando la farmacocinética y la biodisponibilidad de un inhibidor y analizando la relación dosis-respuesta específica de un inhibidor en modelos animales tales como un ratón.

45 La toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para un 50 % de la población) o la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y el terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren las composiciones que muestran índices terapéuticos grandes.

50 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. La dosis terapéuticamente eficaz puede determinarla un experto en la materia, por ejemplo usando ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del agente terapéutico que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) tal como se determina en el cultivo celular mediante métodos descritos en los Ejemplos. Una dosis eficaz del inhibidor se puede determinar en un modelo animal midiendo los niveles de hemoglobina durante el transcurso del tratamiento con el inhibidor en comparación con ningún tratamiento. En algunas realizaciones, una dosis que comprende el inhibidor se considera eficaz si la dosis aumenta los niveles de hemoglobina, el número de glóbulos rojos, y/o reduce la expresión de p21 en células CD34+ en al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos

- aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso un 100 %, en comparación con un control (por ejemplo, en ausencia del inhibidor). Una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor administrada a un individuo depende de factores conocidos por una persona experta en la materia, incluyendo la bioactividad y biodisponibilidad del inhibidor (por ejemplo, la vida media y la estabilidad del inhibidor en el organismo), las propiedades químicas del inhibidor (por ejemplo, el peso molecular, la hidrofobicidad y la solubilidad); la vía y la frecuencia de administración, el tiempo de administración (por ejemplo, antes o después de una comida) y similares. Además, se entenderá que la dosis específica de la composición farmacéutica que comprende el inhibidor tal como se describe en la presente memoria para proporcionar los beneficios terapéuticos o profilácticos puede depender de una variedad de factores, incluyendo el estado físico del individuo (por ejemplo, edad, sexo, peso), el historial médico del individuo (por ejemplo, los medicamentos que se están tomando, otras enfermedades o trastornos) y el estado clínico del individuo (por ejemplo, estado de salud, estadio de la enfermedad). La dosis precisa de una composición farmacéutica que comprende el inhibidor se puede determinar mediante métodos conocidos por un experto en la materia, como farmacólogos y médicos.
- Un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede administrarse de forma profiláctica o terapéutica a un individuo antes, de forma simultánea o secuencial con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de fármacos múltiples), en una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, el inhibidor se administra simultáneamente con otros agentes terapéuticos que pueden administrarse en la misma composición o en diferentes composiciones. Los agentes o regímenes terapéuticos adicionales incluyen, pero no se limitan a, esteroides, corticosteroides, transfusiones de sangre y trasplantes de médula ósea.
- Los ingredientes activos de la composición según la invención se pueden administrar a un individuo por cualquier vía conocida por los expertos en la materia. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, bucal, nasal, rectal, epidural, tópica, intratecal, rectal, intracraneal, intratraqueal e intratecal e intranasal. Se puede usar cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o administración sistémica. Además, un inhibidor según la invención se puede administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, soportes, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.
- Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), un inhibidor puede formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas de uso común.
- La vía de administración es la administración por vía subcutánea. La administración intramuscular es otra vía de administración alternativa. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor se puede administrar como una formulación adaptada para la administración sistémica. Las composiciones se pueden administrar como una formulación adaptada para su administración a órganos específicos, por ejemplo, entre otros, el hígado. Una composición que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria se puede administrar como una formulación adaptada para no atravesar la barrera hematoencefálica.
- Alternativamente, en algunas realizaciones, la composición puede incorporarse en un gel, esponja u otra matriz permeable (por ejemplo, formada como gránulos o un disco) y colocarse cerca del endotelio hepático para una liberación local sostenida. La composición que comprende un inhibidor se puede administrar en una dosis única o en dosis múltiples, que se administran en momentos diferentes.
- La vía exacta de administración, así como las dosis óptimas, se pueden determinar mediante técnicas clínicas estándar para cada caso específico, basándose principalmente en la naturaleza de la enfermedad o trastorno y en el estadio de esta enfermedad. Preferiblemente, el medicamento según la presente invención se aplica local o sistémicamente, en particular por vía oral, intravenosa, parenteral, epicutánea, subcutánea, intrapulmonar mediante inhalación o lavado broncoalveolar, por vía intramuscular, intracraneal, local en los discos intervertebrales u otros tejidos conjuntivos.
- Tal como se describe en la presente memoria, una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor se puede administrar a un individuo para el tratamiento terapéutico o preventivo (por ejemplo, tratamiento profiláctico) de enfermedades y trastornos ribosómicos o ribosomopatías.
- En algunas realizaciones, una composición de la invención que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria se formula para enfermedades ribosómicas y/o ribosomopatías, por ejemplo DBA, mielodisplasia, por ejemplo, pero sin limitarse a, mielodisplasia 5q, síndrome de Shwachman-Diamond y el Síndrome de Treacher Collins.
- En algunas realizaciones, la composición que comprende al menos uno de los inhibidores descritos en la presente memoria comprende además un segundo agente terapéutico. En una realización, el segundo agente terapéutico es un corticosteroide. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un bloqueador de los canales de calcio, tal como se describe en la presente memoria.

En aplicaciones profilácticas, los medicamentos que comprenden un inhibidor se pueden administrar a un individuo susceptible a, o de otro modo en riesgo de sufrir, una enfermedad o trastorno ribosómico y/o ribosomopatía en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retrasar la aparición de la enfermedad.

5 En aplicaciones terapéuticas, de acuerdo con la descripción proporcionada en la presente memoria, cuando se puede administrar una cantidad eficaz o una dosis eficaz de una composición que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria al individuo con una enfermedad o trastorno ribosómico y/o ribosomopatía, de modo que al menos uno de los síntomas de dicha enfermedad ribosómica pueda retrasarse o inhibirse. En algunas realizaciones, la administración de una cantidad eficaz o una dosis eficaz de una composición que comprende un inhibidor a un individuo con una enfermedad o trastorno ribosómico y/o ribosomopatía puede inhibir o retrasar la
10 progresión de anomalías faciales y/u otros síntomas asociados con la enfermedad ribosómica o la ribosomopatía. En otras realizaciones, el tratamiento de los individuos con una dosis eficaz de una composición que comprende un inhibidor puede prevenir o retrasar un síntoma de la enfermedad ribosómica o ribosomopatía en el individuo.

15 En algunas realizaciones, la presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden un inhibidor tal como se describe en la presente memoria para poner en práctica los métodos terapéuticos y profilácticos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, las combinaciones de un inhibidor y otro agente terapéutico pueden adaptarse para combinarse en una composición farmacéutica, en la que cada agente terapéutico puede dirigirse a un síntoma diferente, una enfermedad diferente o un trastorno diferente. En otras realizaciones, el inhibidor y otro agente terapéutico pueden mezclarse en una composición farmacéutica tal como se describe en la presente memoria. En otras realizaciones, un inhibidor y otro agente terapéutico pueden estar presentes en una formulación diferente cuando se combinan en una composición farmacéutica. Por ejemplo, en una realización, el inhibidor puede estar presente en una formulación líquida, mientras que otro agente terapéutico puede liofilizarse en polvo. Las formulaciones de diferentes ingredientes activos en una composición farmacéutica tal como se describe en la presente memoria (por ejemplo, inhibidores de rps6; inhibidores de p90S6K o p70S6K; inhibidores SL de rSk p90, B1; inhibidor de p70s6K PF; inhibidor de Cam, TF y FLU; quelante de Ca²⁺ BABTA; inhibidores chk2 de CCT y III, y los inhibidores PerSuc, 221E y ACV; o los compuestos inhibidores de la Figura 33, o los compuestos de la Fórmula I o II) pueden optimizarse en consecuencia mediante diversos factores, tales como las propiedades físicas y químicas de un fármaco, la biodisponibilidad, la vía de administración y si el fármaco es de liberación sostenida o rápida. Las composiciones terapéuticas y profilácticas de la presente invención pueden comprender además un vehículo fisiológicamente tolerable junto con un inhibidor tal como se describe en la presente memoria (inhibidores de rps6; inhibidores de p90S6K o p70S6K; inhibidores SL de RSk p90, B1; inhibidor de p70s6K PF; inhibidor de Cam, TF y FLU; quelante de Ca²⁺ BABTA; inhibidores chk2 de CCT y III, y los inhibidores PerSuc, 221E y ACV, o los compuestos de la Fórmula I o la Fórmula II), o derivados, enantiómeros, profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En realizaciones adicionales, un inhibidor y otro agente terapéutico pueden emplear diferentes vehículos fisiológicamente tolerables cuando se combinan en una composición farmacéutica de la invención tal como se describe en la presente
30 memoria.
35

En Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo et al., se describen vehículos adecuados para un inhibidor de la invención y sus formulaciones. Por lo general, en la formulación se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos del vehículo incluyen tampones tales como solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Otros
40 vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo liposomas, películas o micropartículas. Para los expertos en la materia será evidente que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración del inhibidor que se esté administrando.

45 La biodisponibilidad del inhibidor según la invención también se puede mejorar mediante el uso de procedimientos de conjugación que aumentan la vida media del inhibidor en un individuo, por ejemplo, uniendo el inhibidor a polietilenglicol, como se describe en el documento WO 92/13095.

La biodisponibilidad del inhibidor según la invención también se puede mejorar encapsulando un inhibidor en vehículos de administración biocompatibles que aumentan la vida media de un inhibidor en un cuerpo humano. Los ejemplos de vehículos de administración biocompatibles incluyen vehículos poliméricos tales como vehículos basados en PEG o
50 vehículos basados en liposomas.

El inhibidor se puede disolver o dispersar como ingrediente activo en el vehículo fisiológicamente tolerable para aumentar la vida media del inhibidor en un individuo.

La preparación de una composición que contiene ingredientes activos (por ejemplo, inhibidores de rps6; inhibidores de p90S6K o p70S6K; inhibidores SL de RSk p90 SL, o B1; inhibidor PF de p70s6K; inhibidor de Cam, TF y FLU; quelante de Ca²⁺ BABTA; inhibidores chk2 de CCT y III, y los inhibidores PerSuc, 221E y ACV; o, por ejemplo, los inhibidores de la Figura 33; o los compuestos de las Fórmulas I o II) disueltos o dispersos en los mismos se conocen bien en la técnica y no es necesario limitarlos en función de la formulación. Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de su uso. La preparación también puede
55 emulsionarse o presentarse como una composición liposomal. El inhibidor se puede mezclar con excipientes que sean
60

farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria. Además, si se desea, la composición que comprende el inhibidor puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón de pH y similares que mejoran la eficacia del ingrediente activo.

5 Los vehículos fisiológicamente tolerables (es decir, vehículos fisiológicamente aceptables) son bien conocidos en la técnica. La selección de los vehículos farmacéuticamente aceptables se puede realizar mediante la administración por parte de un experto en la materia. Por ejemplo, si la composición se administra por vía oral, se puede formular en comprimidos revestidos, líquidos, cápsulas, etc. Algunos ejemplos de vehículos líquidos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Además, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Para la aplicación tópica, el vehículo puede estar en forma de, por ejemplo, y sin carácter limitativo, una pomada, crema, gel, pasta, espuma, aerosol, supositorio, almohadilla o barra gelificada. Las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de su inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como poliláctido, poliglicólido o copolímero para potenciar el efecto adyuvante, tal como se analiza más arriba (véase Langer, Science 249, 1527 (1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)). Un inhibidor tal como se describe en la presente memoria se puede administrar en forma de una preparación de inyección o implante que se puede formular de tal manera que permita una liberación mantenida o pulsátil del ingrediente activo.

Tal como se usan en la presente memoria, los "inhibidores tal como se describen en la presente memoria" incluyen, por ejemplo, inhibidores de rps6; inhibidores de p90S6K o p70S6K; inhibidores SL de RSk p90, o B1; inhibidor de p70s6K PF; inhibidor de Cam, TF y flufenazina (FLU); el quelante de Ca²⁺ BABTA; los inhibidores chk2 de CCT y III, y los inhibidores PerSuc, 221E y ACV; y DB-4-083, DB-4-084, DB-4-088-2, DB-4-088-3, DB-4-086, DB-4-087-2, DB-4-087-3, DB-4-089, los compuestos de Fórmula I y Fórmula II, y derivados y análogos específicos de los mismos (véanse, por ejemplo, la **Figura 5**, la **Figura 31**, la **Figura 32**, y la **Figura 33**, para estructuras).

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0.5 % al 10 %, preferiblemente del 1 % al 2 %. Las composiciones orales pueden incluir excipientes tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen entre un 10 % y un 95 % de ingrediente activo, preferiblemente entre un 25 % y un 70 %.

Un experto en la materia podrá determinar la forma apropiada de administrar las composiciones que comprenden al menos un inhibidor de LSF tal como se describe en la presente memoria en vista del conocimiento general y la experiencia en la materia.

Regímenes de tratamiento

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a composiciones para su uso en métodos para el tratamiento de enfermedades o trastornos, en los que es deseable la inhibición de la activación de p53 para el tratamiento o la prevención de un trastorno ribosómico o una ribosomopatía. El al menos un inhibidor seleccionado de, por ejemplo, cualquiera o una combinación de compuestos tales como los inhibidores de moléculas pequeñas o proteínas de rps6, y los de la Figura 33 y de la Fórmula I y la Fórmula II).

En una realización, la anemia de Diamond-Blackfan (DBA) se trata o previene mediante las composiciones de la presente invención con un compuesto tal como se reivindica.

Las dosis eficaces de la composición que comprende un inhibidor, tal como se describe en la presente memoria, para el tratamiento de enfermedades o trastornos de proteínas ribosómicas o asociadas con una ribosomopatía dependen de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el estado fisiológico del individuo, si el individuo es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Dependiendo del estado clínico de un individuo, un experto en la materia, por ejemplo un médico, puede ajustar en consecuencia la dosificación y la frecuencia de las composiciones farmacéuticas de la presente invención a lo largo del tiempo.

En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o detiene la progresión de la enfermedad, o hasta que el individuo muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, se puede administrar al individuo un régimen profiláctico. Por ejemplo, los individuos con DBA pueden tratarse con un inhibidor tal como se describe en la presente memoria en una dosis eficaz en un régimen terapéutico en consecuencia para reducir los niveles de p21 y/o los niveles de p53 hasta un nivel normal, y luego administrarles una dosis de mantenimiento, por ejemplo de forma profiláctica. En

5 algunas realizaciones, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede administrarse a individuos antes, simultáneamente o secuencialmente al tratamiento con un corticosteroide, y/o cuando el individuo está siendo sometido a una terapia adyuvante, tal como una transfusión de sangre y/o un trasplante de médula ósea. En algunas realizaciones, por ejemplo, un individuo con DBA que se selecciona para otros procedimientos terapéuticos o cirugías, tales como transfusiones de sangre y/o trasplante de médula ósea, puede someterse a un tratamiento con un inhibidor tal como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar antes, durante o después de procedimientos terapéuticos. La vía de administración puede variar con procedimientos terapéuticos o cirugías y puede ser determinada por un experto en la materia. En otra realización más, las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse como terapia adyuvante.

10 En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano y, en realizaciones alternativas, el individuo es un mamífero no humano. Las dosis de tratamiento se deben valorar para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de un inhibidor depende del estadio de la enfermedad, y de la especie.

15 En algunas realizaciones se puede administrar un inhibidor a un individuo en una composición que comprende una cantidad de un inhibidor de aproximadamente 0.001 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0.005 a 8 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0.01 a 6 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0.1 a 0.2 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones se puede usar un inhibidor en una cantidad de aproximadamente 0.1 a 1000 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, un inhibidor se puede administrar en una concentración de aproximadamente 0.001 mg/ml o 0.1 mg/ml o a una concentración más alta que 0.1 mg/ml. En realizaciones alternativas, una composición comprende al menos un inhibidor en una concentración de aproximadamente 0.01 µM a 300 µM, o de aproximadamente 0.1 µM a 150 µM, o de aproximadamente 1 µM a 50 µM, o de aproximadamente 1 µM a 25 µM.

25 En algunas realizaciones, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede administrarse a un individuo en una dosis eficaz para aumentar los niveles de células CD71+ en una población de células eritroides obtenida del individuo en al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 % o más del 50 %, en comparación con la ausencia del inhibidor.

30 En otra realización, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede administrarse a un individuo en una dosis eficaz para disminuir los niveles de expresión de p21 en células CD34+ presentes en una población de células eritroides obtenida del individuo en al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o más de un 99 %, en comparación con la ausencia del inhibidor.

40 En general, las dosis y los programas de dosificación eficaces se pueden ajustar en función, por ejemplo, del resultado del tratamiento, tal como si el individuo ha reducido los síntomas de la anemia y/o si se ha reducido al menos uno de los síntomas asociados con el trastorno de proteínas ribosómicas, como la DBA. De acuerdo con las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, la eficacia del tratamiento puede controlarse obteniendo una muestra biológica de un individuo, por ejemplo una muestra de suero sanguíneo, y determinando el nivel de biomarcadores de la DBA, tal como el porcentaje de células CD71+ en una población de células eritroides y/o el nivel de p21 en células CD34+, usando métodos bien conocidos en la técnica y los métodos de diagnóstico que se describen más adelante en la presente memoria.

45 En algunas realizaciones, la dosis diaria administrada a un individuo en forma de una composición en bolo que comprende un inhibidor se puede administrar en una dosis única, en dosis divididas o en una forma de liberación sostenida eficaz para obtener los resultados deseados. La segunda administración o las posteriores pueden realizarse en una dosificación que sea la misma, menor o mayor que la dosis inicial o anterior administrada al individuo. Se puede administrar una segunda administración o una administración posterior durante o antes del inicio de la enfermedad. También entra dentro de los conocimientos de la técnica iniciar las dosis en niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

55 Las composiciones que comprenden al menos un inhibidor tal como se describe en la presente memoria pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, por ejemplo HCC, una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de LSF puede inyectarse sistémicamente, tal como mediante inyección intravenosa, o mediante inyección o aplicación en el sitio relevante, tal como mediante inyección directa en un tumor, o aplicación directa en el sitio cuando el sitio está expuesto en una cirugía. Otras vías de administración de un inhibidor tal como se describe en la presente memoria son la intramuscular (i.m.), la intravenosa (i.v.), la subcutánea (s.c.) o la oral, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La

inyección intramuscular se realiza con mayor frecuencia en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria se puede administrar como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™.

5 En algunas realizaciones, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son al menos parcialmente eficaces en el tratamiento de enfermedades y trastornos de proteínas ribosómicas, tales como transfusiones de sangre, trasplantes de médula ósea y similares. En otras realizaciones, un inhibidor de la invención puede administrarse antes, simultáneamente o después de la administración de otro agente terapéutico dirigido a otra enfermedad o trastorno, o a un síntoma diferente.

10 En diversas realizaciones, un inhibidor puede ser un profármaco que es activado por un segundo agente. Por consiguiente, en dichas realizaciones, la administración de dicho segundo agente que activa el profármaco del inhibidor en su forma activa se puede administrar al mismo tiempo, simultáneamente con, o antes o después de la administración de la composición farmacéutica que comprende un inhibidor tal como se describe en la presente memoria.

15 En algunas realizaciones, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria se administra a menudo como composiciones que comprenden un agente terapéutico activo tal como se describe en la presente memoria, y una variedad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15 ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). La formulación de las composiciones depende del modo de administración previsto y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que se definen como vehículos
20 comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Algunos ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Sin embargo,
25 algunos reactivos adecuados para la administración a animales pueden no usarse necesariamente en composiciones para uso humano.

Para la administración parenteral, un inhibidor tal como se describe en la presente memoria puede administrarse como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como aceites acuosos, solución salina, glicerol o etanol.
30 Además, las composiciones pueden presentar sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, surfactantes, sustancias tampón de pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuate, aceite de soja y aceite mineral. En general, los glicoles tales como el propilenglicol o el polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables.

35 La aplicación tópica puede resultar en una administración transdérmica o intradérmica. La administración tópica puede facilitarse mediante la coadministración del agente con toxina del cólera o sus derivados destoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (véase Glenn et al., Nature 391, 851 (1998)). La coadministración se puede lograr usando los componentes como una mezcla o como moléculas enlazadas obtenidas por reticulación química o expresión como una proteína de fusión.

40 Otro modo de administración incluye la administración sistémica. En algunas realizaciones, al menos un inhibidor, tal como se describe en la presente memoria, puede inyectarse sistémicamente, tal como mediante inyección intravenosa, o mediante inyección o aplicación en el sitio relevante, tal como la aplicación directa en el sitio cuando el sitio está expuesto en una cirugía. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención puede formularse en un comprimido y usarse por vía oral para administración sistémica. En diversas realizaciones, las composiciones
45 farmacéuticas de la invención pueden comprender además ingredientes no activos (es decir, ingredientes que no tienen valores terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, trastornos o síntomas), tales como vehículos fisiológicamente aceptables.

En diversas realizaciones se contempla específicamente la modificación de un inhibidor mediante la adición de un polímero, por ejemplo usando una unión covalente a un polímero. En otras realizaciones, un inhibidor puede mezclarse
50 con o encapsularse en un polímero biocompatible.

En otro aspecto, los polímeros biodegradables o absorbibles pueden proporcionar una liberación prolongada, a menudo localizada, de un inhibidor tal como se describe en la presente memoria. Los beneficios potenciales de un aumento de la vida media o de una liberación prolongada de un agente terapéutico son evidentes. Un beneficio potencial de la liberación localizada es la capacidad de lograr dosis o concentraciones localizadas mucho más altas,
55 durante períodos de tiempo mayores, en comparación con una administración sistémica más amplia, con el potencial de evitar los posibles efectos secundarios indeseables que se pueden producir con la administración sistémica.

La matriz polimérica bioabsorbible adecuada para la administración de un inhibidor tal como se describe en la presente memoria, o sus variantes o fragmentos o derivados, se puede seleccionar entre una variedad de polímeros bioabsorbibles sintéticos que se describen ampliamente en la bibliografía. Dichos polímeros sintéticos bioabsorbibles y biocompatibles que pueden liberar proteínas durante varias semanas o meses, pueden incluir, por ejemplo, polihidroxiácidos (por ejemplo, polilactidas, poliglicólidos y sus copolímeros), polianhídridos, poliortoésteres, copolímeros en bloque segmentados de polietilenglicol y tereftalato de polibutileno (POLYACTIVE™), polímeros derivados de tirosina o poli(éster-amidas). Los polímeros bioabsorbibles adecuados para su uso en la fabricación de materiales de administración de fármacos e implantes se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 4.968.317, 5.618.563, entre otras, y en "Biomedical Polymers" editado por S. W. Shalaby, Carl Hanser Verlag, Múnich, Viena, Nueva York, 1994 y en muchas referencias citadas en las publicaciones arriba indicadas. El polímero bioabsorbible particular que se debe seleccionar dependerá del paciente particular que se esté tratando.

Los métodos son útiles para monitorizar un curso de tratamiento que se administra a un individuo. Los métodos pueden usarse para monitorizar tanto el tratamiento terapéutico en un individuo sintomático como el tratamiento profiláctico en un individuo asintomático.

Un tratamiento administrado a un individuo se considera eficaz si el nivel de expresión de p21 en células CD34+ presentes en una muestra biológica obtenida del individuo disminuye en al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % en comparación con un nivel de referencia o en ausencia del inhibidor. El nivel de referencia es la medición de la p21 en células CD34+ presentes en una muestra biológica obtenida del individuo en un punto temporal anterior, por ejemplo a quien no se le han administrado los inhibidores. Basándose en el resultado del tratamiento, un experto en la materia puede ajustar en consecuencia la dosificación y la frecuencia de administración usando los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Para determinar el nivel de expresión de p21 en células CD34+ de una muestra biológica se puede usar cualquier inmunoensayo, tal como ELISA o métodos inmunohistoquímicos que se conocen comúnmente en la técnica y que están incluidos para su uso en la presente invención.

Ejemplos

Aunque en la práctica o el ensayo de la invención se puede usar cualquier método, dispositivo y material conocidos, los métodos, dispositivos y materiales a este respecto se describen en la presente memoria.

Los ejemplos presentados en la presente memoria se refieren a métodos y composiciones que comprenden al menos un inhibidor tal como se describe en la presente memoria para el tratamiento de un trastorno ribosómico o ribosomopatía, por ejemplo, pero sin limitarse a, DBA.

Materiales y métodos

Manipulación embrionaria y tratamiento químico

Los peces se mantuvieron en condiciones de laboratorio aprobadas. Los estudios se realizaron en cepas AB de tipo silvestre y en hi2903, un mutante insercional en el primer intrón de la proteína ribosómica S29 (rps29). Los embriones se sometieron a productos químicos diluidos en E3. Para el cribado, los productos químicos de las bibliotecas de ICCB Biomol Known Bioactive, Sigma y Lopac se probaron a diluciones 1:300 del material de la biblioteca. Los compuestos se probaron en dos experimentos independientes de 20 embriones cada uno, por lo que se puntuaron aproximadamente 10 embriones mutantes por producto químico. Los compuestos se diluyeron en DMSO o agua y se probaron en dosis de 5 a 50 µg/ml, *hibridación in situ* y *tinción con bencidina*.

La hibridación *in situ* de montaje completo (ISH) se realizó tal como se describe (Thisse y Thisse, 2008). Las sondas antisentido se sintetizaron a partir de plásmido digerido. La O-dianisidina se realizó tal como se ha descrito anteriormente (Paffett-Lugassy y Zon, 2005).

Cultivo celular e infección

Las células A549 y CD34+ se infectaron con ARNhc lentiviral previamente caracterizado dirigido a la RPS19 (Dutt et al., 2011). A menos que se indique lo contrario, los fármacos se añadieron un día después de la infección y las células se recogieron para su análisis 3-6 días después de la infección.

Citometría de flujo e inmunofluorescencia

Para la medición de los niveles de proteína basada en citometría de flujo, las células se fijaron en paraformaldehído al 2 % durante 15 minutos a 37 °C y se añadió metanol para la incubación durante la noche a 4 °C. Las células se incubaron durante una hora en 1: 100 anticuerpos primarios p21 diluidos (Cell Signaling 12D1) seguidos de una hora en anticuerpo secundario conjugado y anticuerpo conjugado con p53 diluido a 1:50 (Cell Signaling 1C12). La tinción

por inmunofluorescencia se realizó tal como se ha descrito anteriormente (Dutt et al., 2011).

Ejemplo 1

Las mutaciones de proteínas ribosómicas son frecuentes en pacientes con anemia de Diamond-Blackfan (DBA), que tienen aplasia de glóbulos rojos y anomalías craneofaciales. Los inventores han caracterizado previamente un mutante del pez cebra en *rps29*, una proteína ribosómica en la subunidad pequeña. Los embriones *Rps29^{-/-}* tienen defectos morfológicos en la cabeza, así como una disminución de células madre hematopoyéticas, hemoglobina y tinción de marcadores endoteliales. Al igual que otros modelos de DBA, la desactivación de p53 rescata casi por completo el fenotipo mutante *rps29*. Para identificar sustancias químicas que podrían rescatar el fenotipo mutante *rps29*, los inventores realizaron un cribado químico *in vivo*. Se descubrió que los inhibidores rescatan fenotipos morfológicos, endoteliales y de hemoglobina.

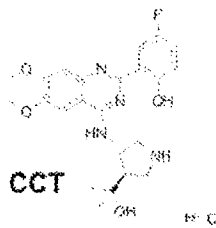
Los mutantes RPS29 del pez cebra tienen fenotipos hematopoyéticos dependientes de p53

El trabajo sobre el pez cebra se ha centrado en el mutante *rps29* (Amsterdam et al., 2004). Los inventores han informado previamente de que los embriones mutantes *Rps29* inicialmente tienen defectos hematopoyéticos y endoteliales (Burns et al., 2009). Los embriones *Rps29^{-/-}* tienen un defecto en la especificación arterial, lo que provoca una disminución de las células madre hematopoyéticas y una disminución de la expresión de *flk1* en los vasos intersegmentarios 24 horas después de la fertilización (hpf). La eritropoyesis primitiva se ve afectada específicamente, ya que los embriones *rps29^{-/-}* tienen menos hemoglobina, mientras que la mielopoyesis primitiva no se ve afectada. Los embriones mutantes *rps29* tienen un aumento de la apoptosis, como lo demuestran los cambios en la morfología de la cabeza y la tinción de TUNEL. El análisis de micromatrices demostró una activación de p53 y sus dianas en el embrión mutante. Cuando se cruzó una mutación p53 con el fondo del mutante *rps29*, se rescataron todos los fenotipos hematopoyéticos y apoptóticos. En la presente memoria, los inventores demuestran un papel fundamental de la activación de p53 en fenotipos mutantes *rps29*. Esta caracterización del mutante *rps29* y la identificación de un mecanismo dependiente de p53 se publicaron recientemente en el Journal of Experimental Hematology (Taylor et al., 2012).

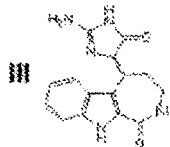
Un análisis químico encuentra inhibidores específicos de Chk2 que rescatan defectos de rps29^{-/-}

Se realizó un cribado para identificar sustancias químicas que pudieran rescatar los defectos endoteliales y morfológicos del embrión mutante *rps29^{-/-}* (**Figura 5**). En particular, se evaluó la capacidad de las quinasas dependientes de CaM para rescatar embriones mutantes de la *rps29^{-/-}*. Sorprendentemente, de un gran número de quinasas dependientes de CaM, solo los inhibidores de Chk2 se recuperaron bien y, a continuación, mediante cribados de quinasas *in vitro* (véanse la **Figura 12 y la Figura 13**), se determinó que los inhibidores de Chk2 CCT y III son eficaces mediante la inhibición de la RSK y la p70s6k. Se cruzaron peces *Rps29^{+/-}* y se recolectaron embriones para su tratamiento en la fase de yema (10 hpf). Los embriones se trataron desde la yema hasta las 23 hpf con compuestos de bioactividad conocida. Tras ser puntuados en cuanto al rescate de la morfología de la cabeza, los embriones se fijaron a 24 hpf para la hibridación *in situ* y la monitorización del rescate de la expresión de la Hb.

El inhibidor de Chk2 CCT rescata la Hb.



El inhibidor de Chk2 III rescata la Hb:



Se sabe que otras naftalenosulfonamidas inhiben la calmodulina, incluyendo A-7 y W-5, y anteriormente se demostró que también rescatan el defecto de vasculatura.

Ejemplo 2

Algunos derivados específicos de la fenotiazina aumentan la hemoglobina en embriones rps29-/-

Se realizó un ensayo de bencidina. Para el tratamiento farmacológico se cruzaron rps29+/- y se recolectaron los embriones y se trataron con una epibolía del 50 %, aproximadamente 5 horas después de la fertilización (hpf). La tinción con bencidina se realizó a 40 hpf tal como se ha descrito anteriormente (Paffett-Lugassy y Zon, 2005). La **Figura 25** muestra el espectacular rescate de la expresión de la Hb y el rescate de la hemoglobina en el pez cebra rps29-/- de los compuestos ACV y PerSucc. La razón de las diferencias en los niveles de Hb en el control 0 consiste en que se trataba de experimentos diferentes y que hay variabilidad en la Hb entre las diferentes nidadas de peces.

Ejemplo 3

Los nuevos derivados de fenotiazina mejoran los defectos eritroides en múltiples modelos de DBA

Anteriormente se demostró que los embriones de pez cebra con mutaciones en el gen rps29 (que codifica la proteína ribosómica S29) modelan DBA (Taylor, A. M. *et al.*). Existe un subconjunto de pacientes con mutaciones en la RPS29. Anteriormente se estableció que la RPS29 es un gen causante de DBA (Mirabello, L. *et al.*). Al igual que otros modelos animales de disfunción de la proteína ribosómica, la desactivación de la p53 en el pez cebra rps29-/- rescata el defecto eritroide. Para encontrar compuestos novedosos que puedan rescatar los fenotipos de DBA, se realizó un análisis químico *in vivo* en nuestro modelo de DBA del pez cebra y se descubrió que los inhibidores de la calmodulina (CaM) bloquean la actividad de la p53 y rescatan el defecto eritroide. La aplicación de inhibidores de la CaM a células CD34+ humanas deficientes en RPS 19 alivió el bloqueo de la diferenciación eritroide. Además, inyectar el inhibidor de la CaM aprobado por la FDA, la trifluoperazina (TFP), en un modelo de ratón inducible por DBA (Jaako, P *et al.*) aumentó significativamente el número de glóbulos rojos y los niveles de Hb y redujo la actividad de p53 en la médula ósea. La TFP pertenece a una familia de antipsicóticos aprobados por la FDA llamados fenotiazinas. Estos fármacos atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (BBB) y su uso a largo plazo se asocia con discinesia y efectos extrapiramidales (Kennedy, P. F. *et al.*), lo que los hace inapropiados para su uso en niños. Para superar esta limitación se utilizó una biblioteca de nuevos derivados de fenotiazina que potencialmente no cruzarán la BBB **Figura 33**. Primero se probaron los compuestos en embriones de pez cebra rps29-/- para determinar si alguno podría mejorar el defecto eritroide **Figura 34**. Se analizó el rescate de la Hb en el pez cebra. Se sembró una placa de 24 pocillos con 20 embriones por pocillo y, al 50 % de epibolía, los embriones se trataron con fármaco. A continuación, los embriones se tiñeron para determinar la hemoglobina (Hb) y se fijaron en PFA al 4 %. Se probaron los ocho compuestos y tres (incluidos en el recuadro de la figura): 088-2, 088-3 y 089)) pudieron aumentar la Hb en *concentraciones más bajas* que la fenotiazina de control positivo (flufenazina [Flu]) (**Figura 35**).

Está bien establecido que las moléculas pequeñas activas en el SNC pueden tener efectos neurológicos inmediatos (por ejemplo, alteración de la actividad locomotora (Giacomini, N. J. *et al.*; y Boehmler, W. *et al.*) en el pez cebra. El pez cebra es un excelente modelo *in vivo* para estudiar la permeabilidad de la BBB, ya que se ha demostrado que la función de su BBB es similar a la de los humanos (Jeong, J. Y. *et al.*). Para comprobar la permeabilidad de la BBB de estos compuestos, se utilizó un ensayo de prueba conductual de alto rendimiento para detectar los compuestos que pueden afectar a la natación del pez cebra y, por lo tanto, sugieren la permeabilidad de la BBB. Este ensayo consiste en colocar un pez cebra 6 días después de la fertilización (dpf) en un pocillo de una placa de 96 pocillos, añadir fármaco a cada pocillo y registrar el movimiento durante 1 a 2 horas utilizando un software de análisis de imágenes automatizado (Rihel, J. *et al.*). Al probar inicialmente este ensayo con fenotiazinas comerciales, se pudo determinar estadísticamente si un fármaco aumenta o disminuye el movimiento en comparación con el tratamiento con DMSO en la larva del pez cebra (datos no mostrados). Esto permite usar el comportamiento como un indicador para la difusión por la BBB en un modo de alto rendimiento. Se probaron cuatro derivados novedosos junto con una fenotiazina (Flu) comercial y un inhibidor de la chk2, como control, que no deberían afectar al comportamiento. De los derivados seleccionados, tres alteraron el comportamiento (083, 088-3 y 089) y el 089 fue incluso tóxico en la dosis más alta. Un fármaco, 088-2, no afectó al comportamiento de natación, lo que sugiere que no entra en el cerebro del pez cebra (**Figuras 36 a 39**).

A continuación se probaron tres derivados en nuestro principal modelo de diferenciación *in vitro* humano de DBA. Para ello se expandieron células mononucleares de sangre periférica CD34+ en cultivo durante 2 días y se indujo una deficiencia de proteína ribosómica con un lentivirus que contenía el ARNhc de la RPS19 (**Figura 40**). Después de 3 días, las células se colocan en medios de diferenciación eritroide con o sin los nuevos derivados y se cultivan durante 5 días. La diferenciación eritroide se evalúa luego mediante análisis de citometría de flujo para el receptor de transferrina, CD71+. Los resultados demostraron que tanto el 088-2 como el 089 aumentaron el porcentaje de células precursoras eritroides en comparación con las tratadas con DMSO (**Figura 41**). Además, los nuevos derivados aumentaron el número absoluto de eritroides en comparación con los tratados con DMSO (**Figura 41**). Estos resultados demuestran que el nuevo derivado 088-2 mejora el defecto eritroide tanto en embriones de pez cebra rps29-/- como en un modelo humano *in vitro* de DBA. A diferencia de los compuestos de fenotiazina precursores, el 088-2 no provoca cambios de comportamiento en el pez cebra, lo que sugiere que el compuesto *no* entra en el cerebro. En la **Figura 43** se encuentra una tabla que resume la actividad de los compuestos.

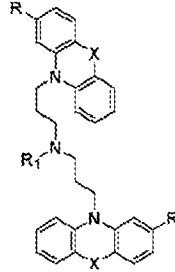
Referencias

- Boehmler, W. et al. D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes, Brain Behav.* 2007; 6:155-166.
- 5 Bums CE, Galloway JL, Smith AC, et al. A genetic screen in zebrafish defines a hierarchical network of pathways required for hematopoietic stem cell emergence. *Blood* 2009;113:5776-82.
- Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 2000;10:322-8.
- Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood* 2008;112:5228-37.
- 10 Danilova N, Sakamoto KM, Lin S. Ribosomal protein L11 mutation in zebrafish leads to hematopoietic and metabolic defects. *Br J Haematol* 2011;152:217-28.
- Drapchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Genet* 1999;21:169-75.
- Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 2011;117:2567-76.
- 15 Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008;451:335-9.
- Ebert BL, Lee MM, Pretz JL, et al. An RNA interference model of RPS19 deficiency in Diamond-Blackfan anemia recapitulates defective hematopoiesis and rescue by dexamethasone: identification of dexamethasone-responsive genes by microarray. *Blood* 2005;105:4620-6.
- 20 Flygare J, Kiefer T, Miyake K, et al. Deficiency of ribosomal protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2005;105:4627-34.
- Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, et al. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpl11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* 2009;11:501-8.
- 25 Giacomini, N. J., Rose, B., Kobayashi, K. & Guo, S. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006; 28:245-250.
- Inagaki M, Kawamoto S, Itoh H, et al. Naphthalenesulfonamides as calmodulin antagonists and protein kinase inhibitors. *Mol Pharmacol* 1986;29:577-81.
- Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13141-6.
- 30 Jaako P, Flygare J, Olsson K, et al. Mice with ribosomal protein S19 deficiency develop bone marrow failure and symptoms like patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2011;118:6087-96.
- Jeong, J.-Y. et al. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res. Bull.* 2008; 75:619-628.
- 35 Lu SJ, Feng Q, Park JS, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;112:4475-84.
- Kennedy, P. F., Hershon, H. I. & Mcguire, R. J. Extrapyrmidal disorders after prolonged phenothiazine therapy. *Br. J. Psychiatry* 1971;118: 509-518.
- McGowan KA, Li JZ, Park CY, et al. Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nat Genet* 2008;40:963-70.
- 40 Mirabello, L. et al. Whole-exome sequencing and functional studies identify RPS29 as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood* 2014;124: 24-32 (2014).
- Miyake K, Flygare J, Kiefer T, et al. Development of cellular models for ribosomal protein S19 (RPS 19)-deficient diamond-blackfan anemia using inducible expression of siRNA against RPS19. *Mol Ther* 2005;11:627-37.
- 45 North TE, Goessling W, Walkley CR, et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate hematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 2007;447:1007-11.
- North TE, Goessling W, Peeters M, et al. Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. *Cell* 2009;137:736-48.

- Paffett-Lugassy NN, Zon LI. Analysis of hematopoietic development in the zebrafish. *Methods Mol Med* 2005;105:171-98.
- Rihel, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* (80-). 2001; 327:348-351.
- 5 Rodriguez-Vilarrupla A, Jaumot M, Abella N, et al. Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153. *Mol Cell Biol* 2005;25:7364-74.
- Sweitzer TD, Hanover JA. Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14574-9.
- 10 Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 2005;123:49-63.
- Taules M, Rodriguez-Vilarrupla A, Rius E, et al. Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J Biol Chem* 1999;274:24445-8.
- 15 Taylor AM, Humphries JM, White RM, Murphey RD, Burns CE, Zon LI. Hematopoietic defects in rps29 mutant zebrafish depend upon p53 activation. *Exp Hematol* 2012;40:228-37 e5.
- Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc* 2008;3:59-69.
- Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008;142:859-76.
- 20 Vlachos A, Muir E. How I treat Diamond Blackfan anemia. *Blood* 2010;116:3715-23.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, comprendiendo la composición un compuesto de fenotiazina, en donde el compuesto de fenotiazina es un compuesto de la Fórmula (I):



FÓRMULA (I)

en donde:

X es O o S;

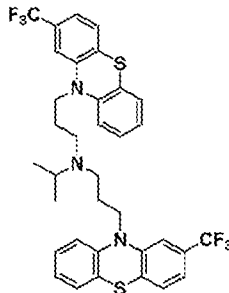
R¹ es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclilo, heterociclilos, acilo, arilo, heteroarilo, alquilheteroarilo o alquilarilo;

cada R es independientemente H, halo, alquilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, CN, OH, NH₂, alquilamino, dialquilamino, CO₂H, acilo, SH, tioalcoxi, SO₂H, o SO₃H; y

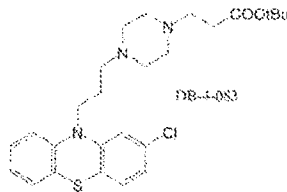
sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

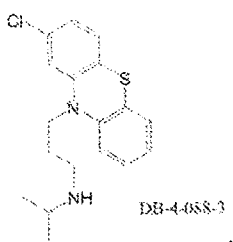
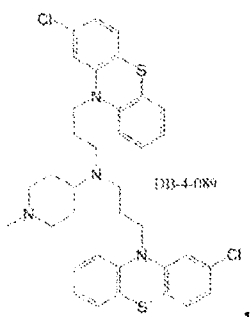
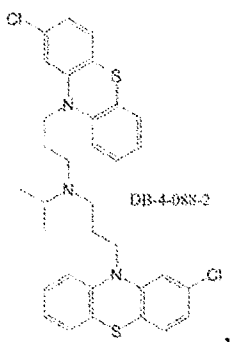
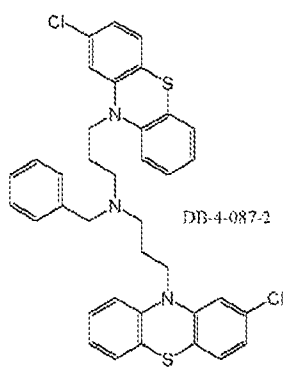
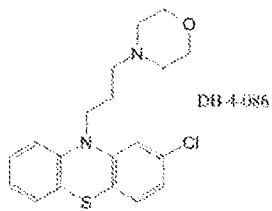
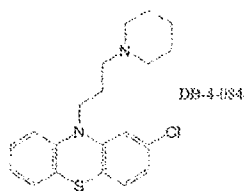
en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, ciclilo, heterociclilo, acilo, arilo, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquilarilo o tioalcoxi, alquilamino, dialquilamino está opcionalmente sustituido y la cadena principal de cada uno de los alquilo, alquenilo, alquinilo puede insertarse opcionalmente con uno o más heteroátomos.

2. Una composición para su uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto de fenotiazina es un compuesto de la estructura:



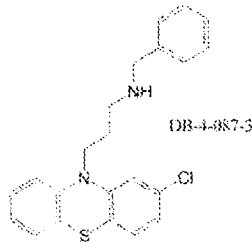
3. Una composición para su uso en un método de tratamiento de un individuo con un trastorno ribosómico o ribosomopatía, comprendiendo la composición un principio activo seleccionado entre (i) un compuesto de fenotiazina, en donde el compuesto de fenotiazina se selecciona entre el grupo que consiste en DB-4-083 (083); DB-4-084 (084); DB-4-088-2 (088-2); DB-4-088-3 (088-3); DB-4-086 (086); DB-4-087-2 (087-2); DB-4-087-3 (087-3); DB-4-089 (089), que tienen las siguientes estructuras:





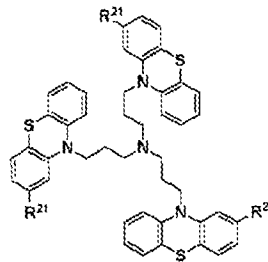
5

y



y

(ii) un compuesto de fenotiazina, en donde el compuesto de fenotiazina es un compuesto de la Fórmula (II):



FÓRMULA (II)

en donde:

cada R^{21} se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, halo, alquilo, haloalquilo, CN, OH, NH_2 , alquilamino, dialquilamino, CO_2H , acilo, SH, tioalcoxi, SO_2H y SO_3H ; y

sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

en donde cada alquilo, haloalquilo, alquilamino, dialquilamino, acilo, tioalcoxi está opcionalmente sustituido y la cadena principal del alquilo puede insertarse opcionalmente con uno o más heteroátomos.

4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el individuo con un trastorno ribosómico tiene Anemia de Diamond-Blackfan (DBA) o eritroblastopenia hereditaria; y en donde el individuo tiene opcionalmente DBA1, DBA2, DBA3, DBA4, DBA5, DBA6, DBA7 o DBA8.
5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el individuo tiene una mutación en la proteína ribosómica 19 (RPS19); o en donde el individuo tiene una mutación en la proteína ribosómica seleccionada entre RPS7, RPS10, RPS19, RPS24, PRS26, RPS17, PRS27L RPS29, RPL35A, PRL5 y PPL11; o en donde el individuo tiene una mutación en una proteína ribosómica seleccionada entre el grupo que consiste en: rPL2A, rPL2B, rPL3, rPL4A, rPL4B, rPL7A, rPL7B, rPL10, rPL11, rPL16A, rPL17A, rPL17B, rPL18A, rPL18B, Rpl19A, rPL19, rPL25, rPL29, rPL31A, rPL31B, rPL36A, rPL40A, rPS1A, rPS6A, rPS6B, rPS14A, rPS15, rPS19, rPS23B, rPS25A, rPS26B, rPS29, rPS29B y rPS31.
6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición se administra con o junto con otro agente terapéutico para tratar el defecto de proteínas ribosómicas, seleccionado entre el grupo que consiste en: corticosteroides, transfusiones de sangre.
7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cantidad eficaz aumenta el número de células eritroides CD71+ o los niveles de hemoglobina en el individuo.
8. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el individuo tiene un síntoma de anemia macrocítica o anomalías craneofaciales; o un síntoma de médula ósea displásica; o un síntoma seleccionado entre: insuficiencia pancreática, disfunción de la médula ósea, deformidades esqueléticas; o un síntoma de deformidades craneofaciales.
9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la ribosomopatía es mielodisplasia, mielodisplasia 5q, síndrome de Shwachman-Diamond o Síndrome de Treacher Collins.
10. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el individuo tiene una mutación en Rps14 o una disminución en la expresión de Rps14, una mutación en Sbds o una mutación en TCOF1 (nucleolar).

Anemia de Diamond-Blackfan

Características clínicas	Tratamiento	Genes asociados
<ul style="list-style-type: none">• Aplasia de glóbulos rojos• Anomalías craneofaciales y estructurales• Predisposición al cáncer	<ul style="list-style-type: none">• Esteroides• Transfusiones• Trasplante de médula ósea* Alto porcentaje de mortalidad por complicaciones	<p>RPS19, RPS29, RPS17, RPS24, RPS7, RPS10, RPS26, RPL35A, RPL5, RPL11, GATA1, TSR2</p>

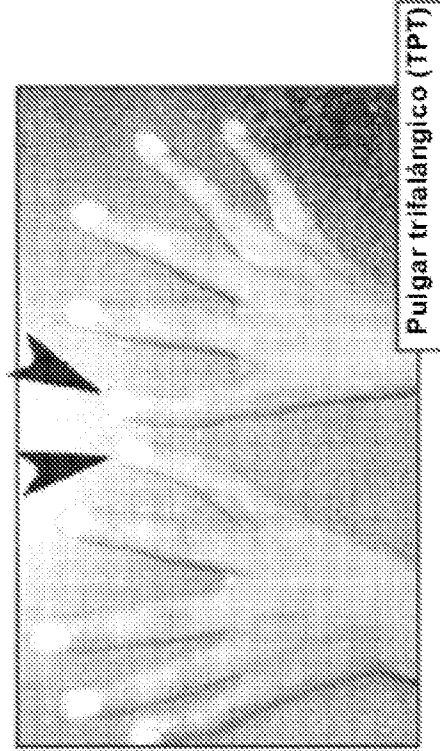


FIG. 1

Ribosomopatías adicionales

Enfermedad	Gen(es)	Características clínicas
Mielodisplasia 5q	RPS14	Médula ósea displásica
Síndrome de Schwachman-Diamond	SBDS: participa en la unión de subunidades ribosómicas	Insuficiencia pancreática, hematopoyesis defectuosa, aumento del riesgo de leucemia
Síndrome de Treacher Collins	TCOF1: necesario para la transcripción del ADN ribosómico	Anomalías craneofaciales

FIG. 2

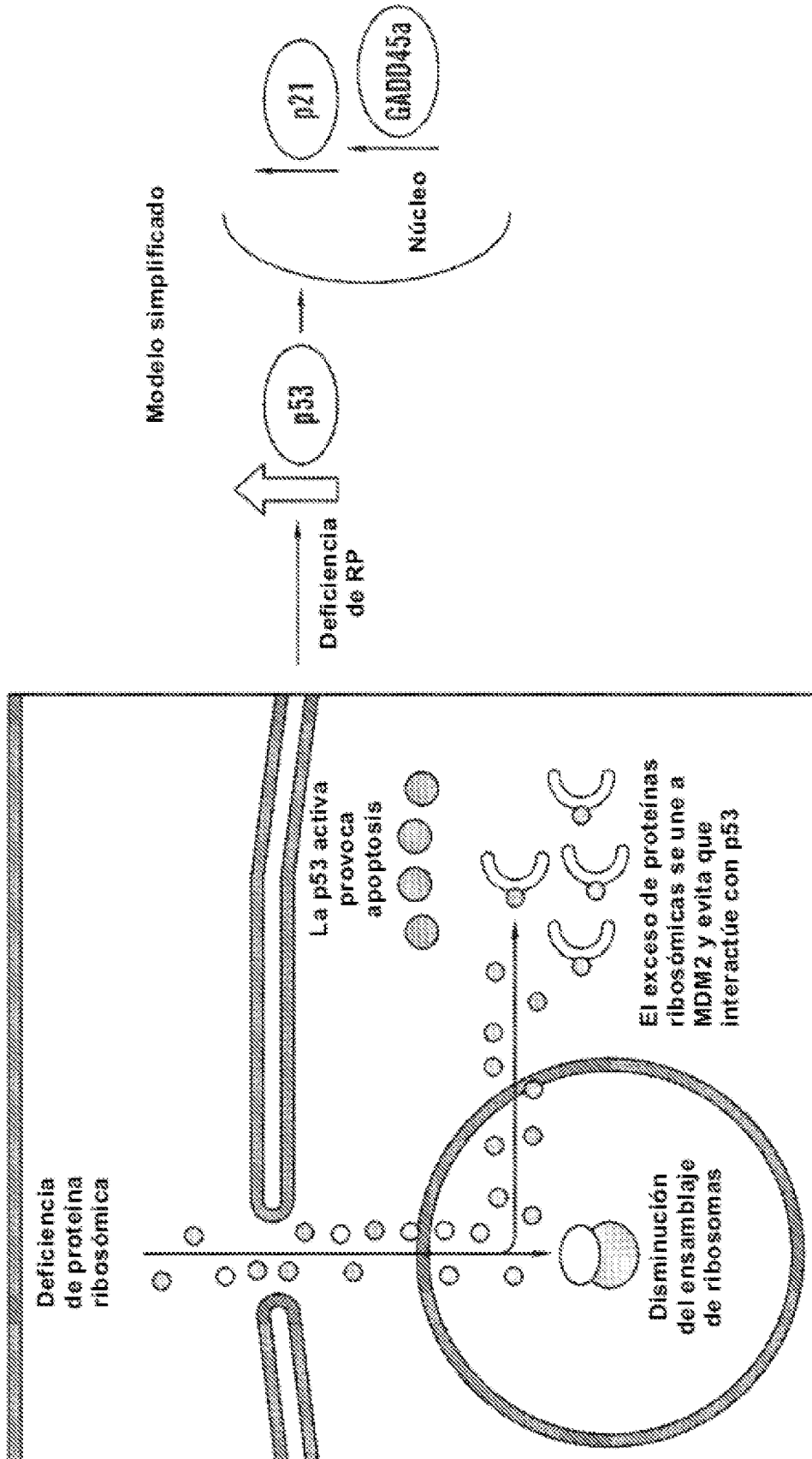


FIG. 3

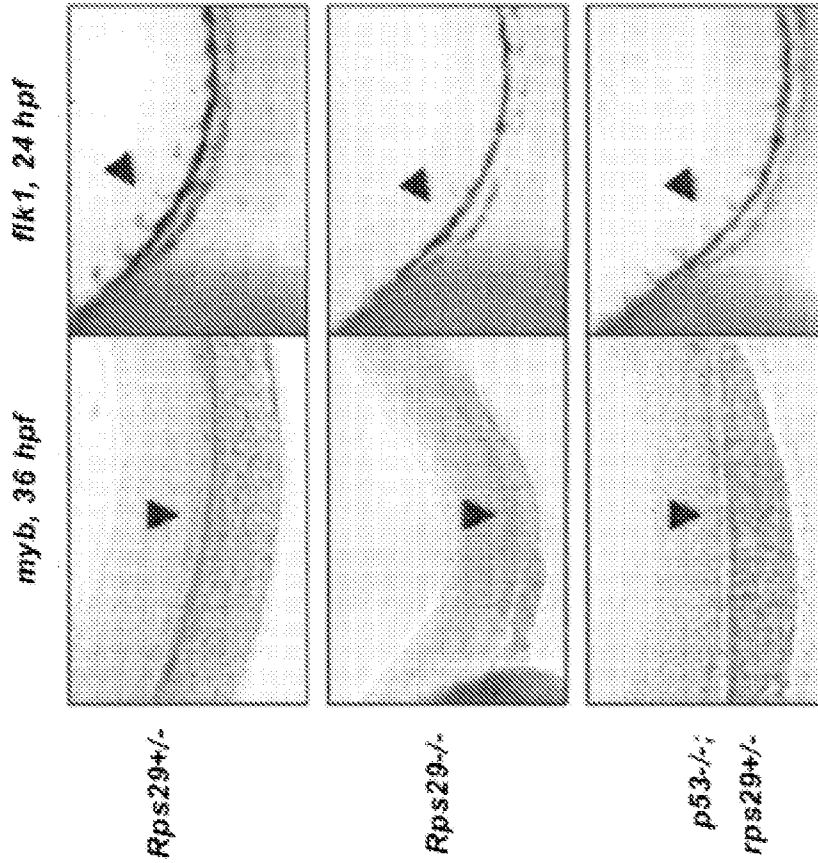
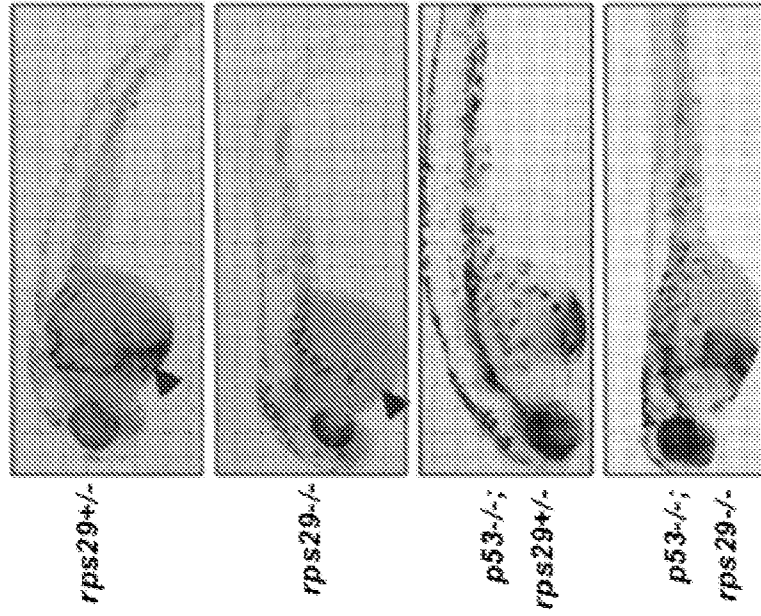


FIG. 4B

FIG. 4A

Bencidina 40hpf

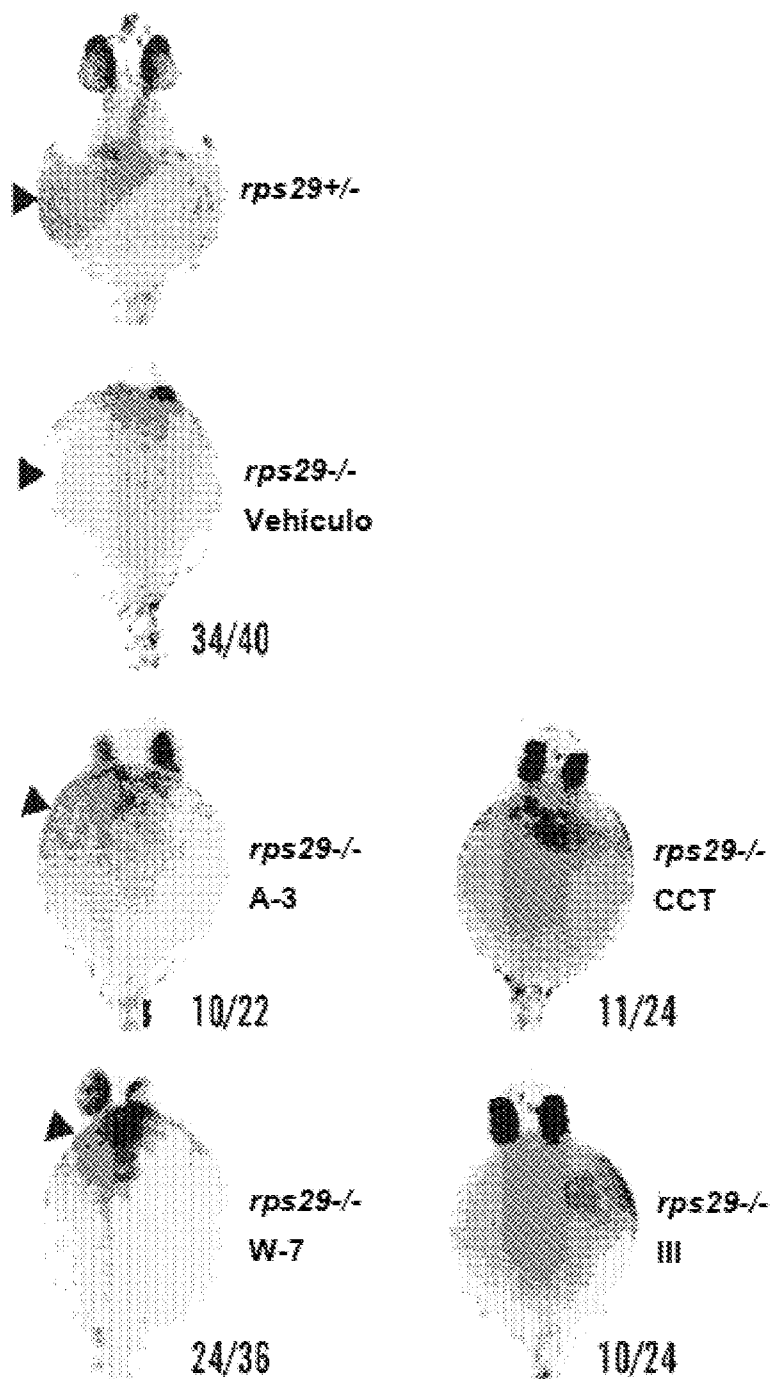


FIG. 5A

Inhibidores de CaM

Inhibidores de Chk2

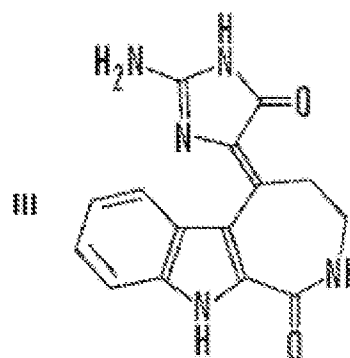
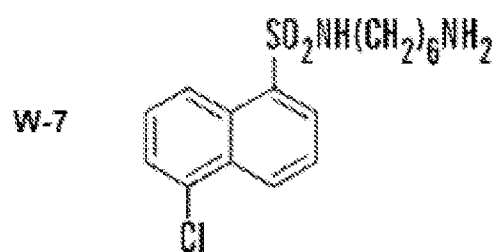
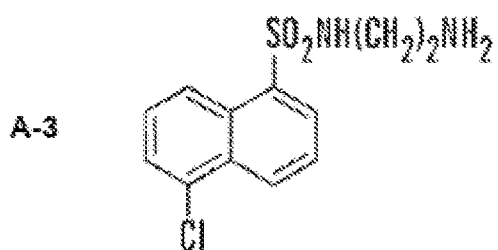
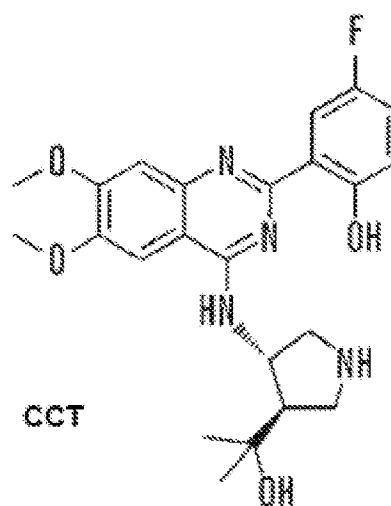
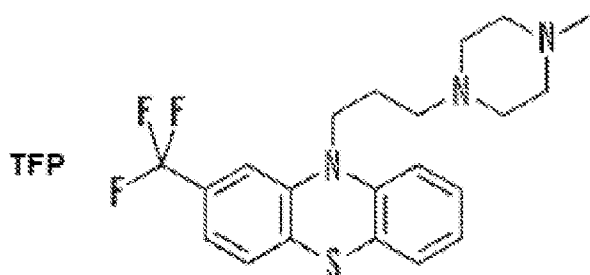


FIG 5B

Calmodulina (CaM)

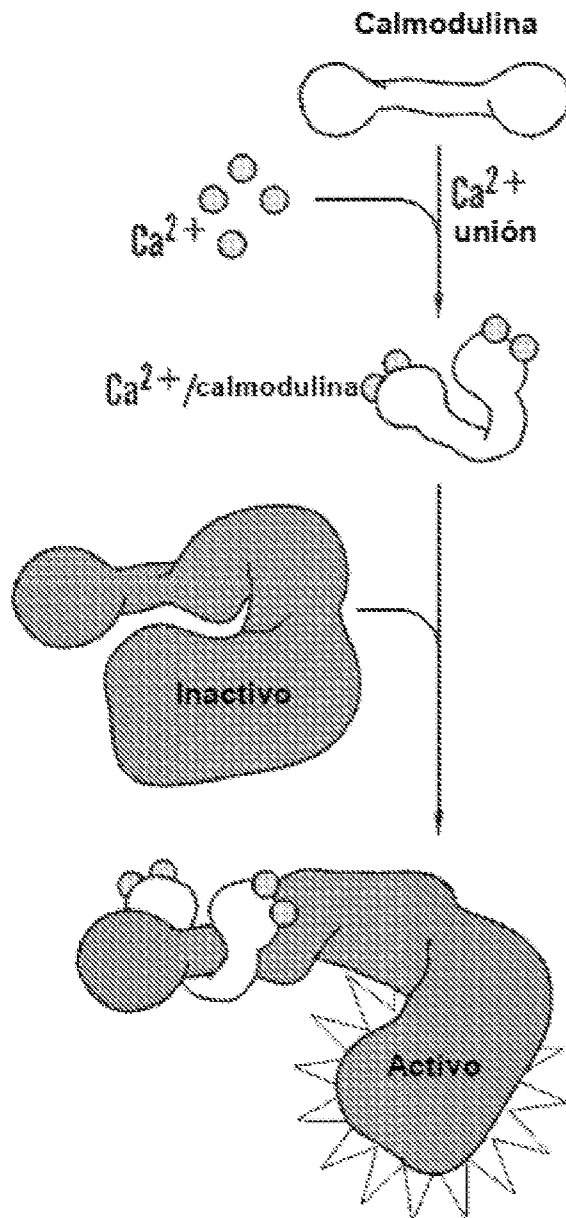


FIG. 6

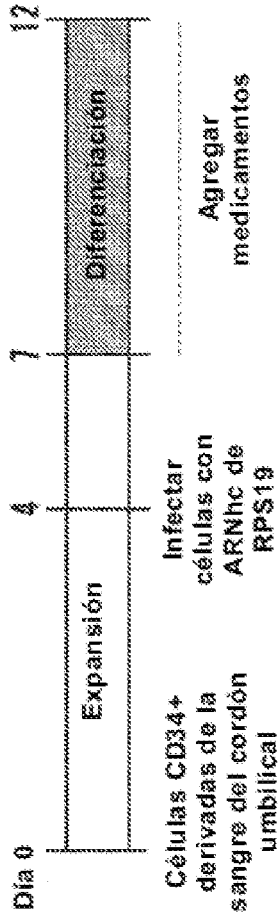


FIG. 7A

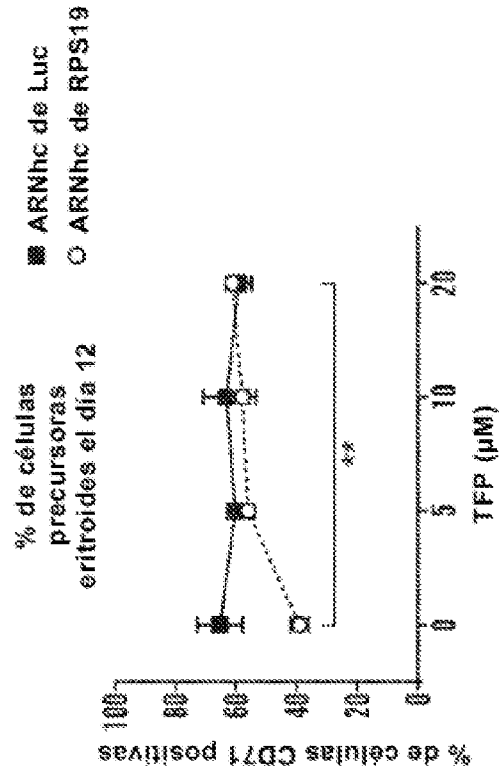


FIGURA 7B

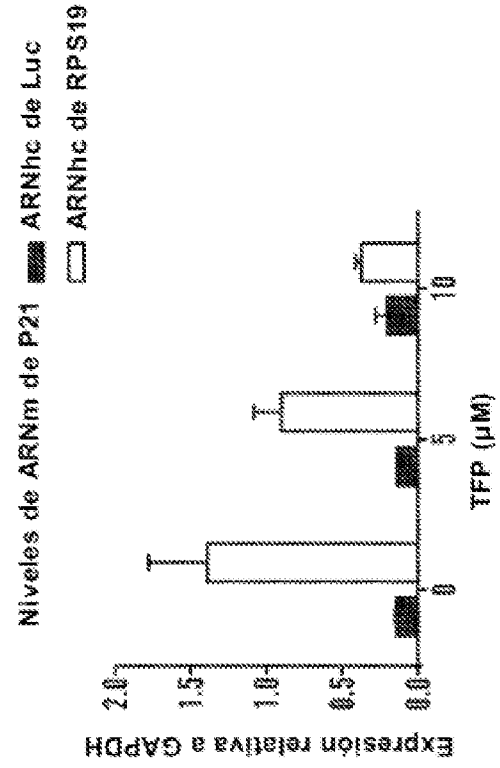


FIGURA 7C

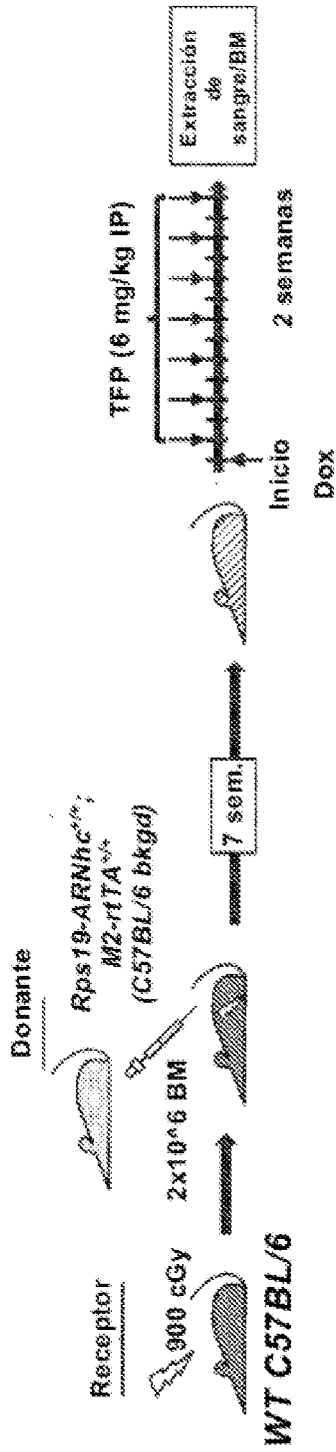


FIG. 8A

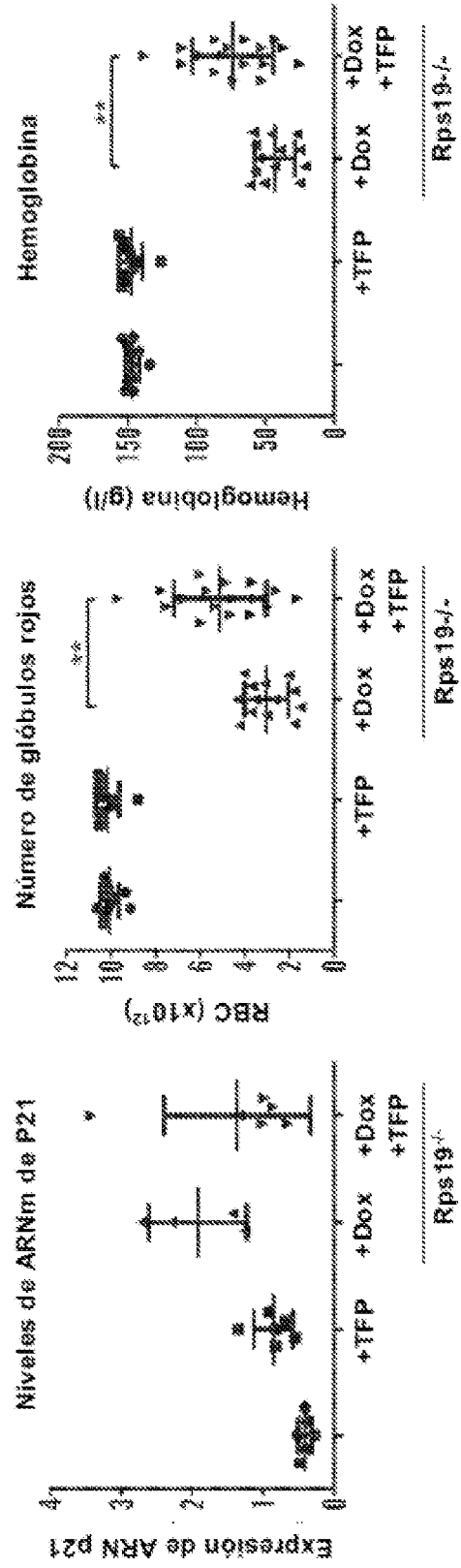


FIG. 8B

FIG. 8C

FIG. 8D

¿Qué región de p53 es responsable de la actividad de TFP?

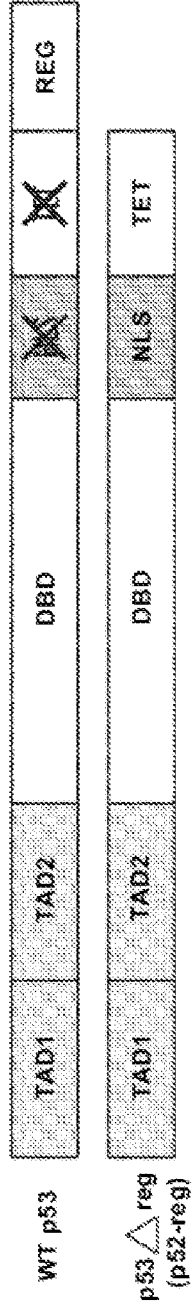


FIG. 9A

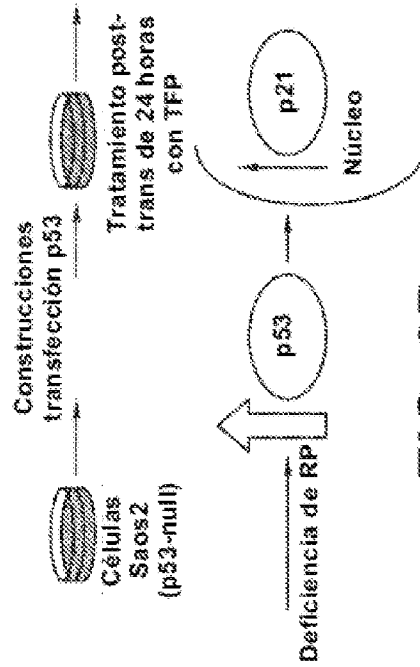


FIG. 9B

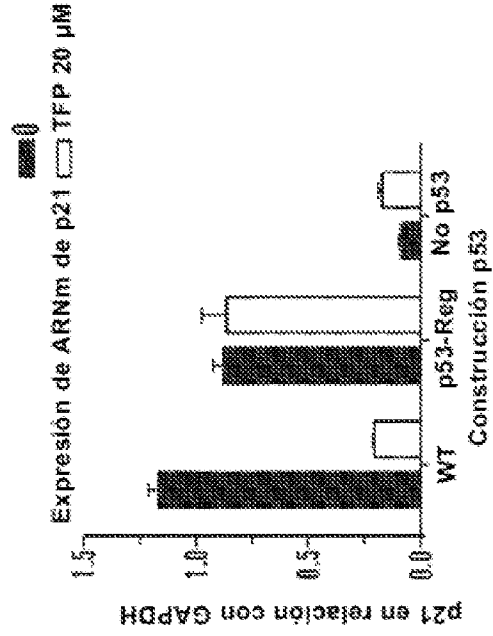
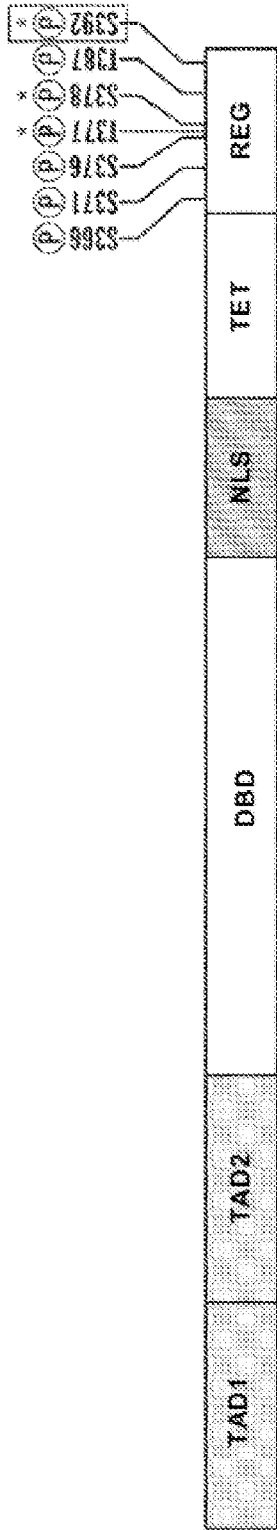


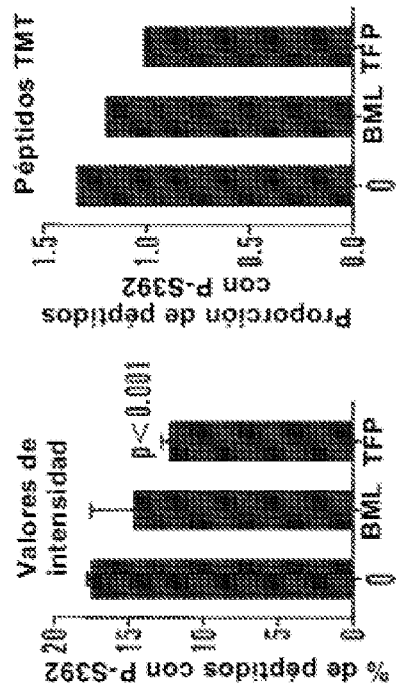
FIG. 9C



*Residuo conservado en peces cebra y ratones

FIG. 10A

Análisis por espectrometría de masas de péptidos que contienen P-S392



N = 3

FIG. 10B

24 horas de tratamiento farmacológico

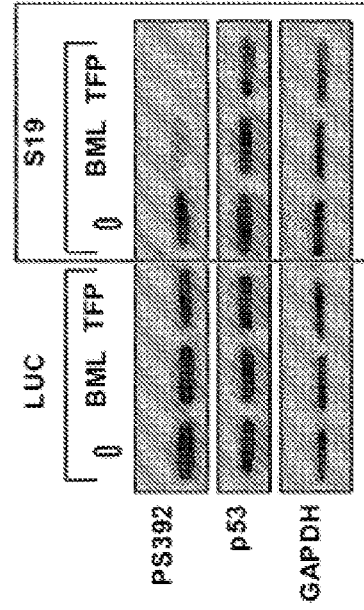


FIG. 10C

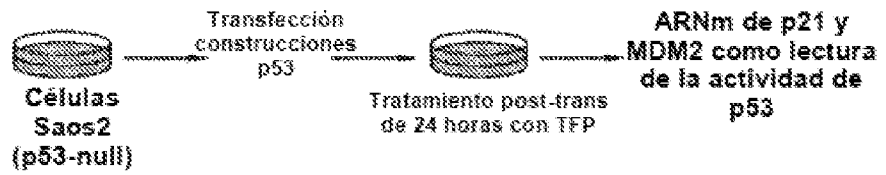


FIG. 11A

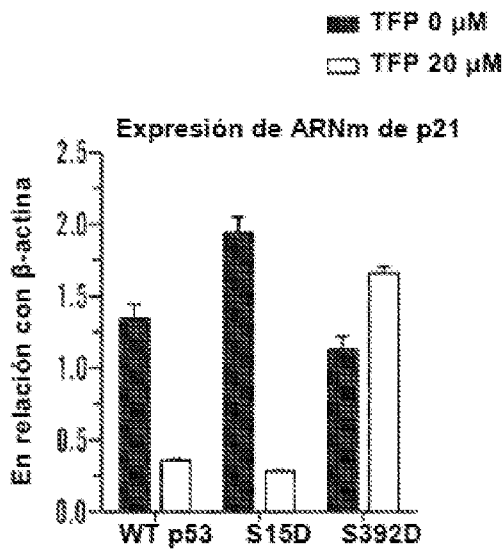


FIG. 11B

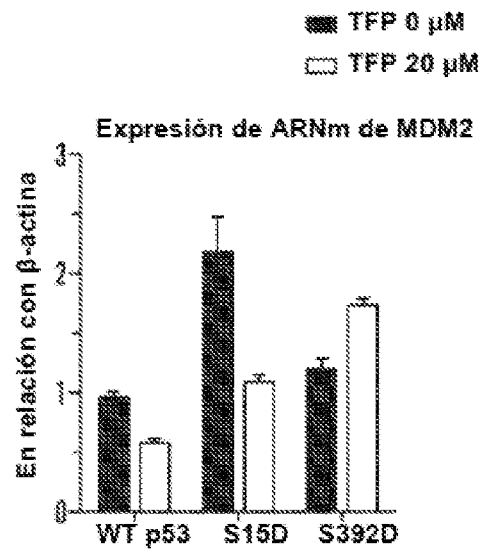


FIG. 11C

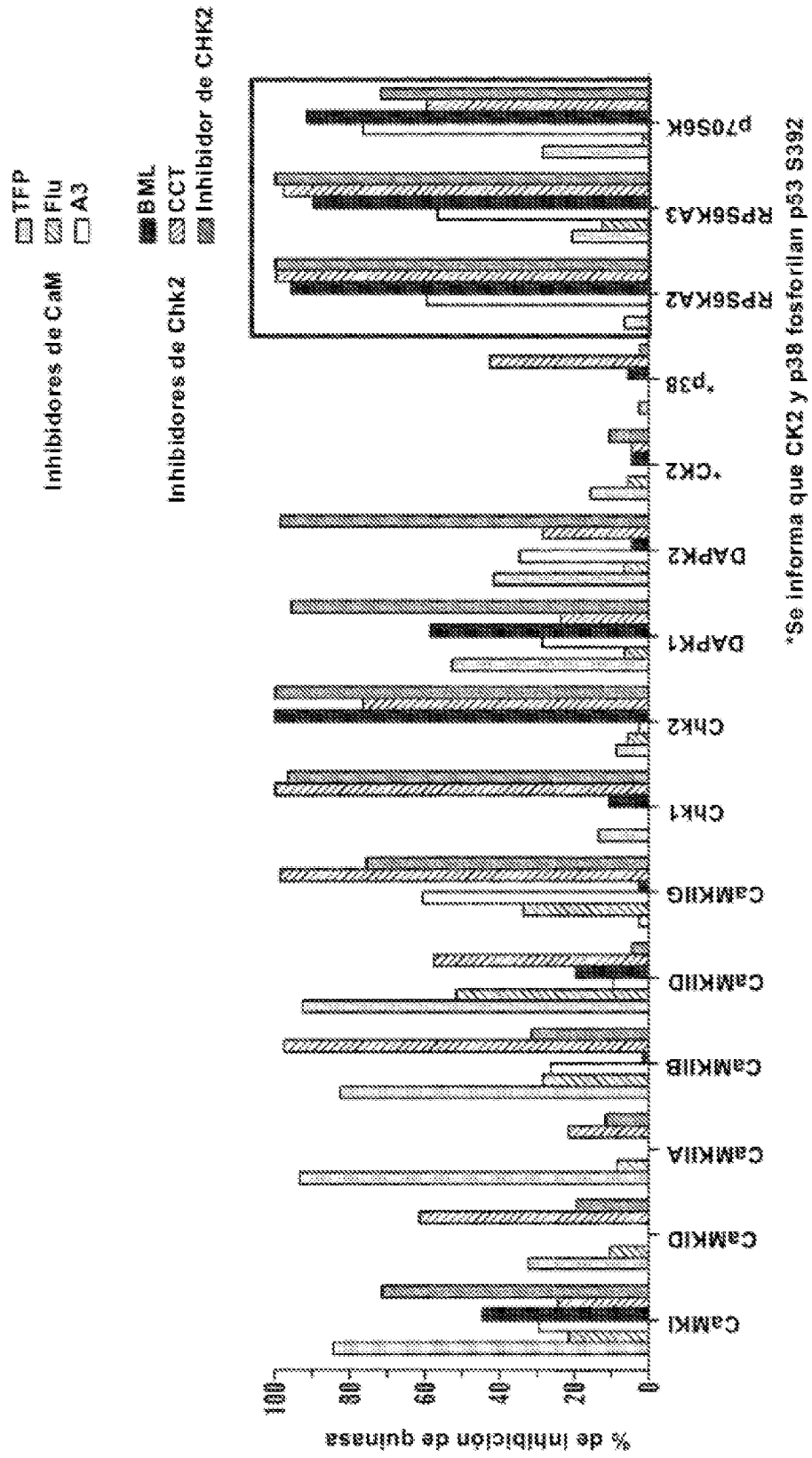


FIG. 12

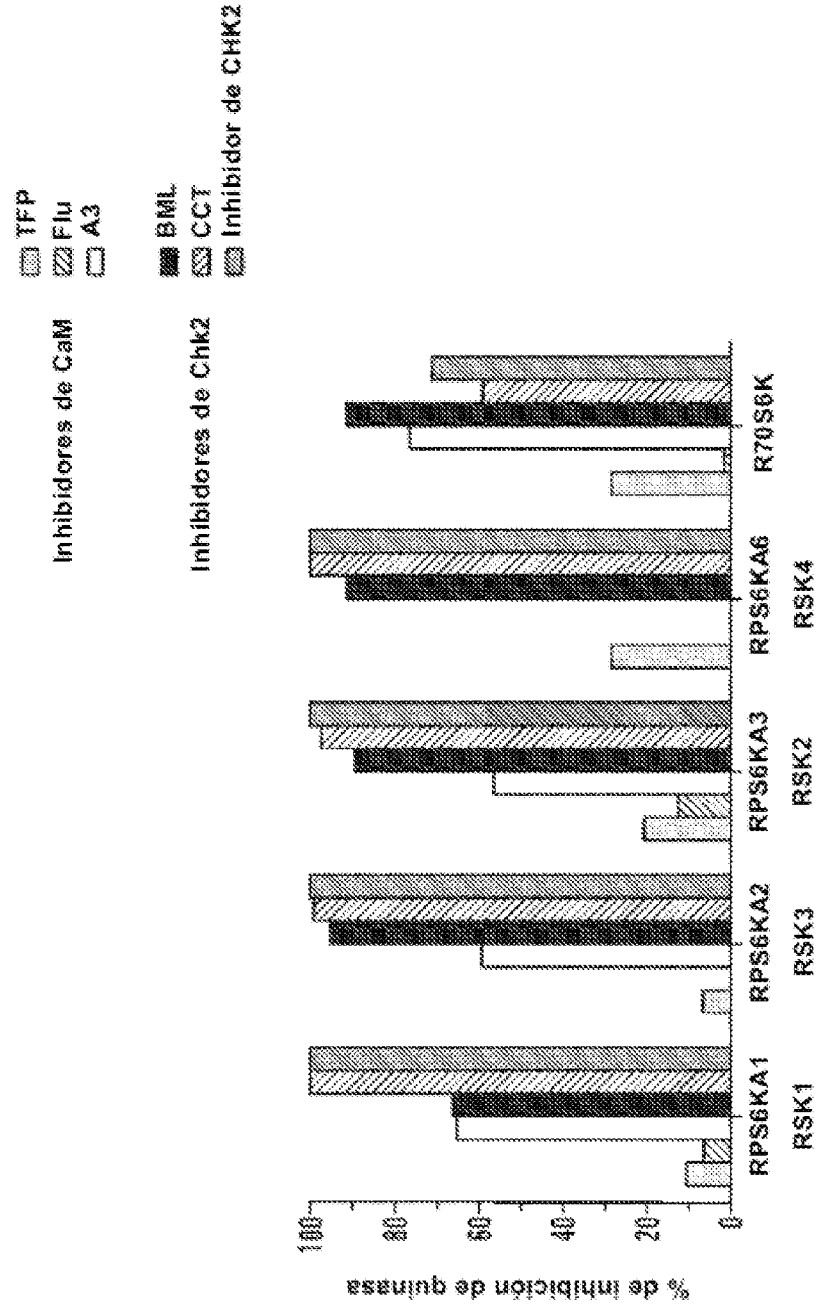
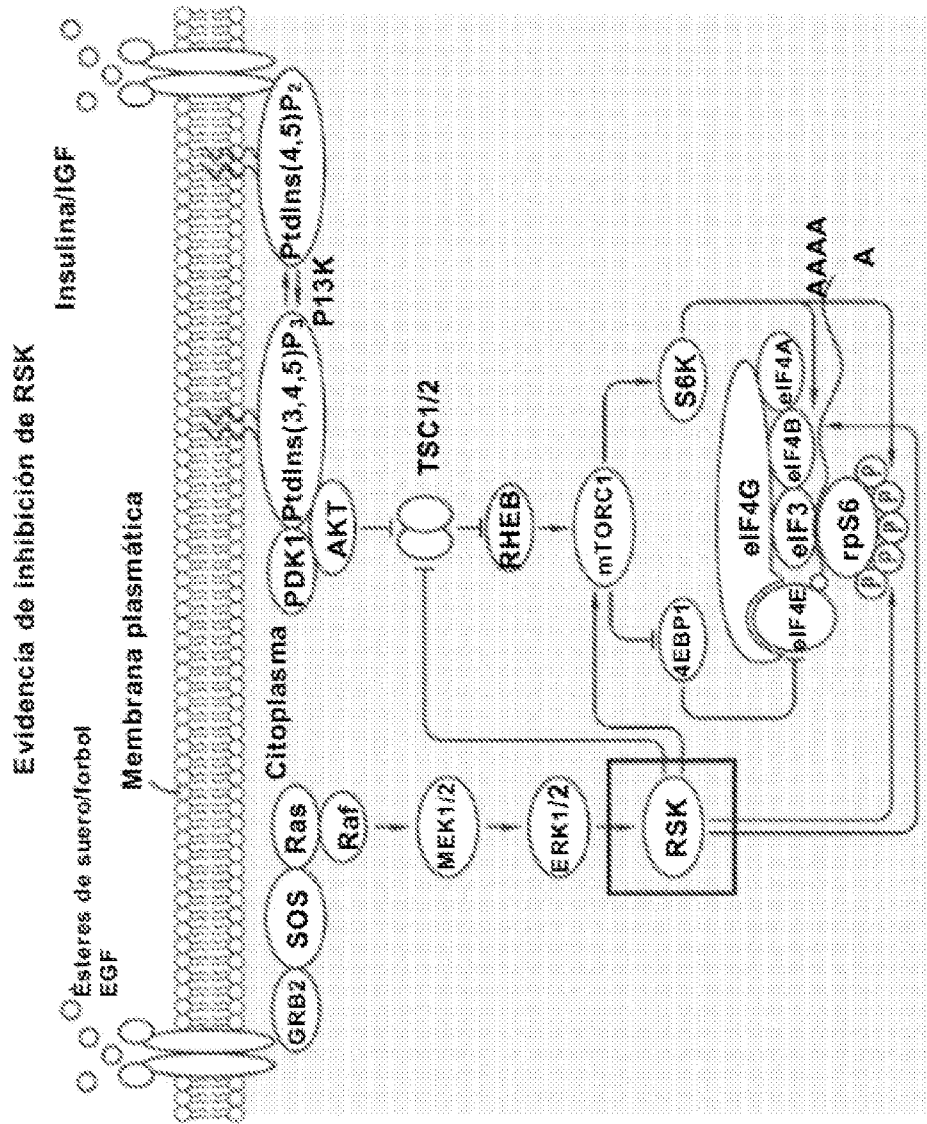


FIG. 13



De Anjum y Blenis Nature Review Molecular Cell Biology. 2008

FIG. 14

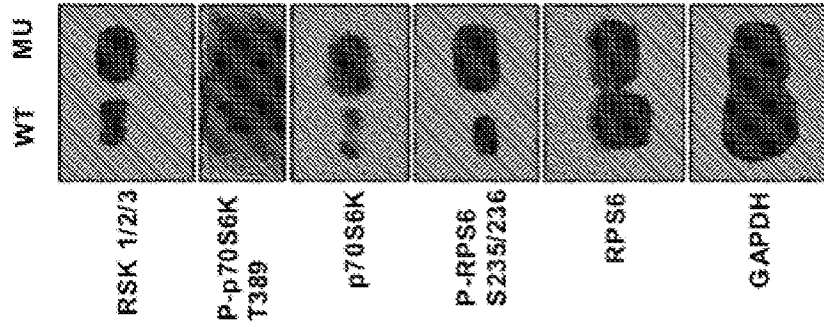


FIG. 15A

Micromatriz de *rps29^{flc}* frente a *rps29^{flc}*

Gen	Fc medio (Log2)	Media Fc	Valor q
<i>rps6KA3</i> (RSK2)	0.69486	1.618	0.03
MDM2	0.844	1.8	0.00
p53	0.49984	1.414	0.01

FIG. 15B

*P < 0,05 en comparación con DMSP

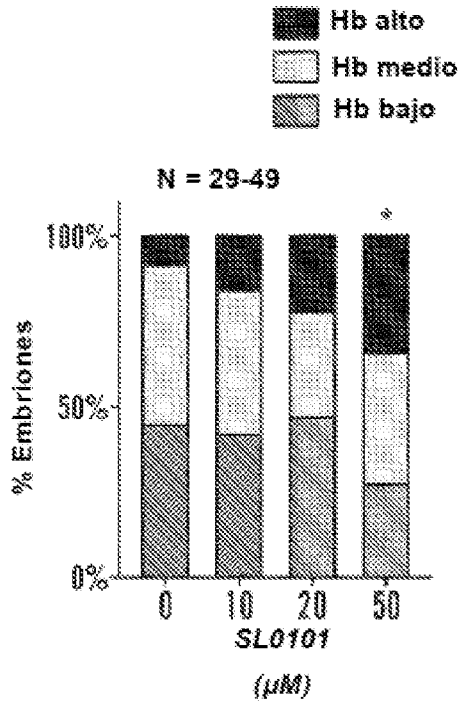


FIG. 16A

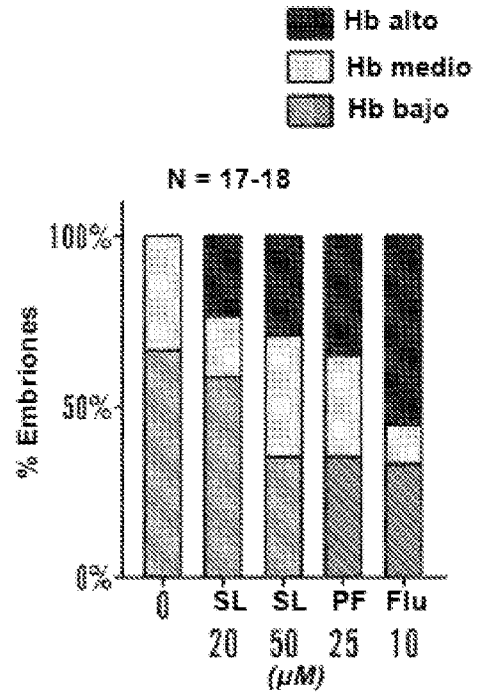


FIG. 16B

Imágenes representativas

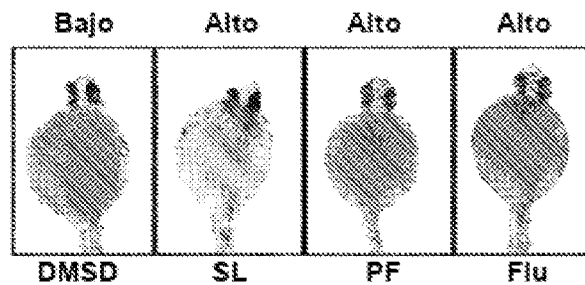


FIG. 16C

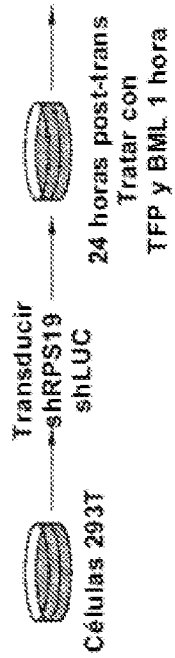


FIG. 17A

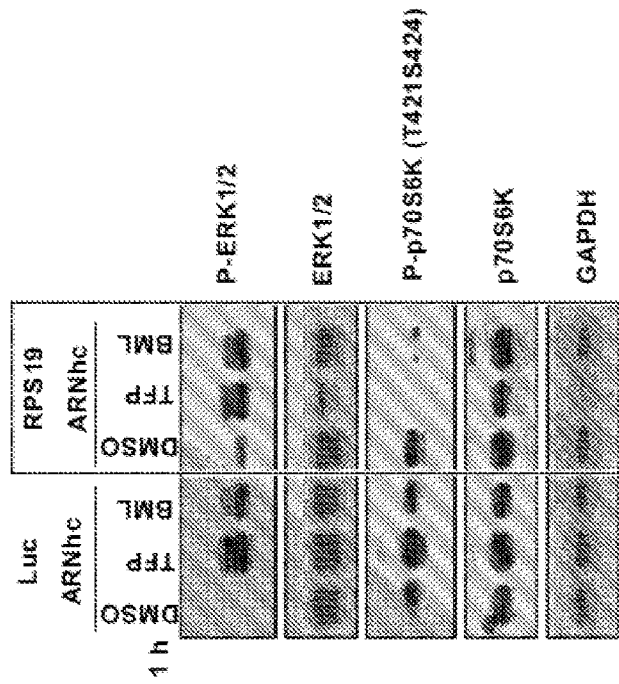


FIG. 17B

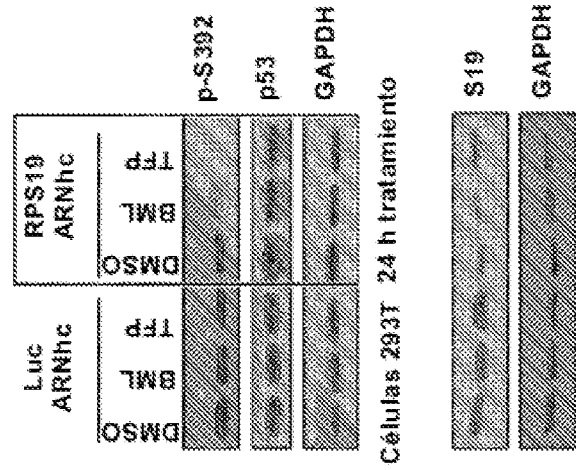


FIG. 17C

PBMC = células mononucleares de sangre periférica

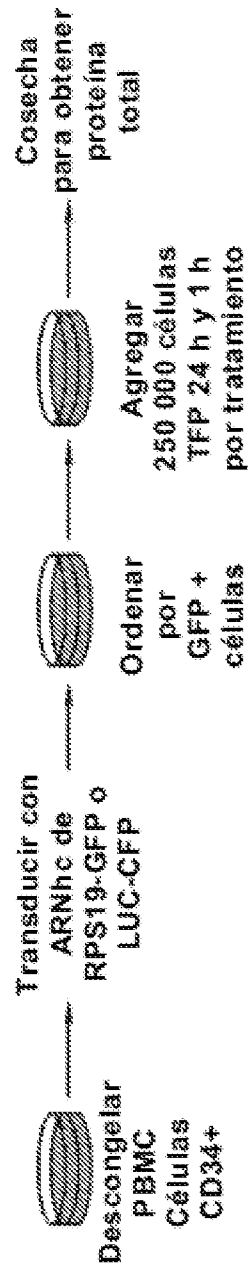


FIG. 18

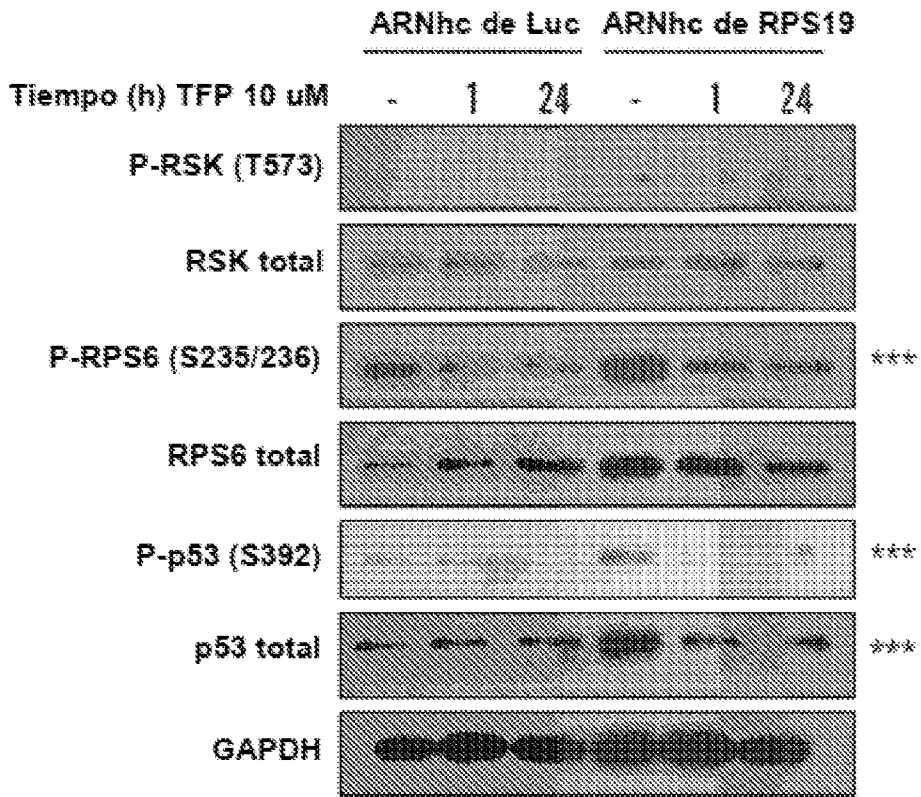


FIG. 19A

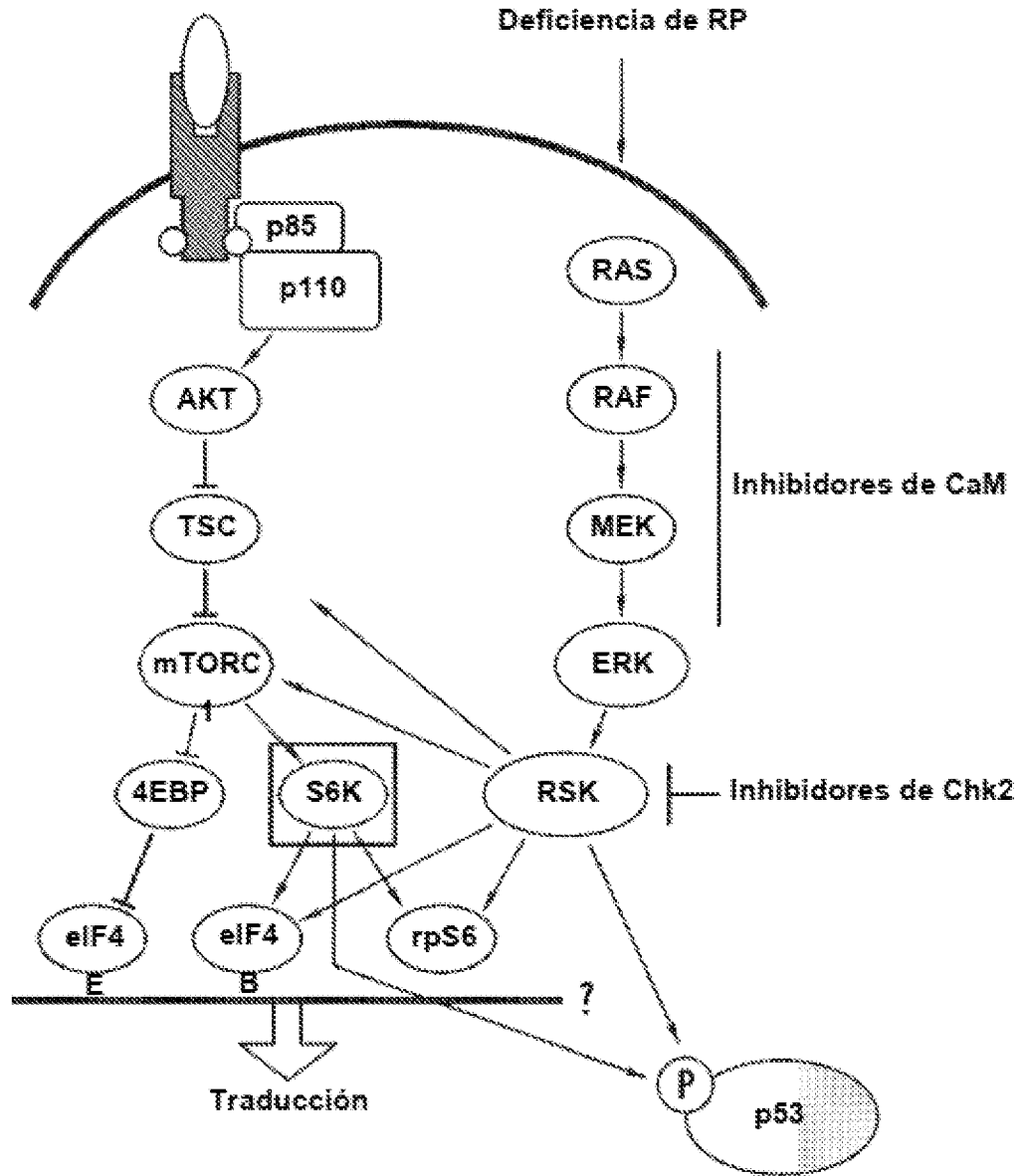


FIG. 19B

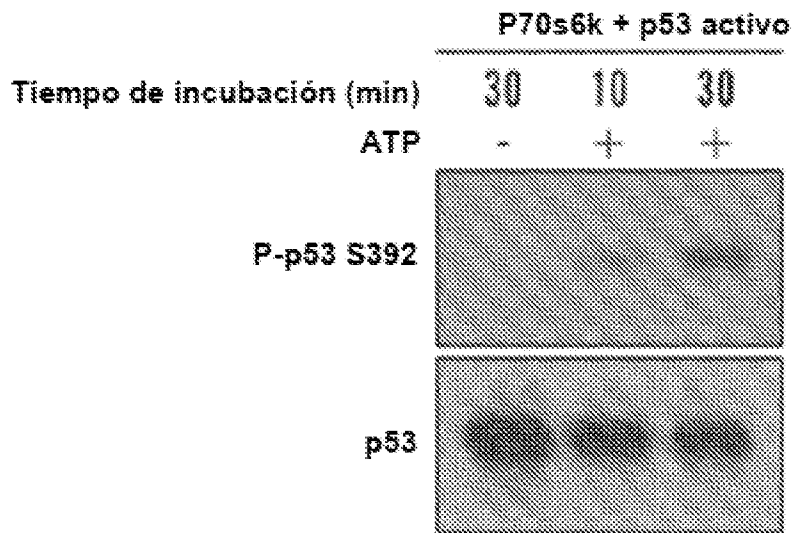


FIG. 20

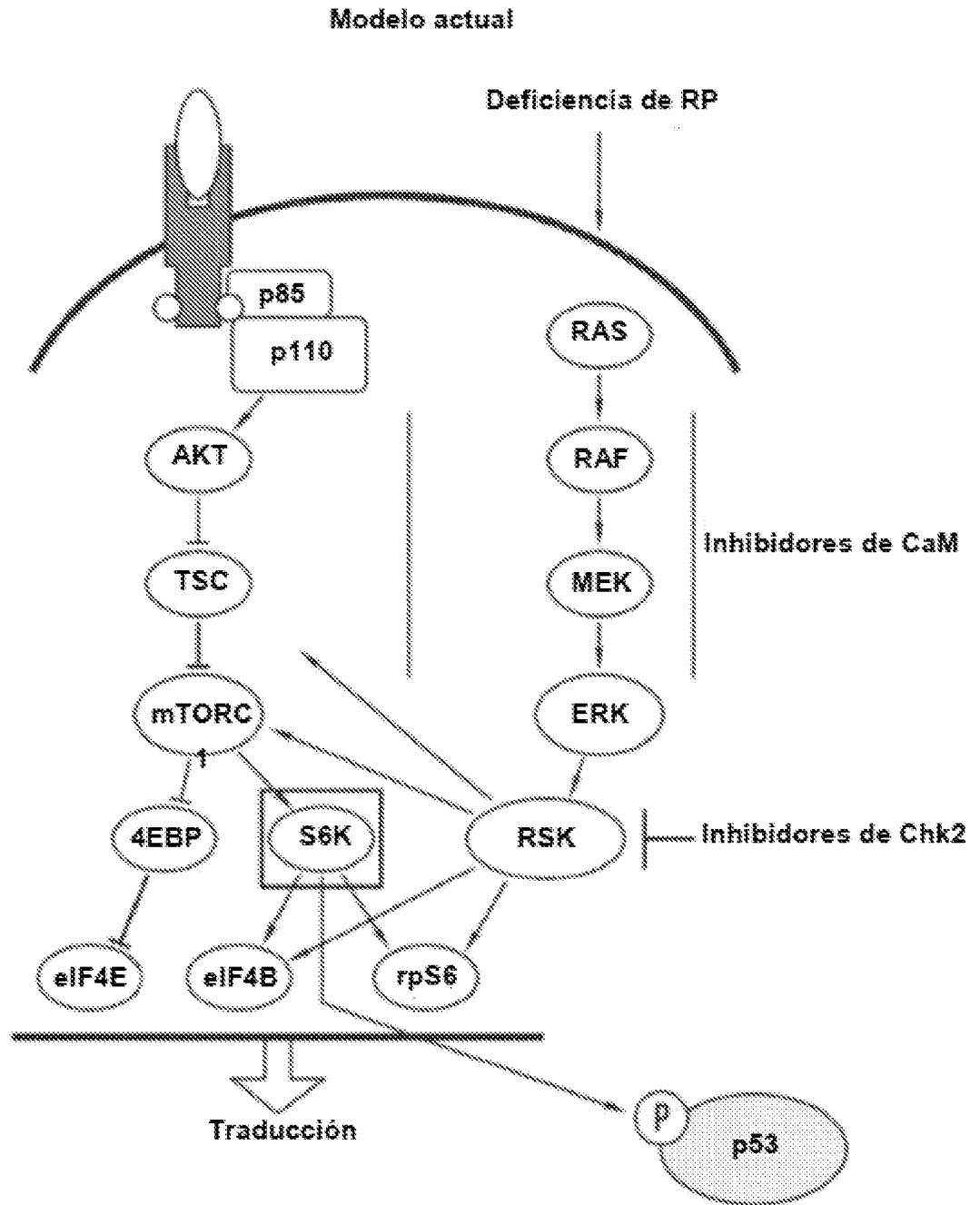


FIG. 21

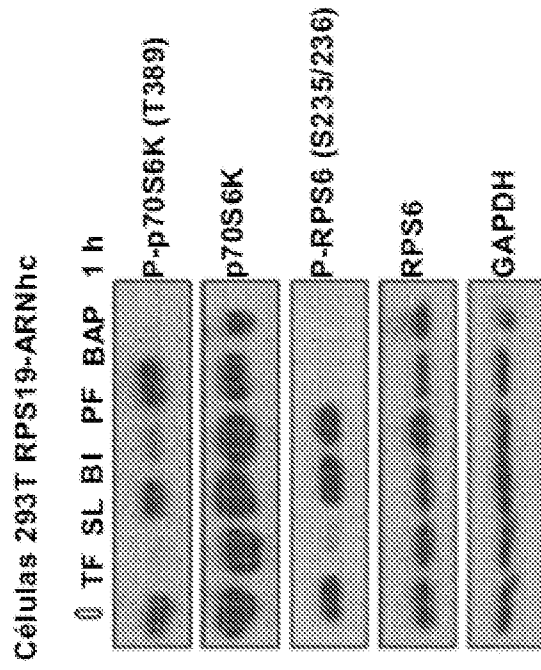


FIG. 22B

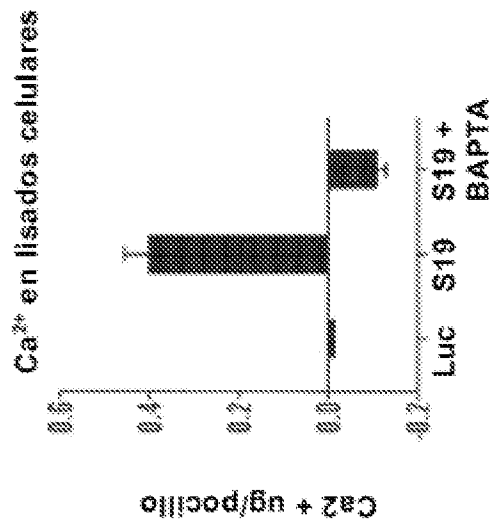


FIG. 22A

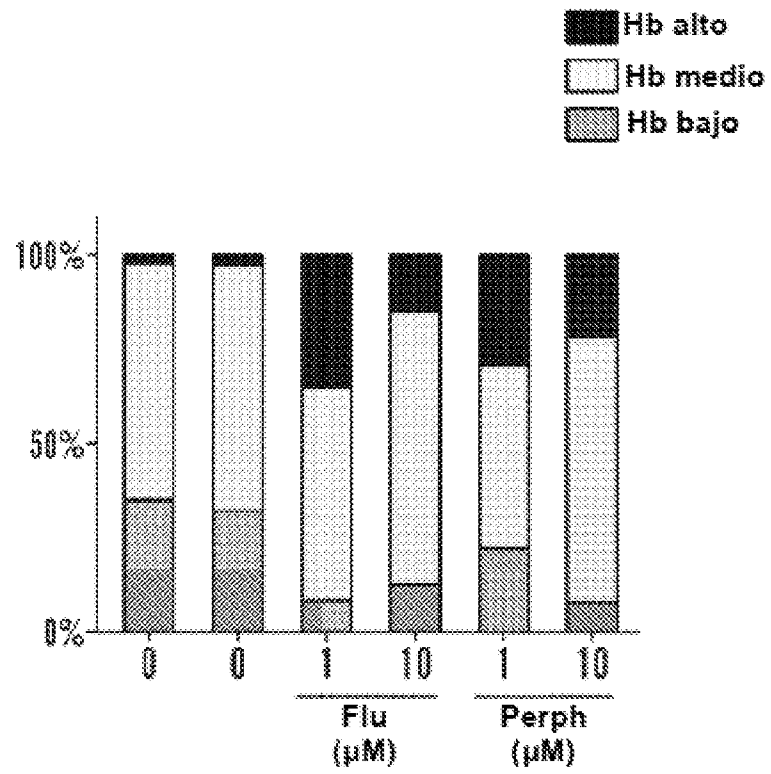


FIG. 23

Generación de derivados de fenotiazina

Síntesis 1: Diversificación sistemática de fenotiazinas.
 Los compuestos retienen el anillo de fenotiazina y diversifican la piperazina

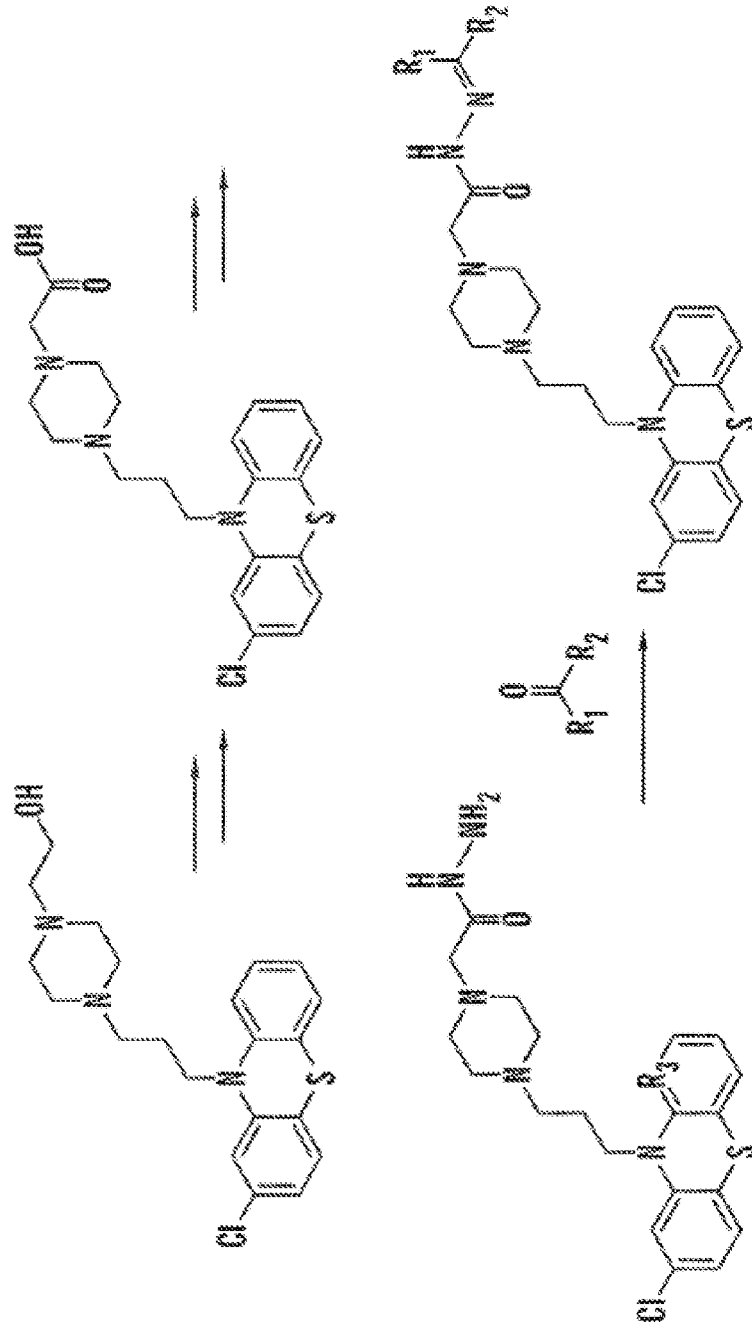


FIG. 24

Generación de derivados de fenotiazina

Síntesis 2: Biblioteca enfocada

Explorar la actividad biológica alrededor del sistema de anillo tricíclico

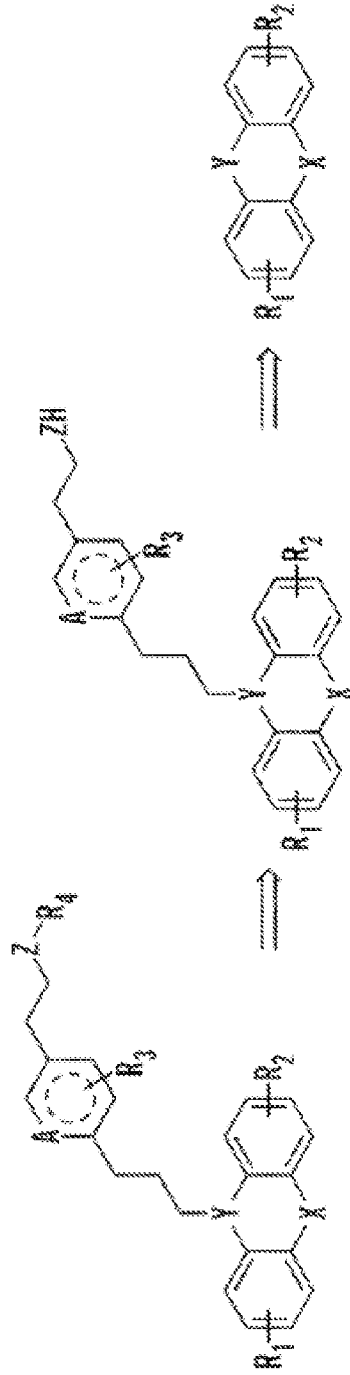


FIG. 24 (cont.)

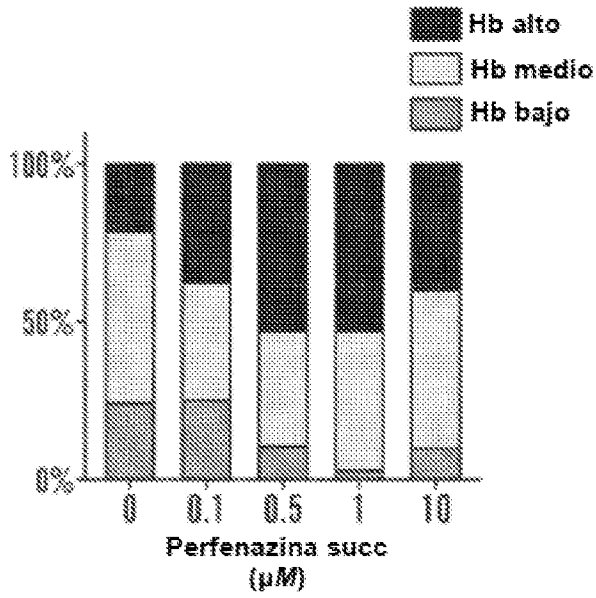


FIG. 25A

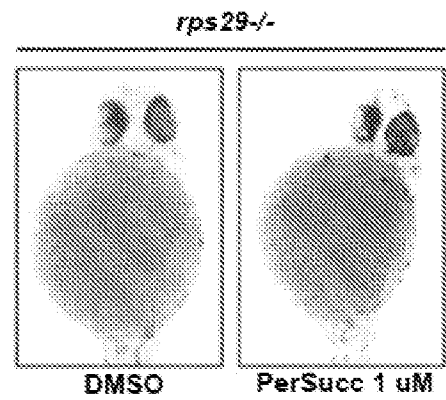


FIG. 25B

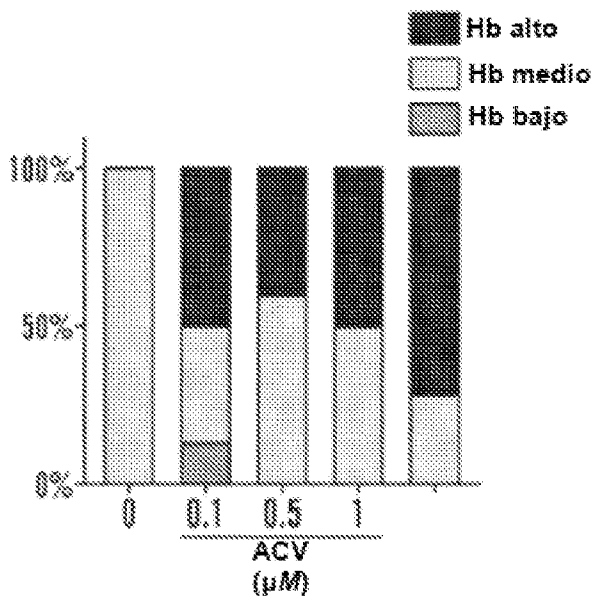


FIG. 25C

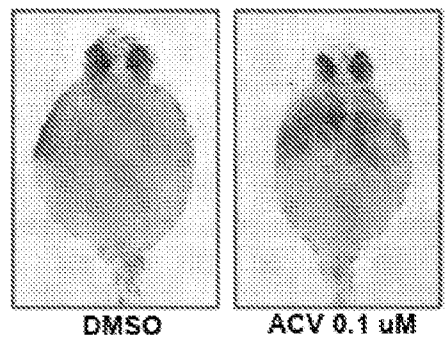


FIG. 25D

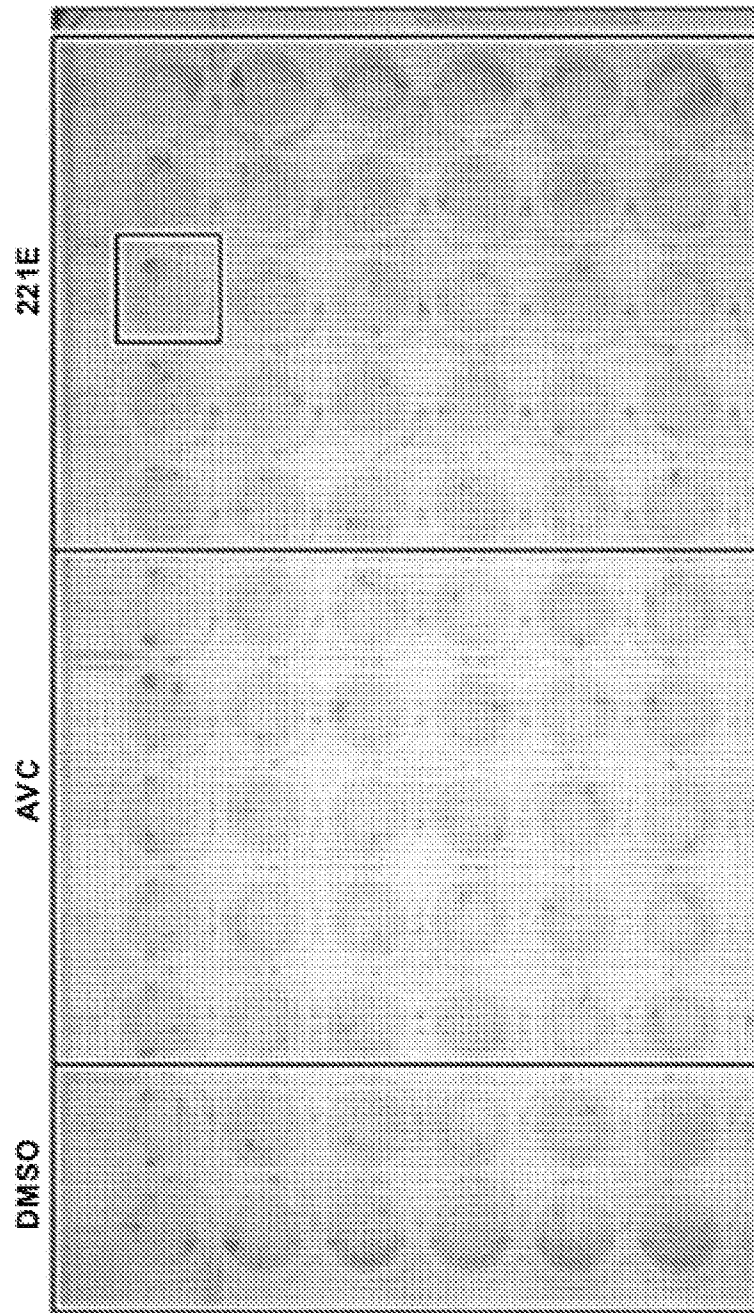


FIG. 26

Mapa de calor de la actividad de los peces

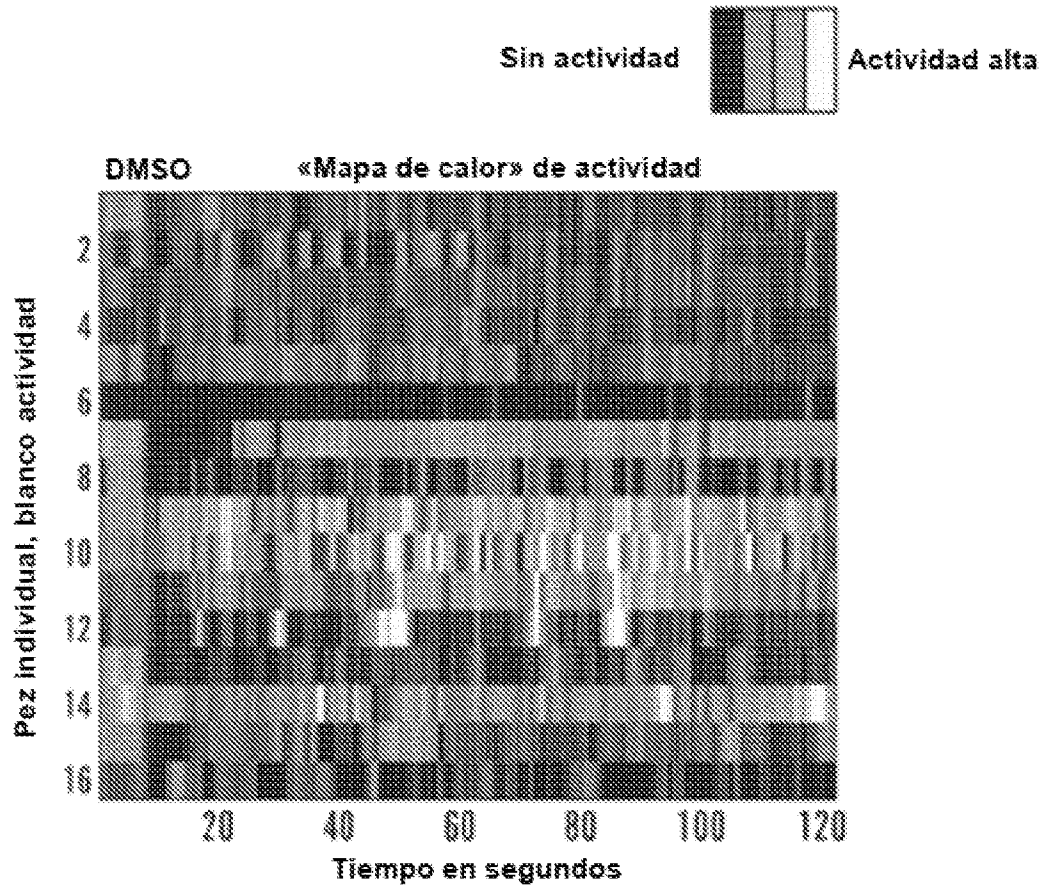


FIG. 27A

Mapa de calor de la actividad de los peces

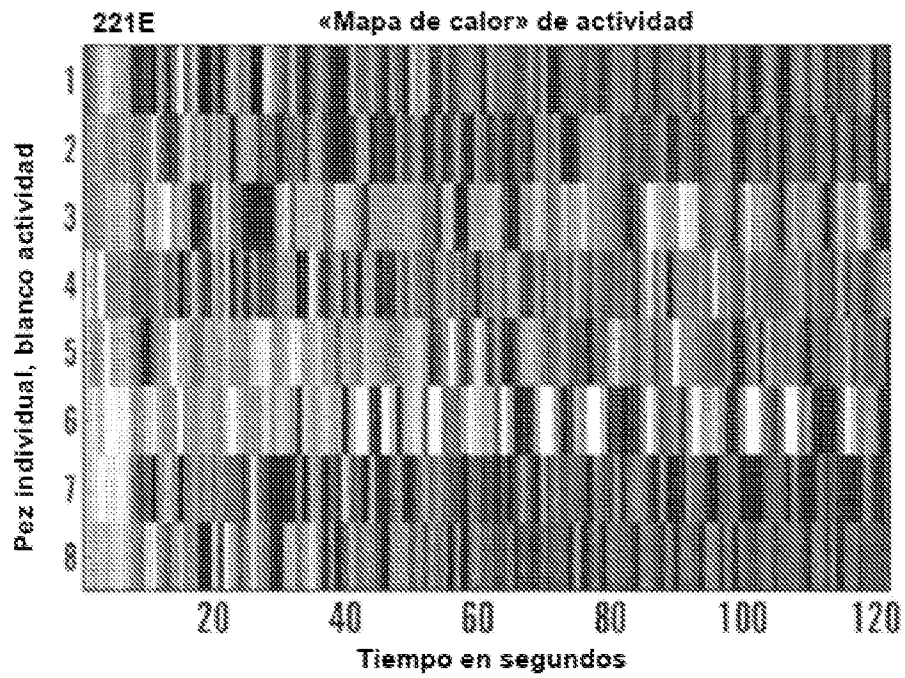
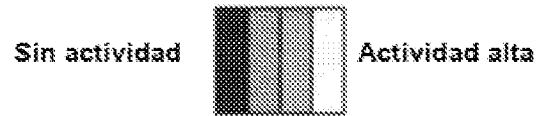


FIG. 27B

Mapa de calor de la actividad de los peces

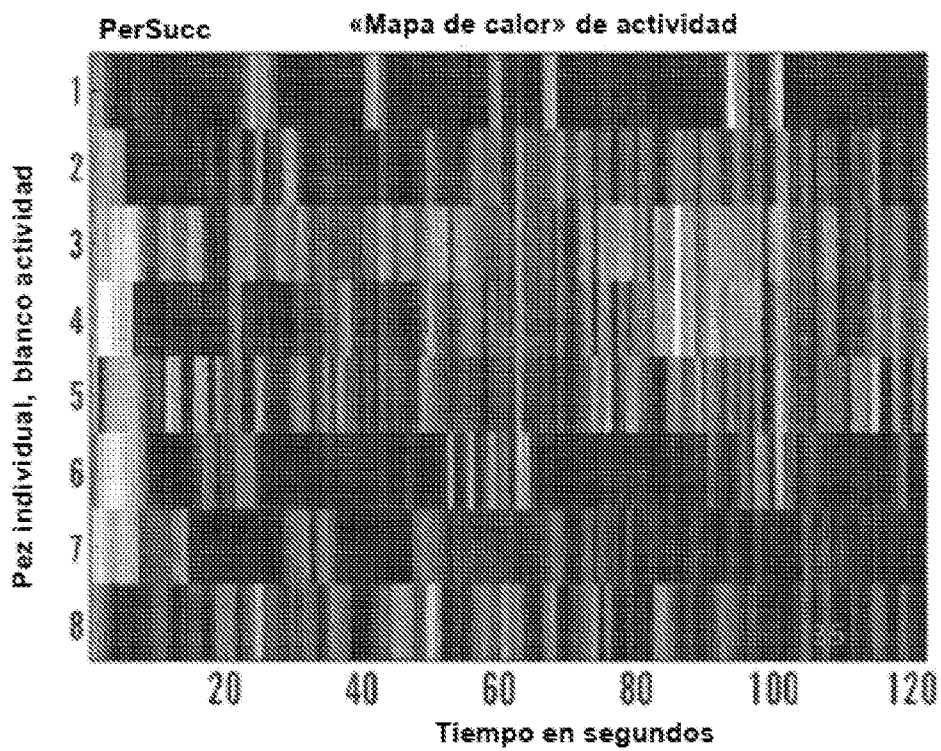
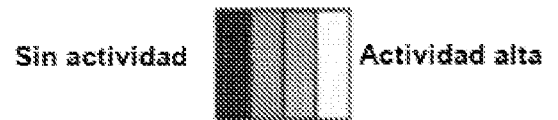


FIG. 27C

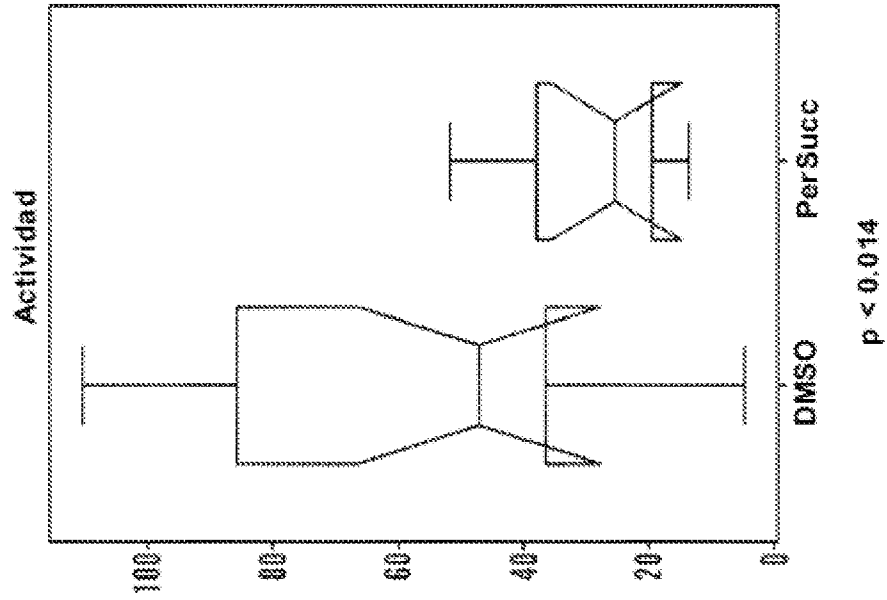


FIG. 28B

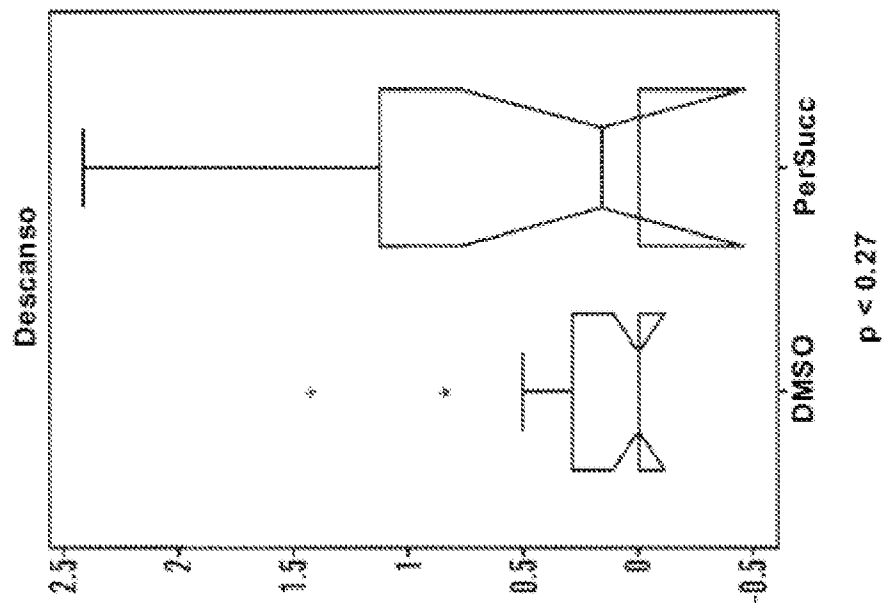


FIG. 28A

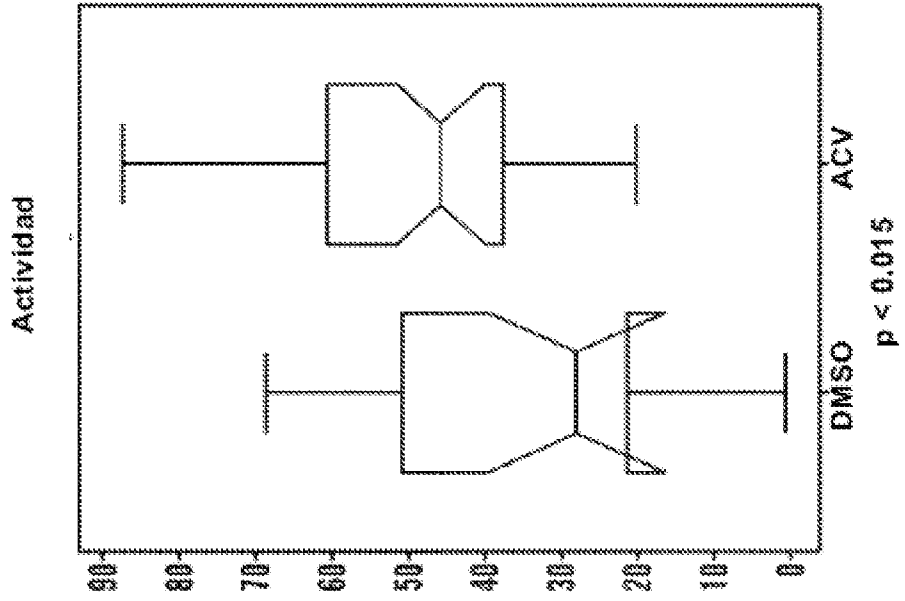


FIG. 29B

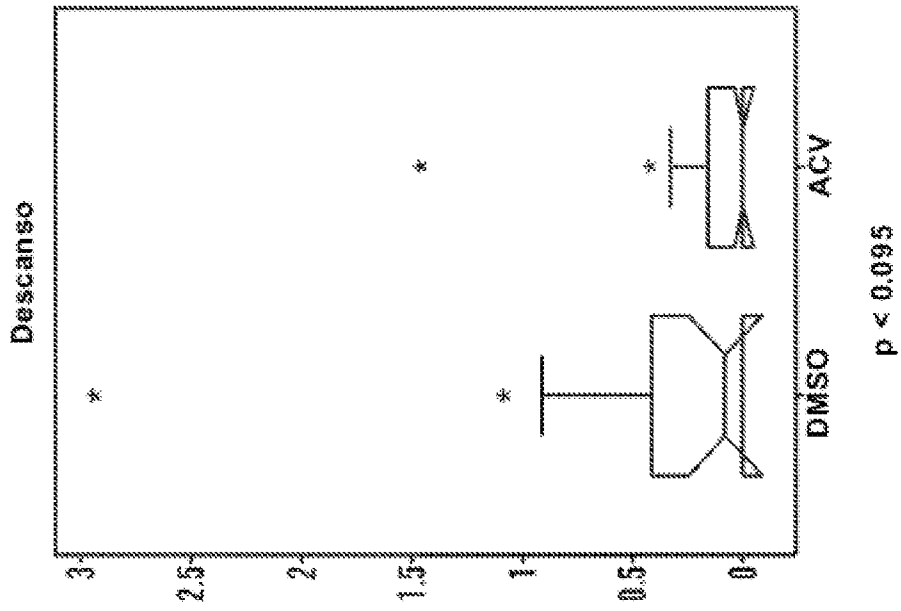


FIG. 29A

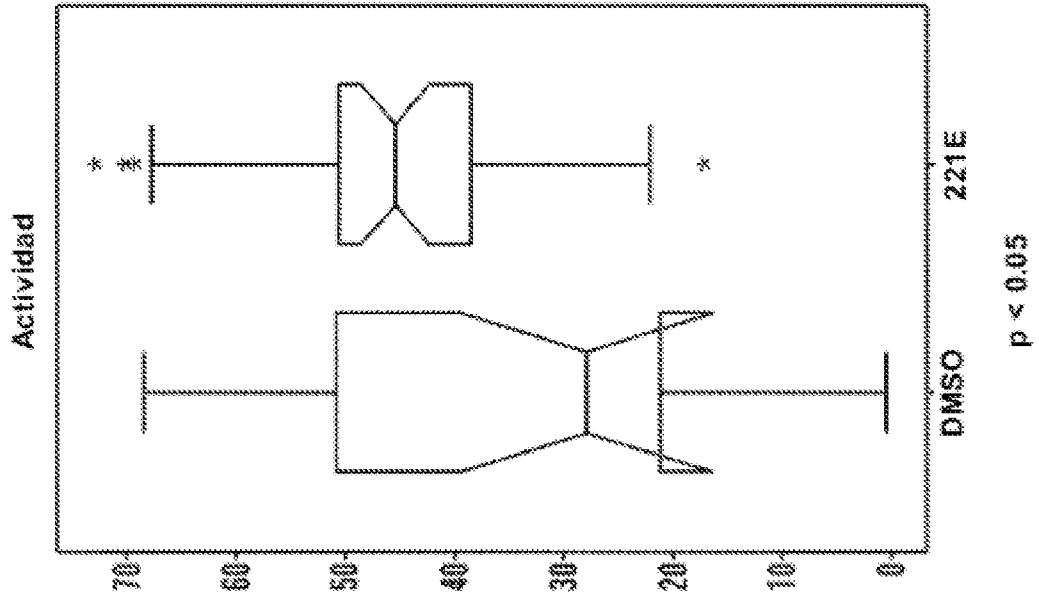


FIG. 30B

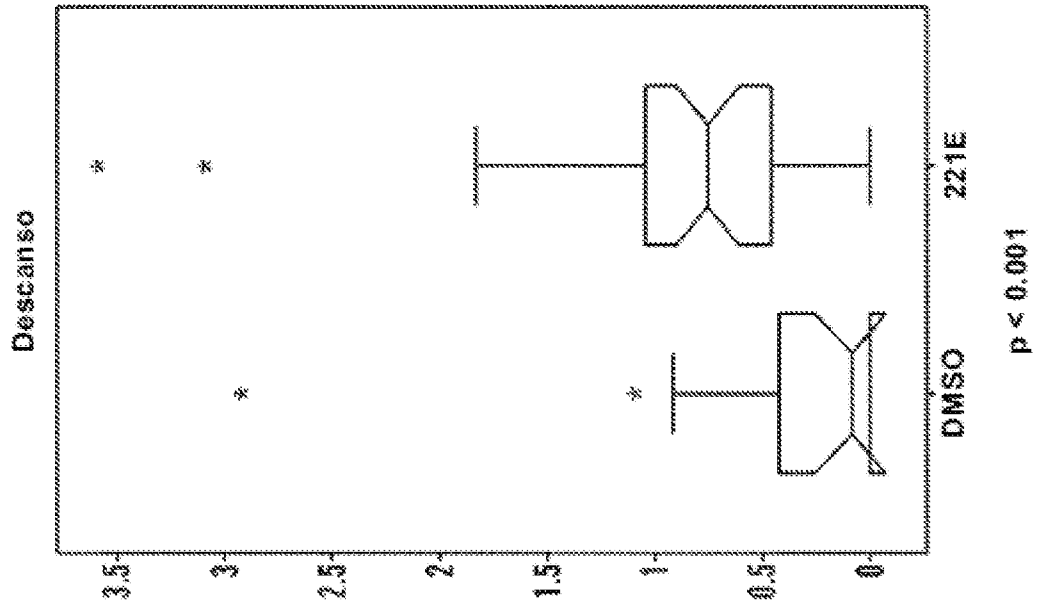


FIG. 30A

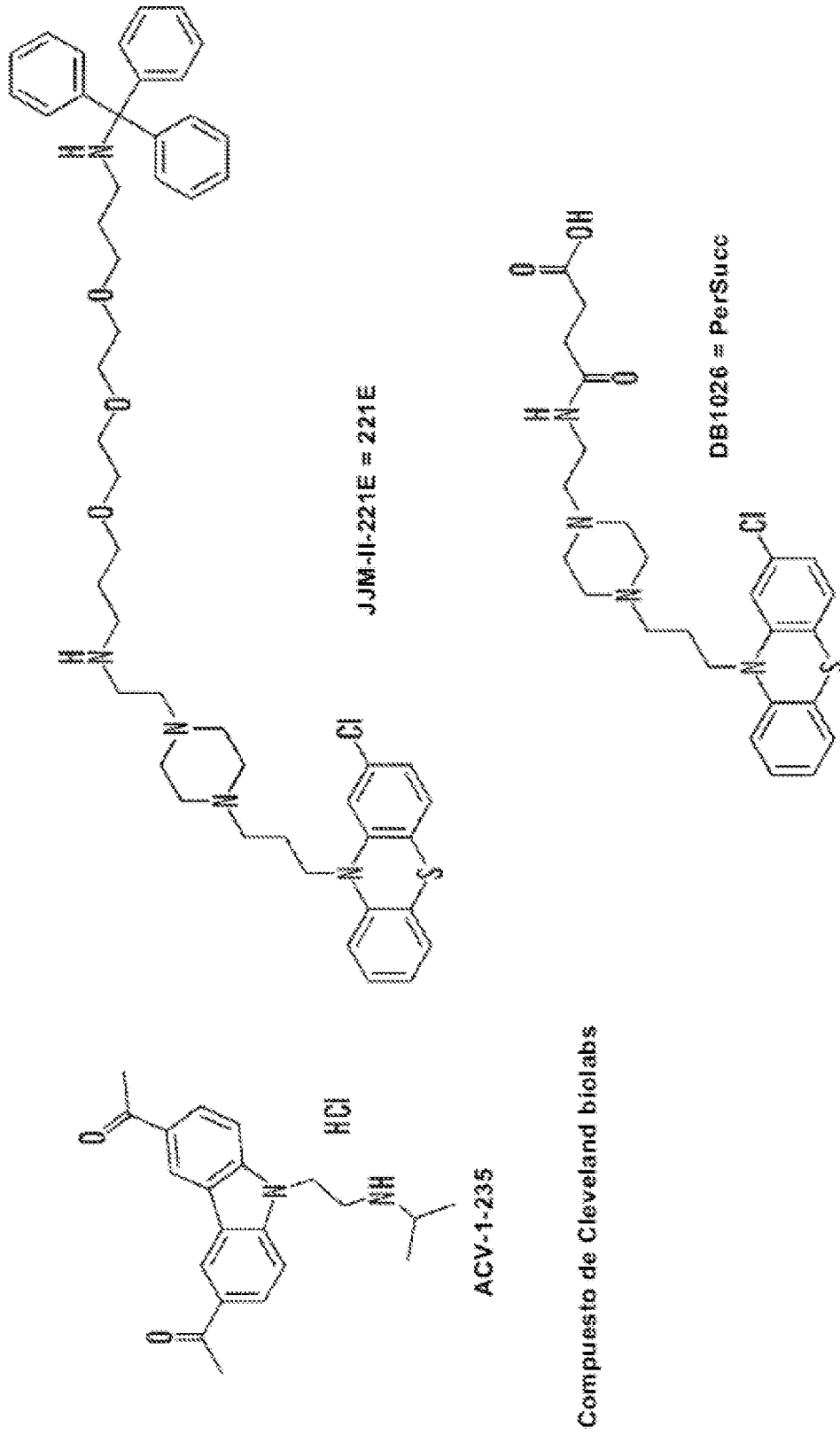
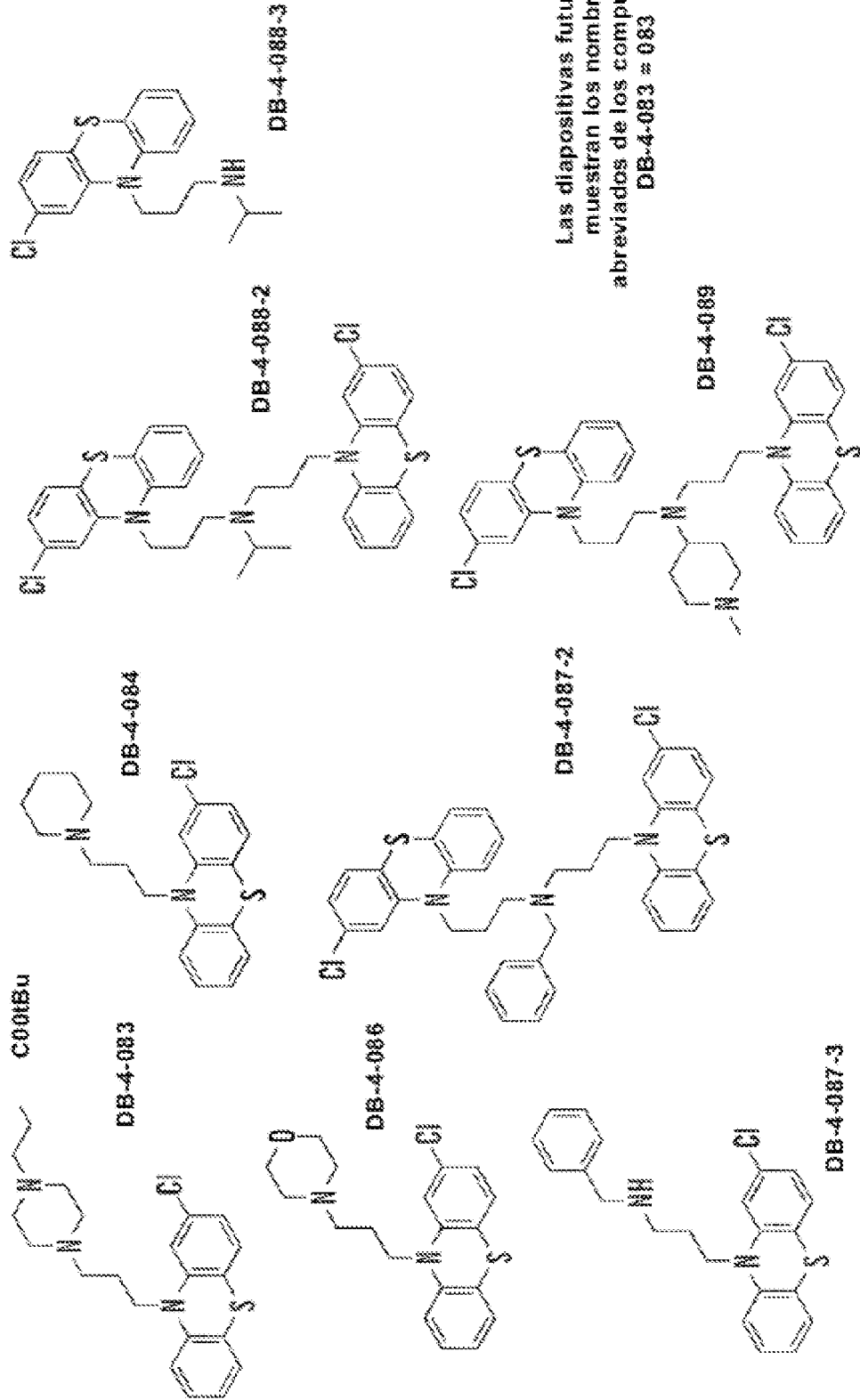


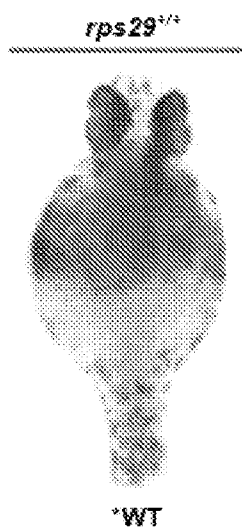
FIG. 32

Nuevos derivados de fenotiazina



Las diapositivas futuras muestran los nombres abreviados de los compuestos: DB-4-083 = 083

FIG. 33



* no coincide en estadio con embriones MU

FIG. 34A

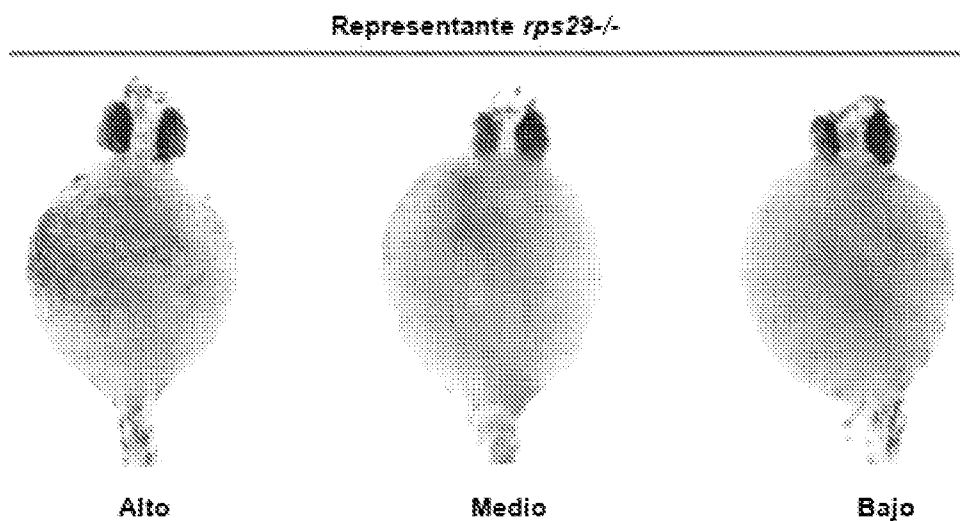


FIG. 34B

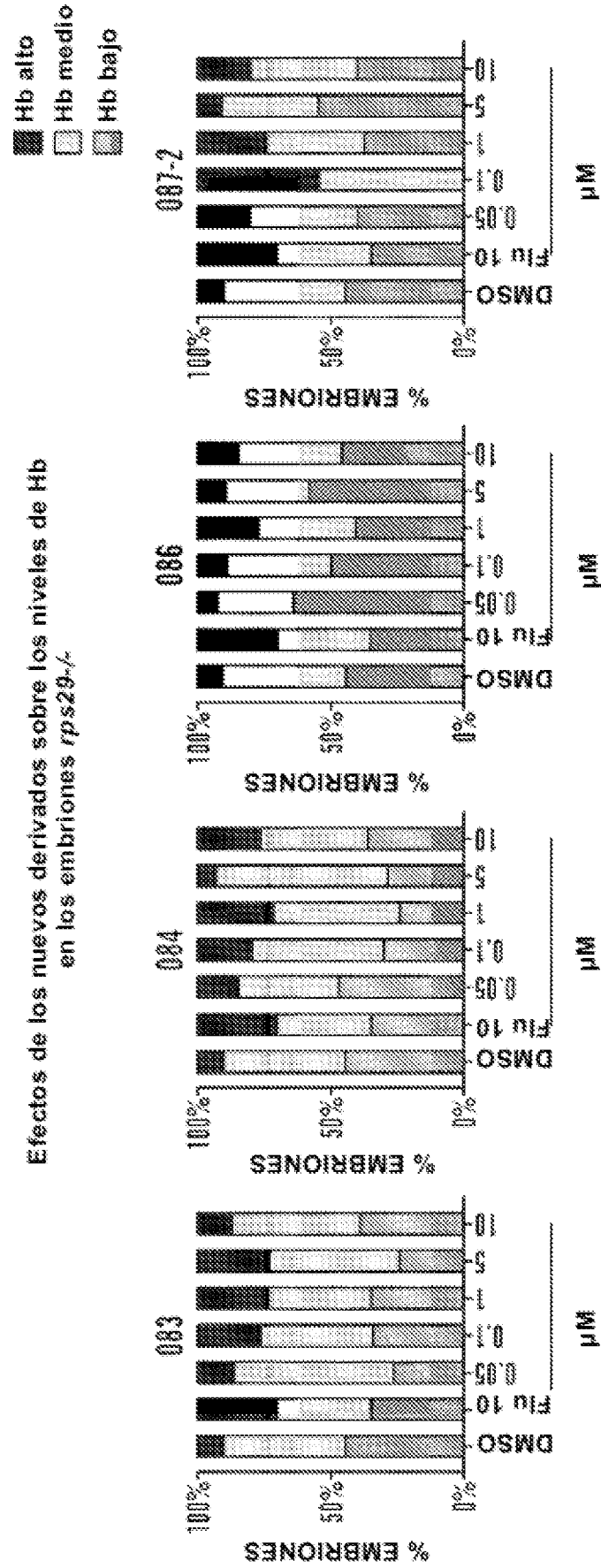


FIG. 35A

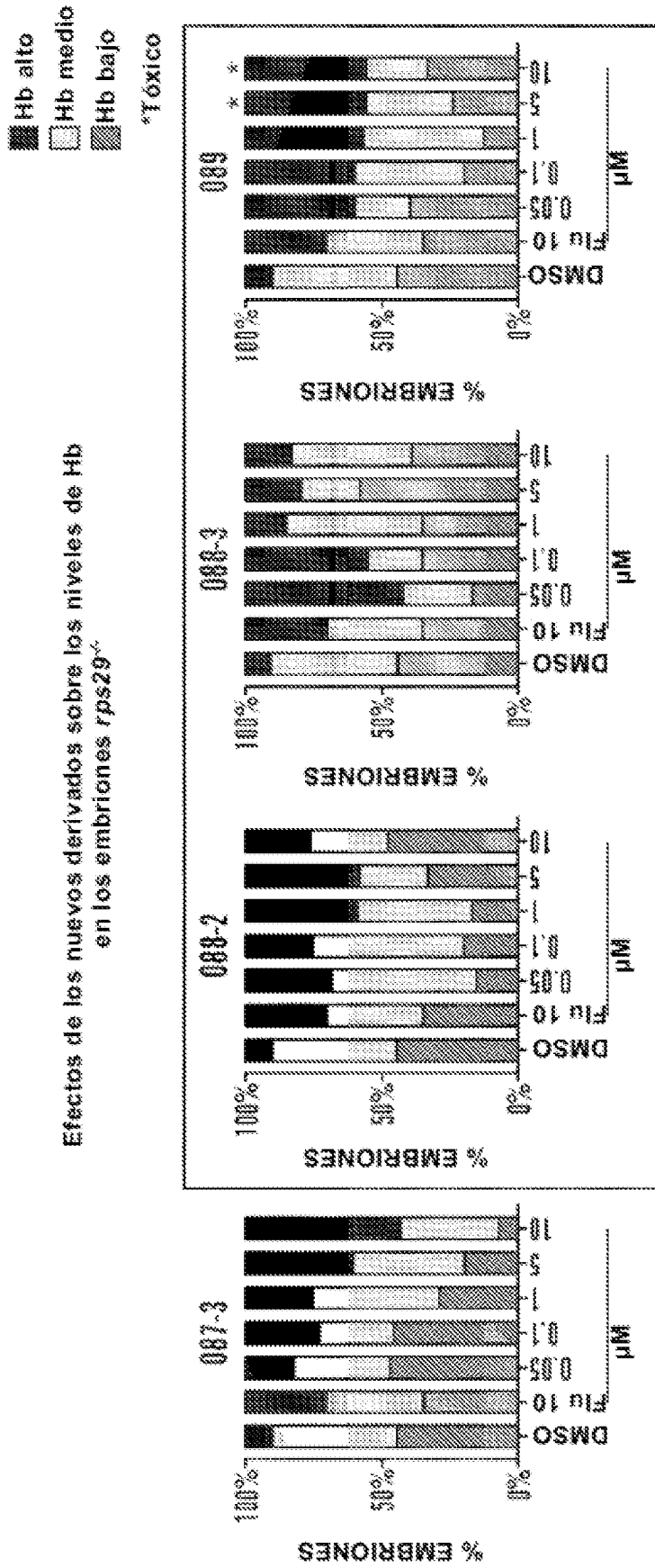


FIG. 35B

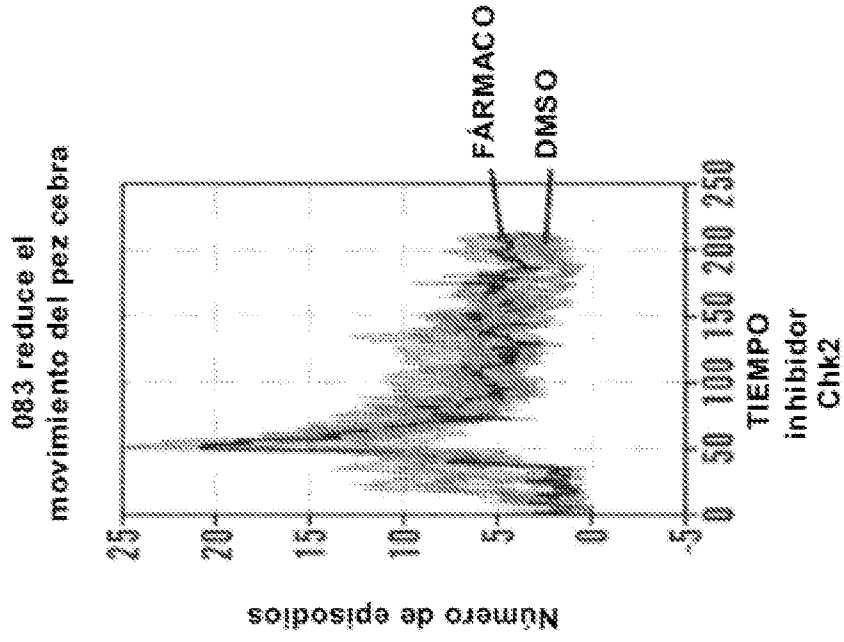


FIG. 36B

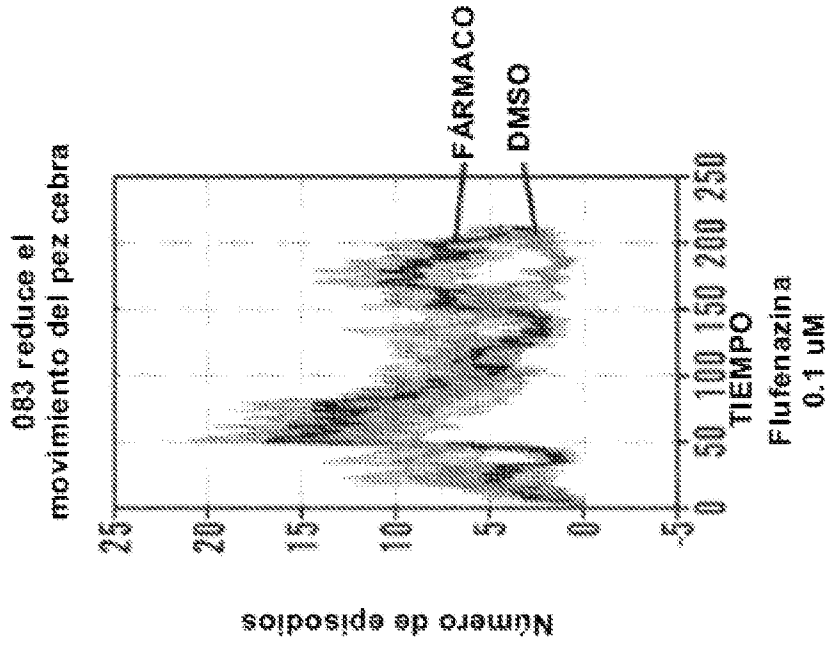


FIG. 36A

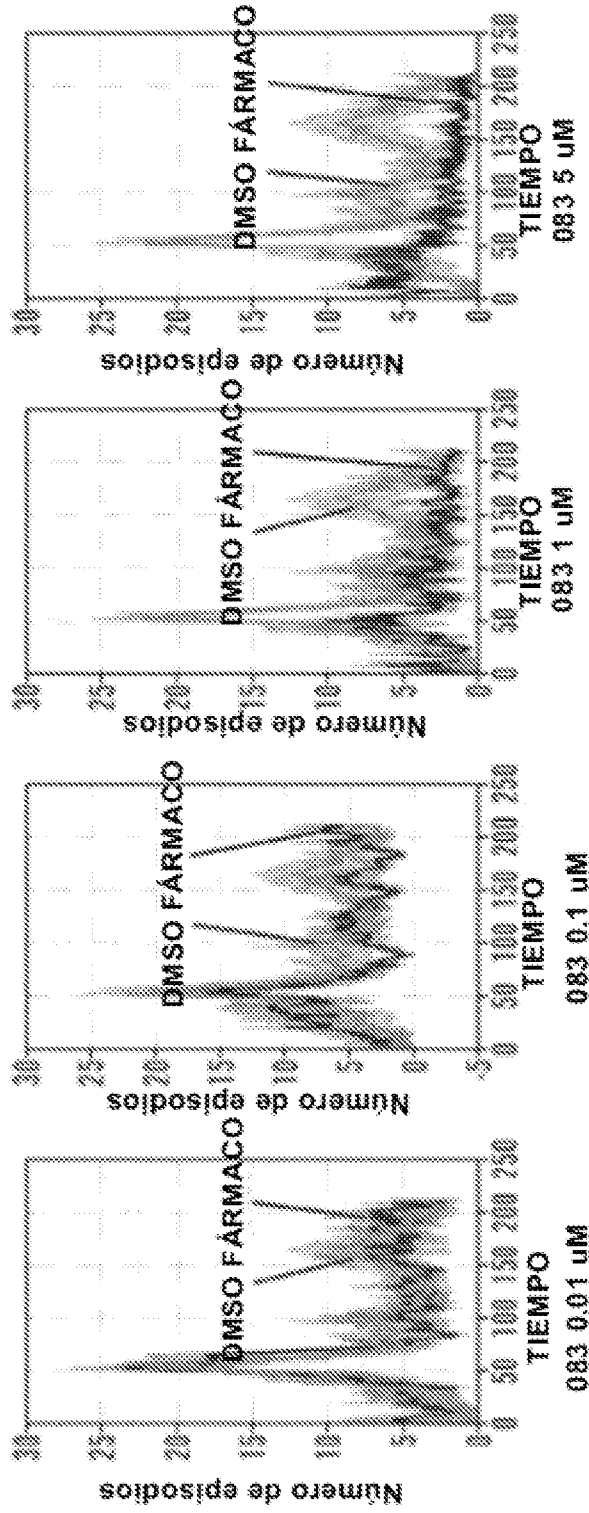


FIG. 36C

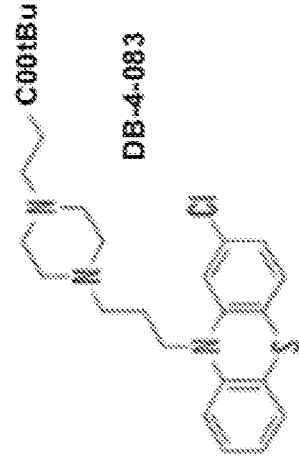


FIG. 36D

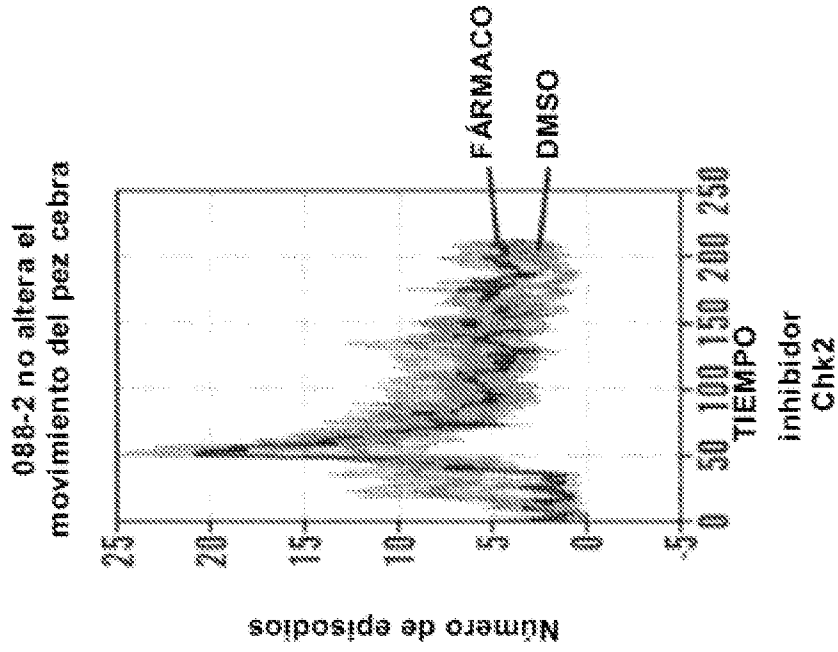


FIG. 37B

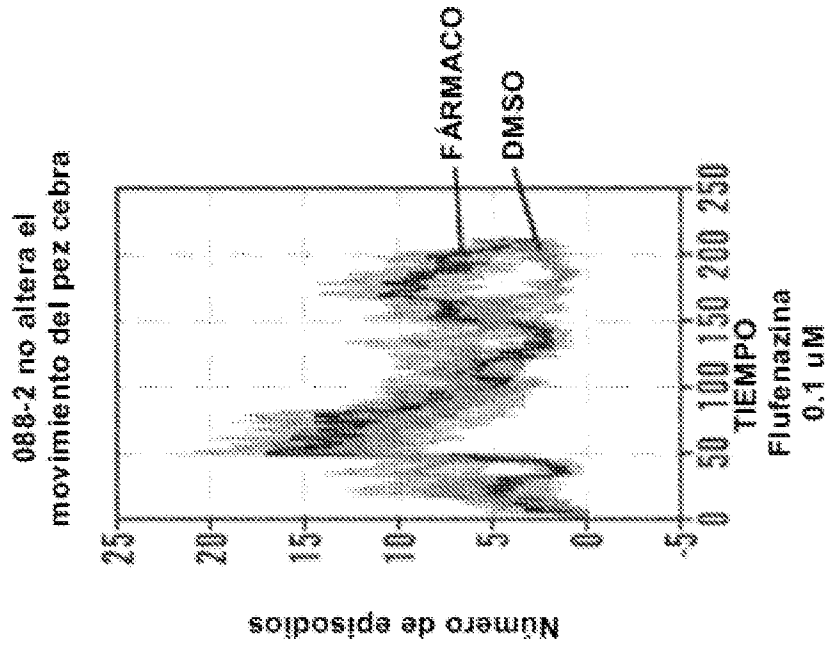


FIG. 37A

088-2 no altera el movimiento del pez cebra

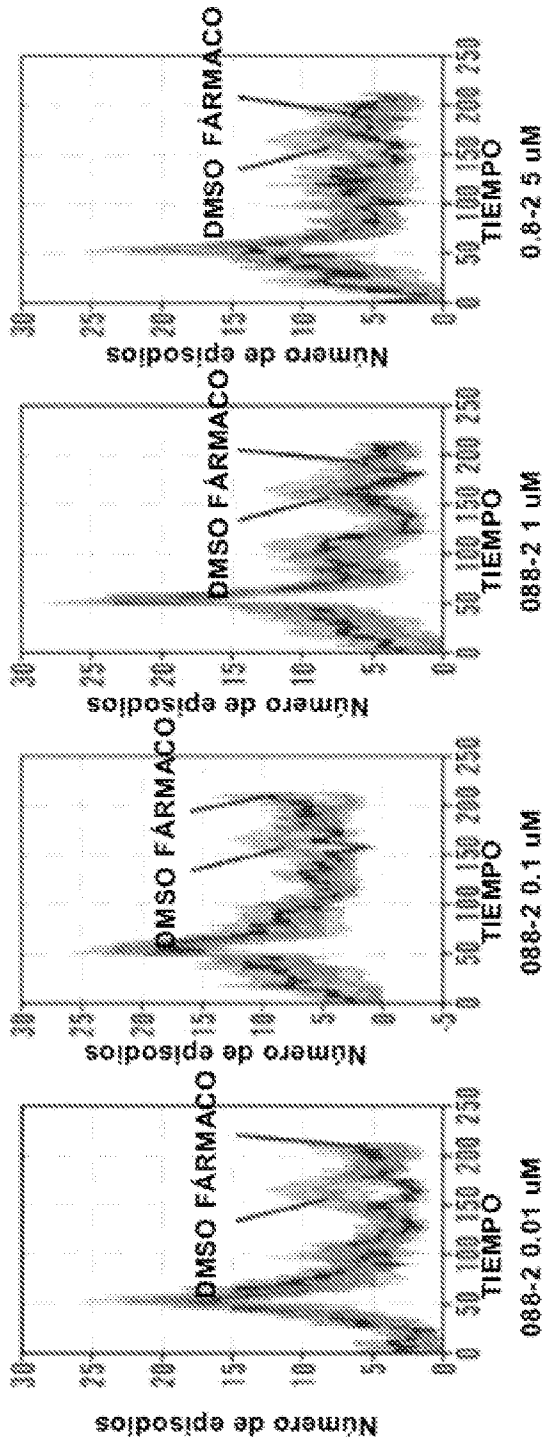


FIG. 37C

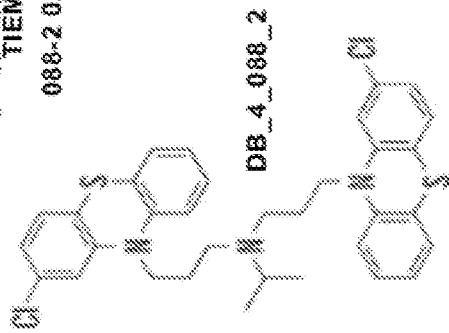


FIG. 37D

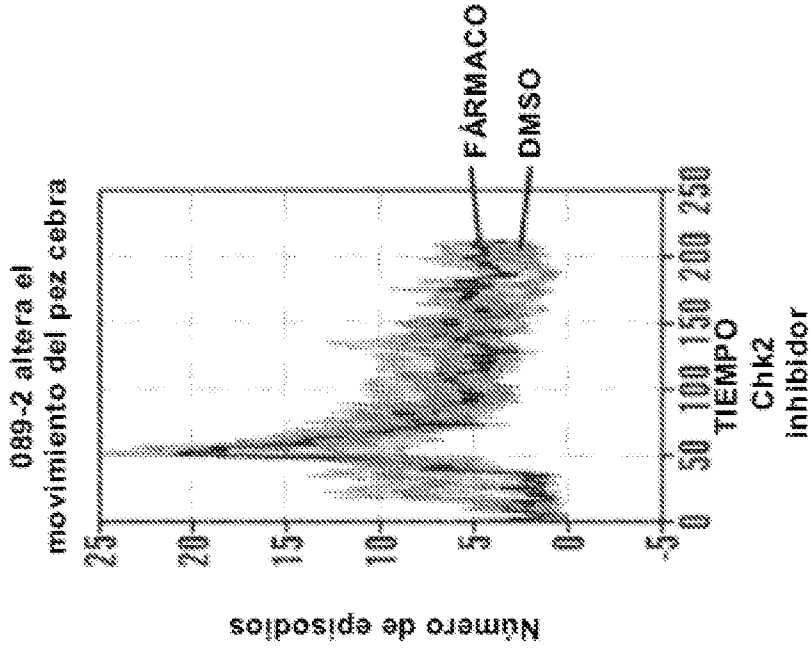


FIG. 38B

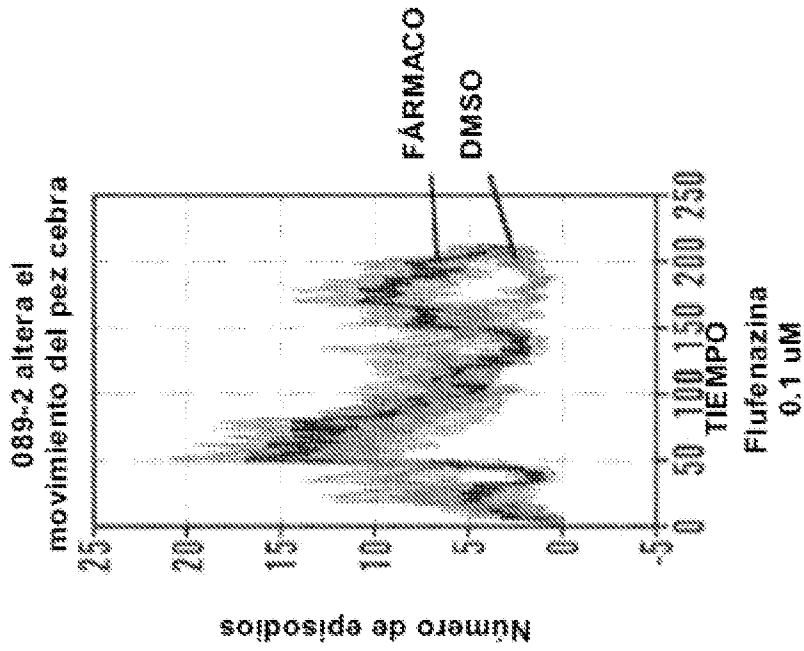


FIG. 38A

089 altera el movimiento del pez cebra

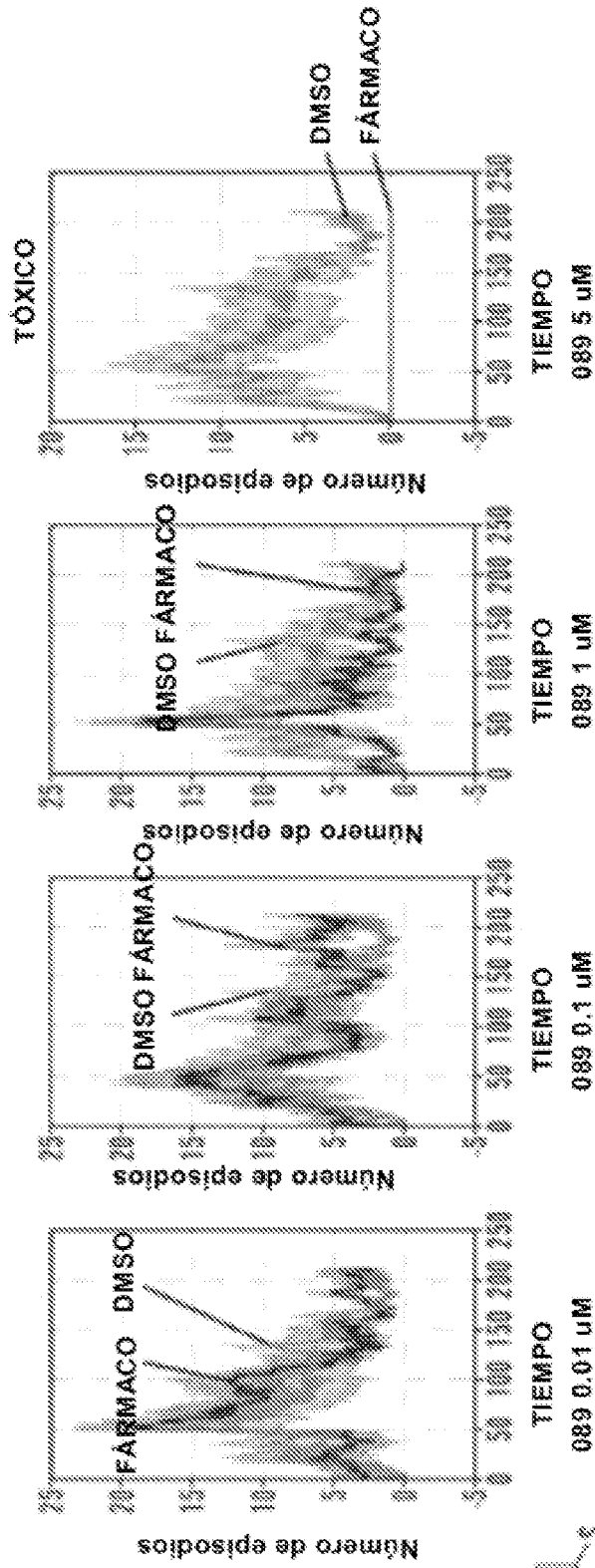


FIG. 38C

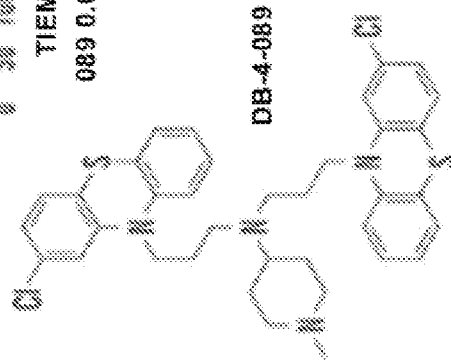


FIG. 38D

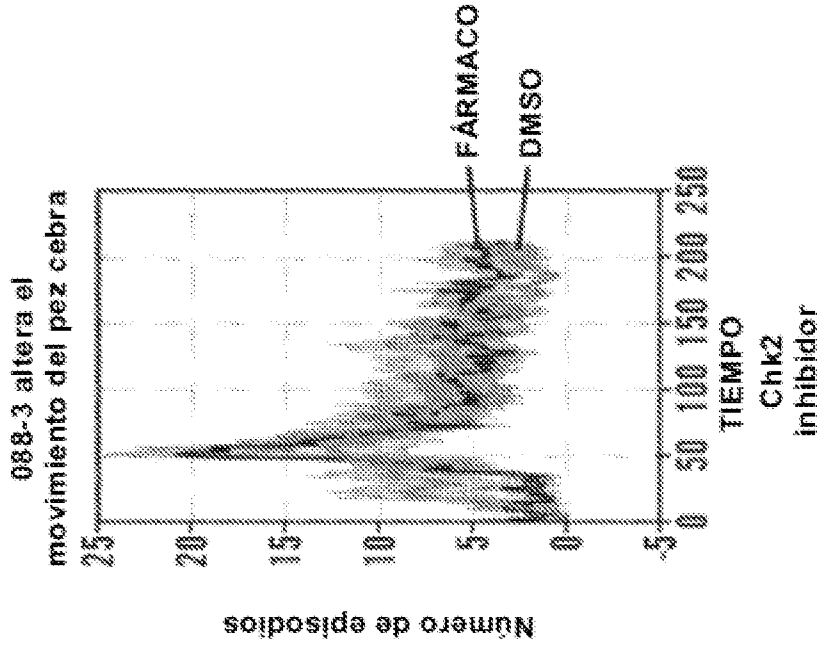


FIG. 39B

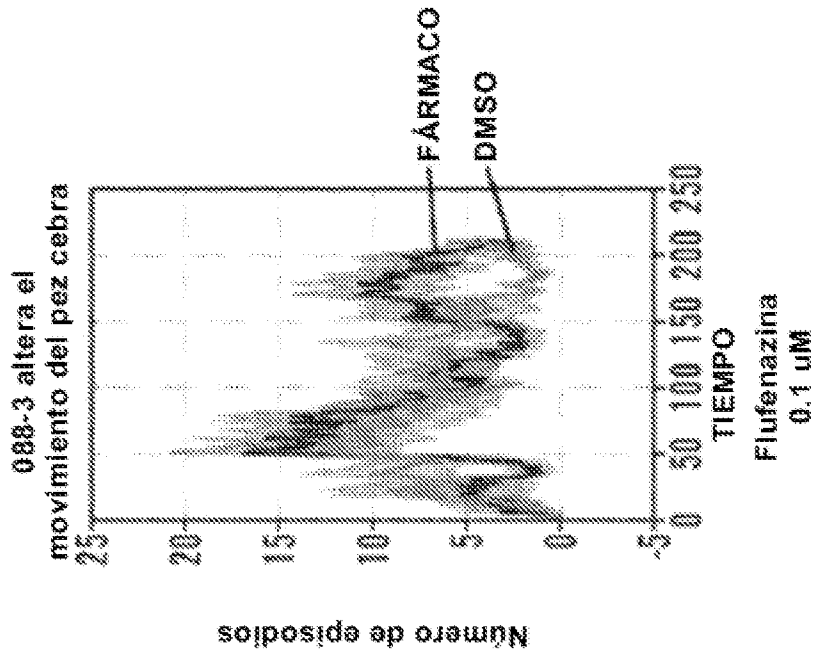


FIG. 39A

088-3 altera el movimiento del pez cebra

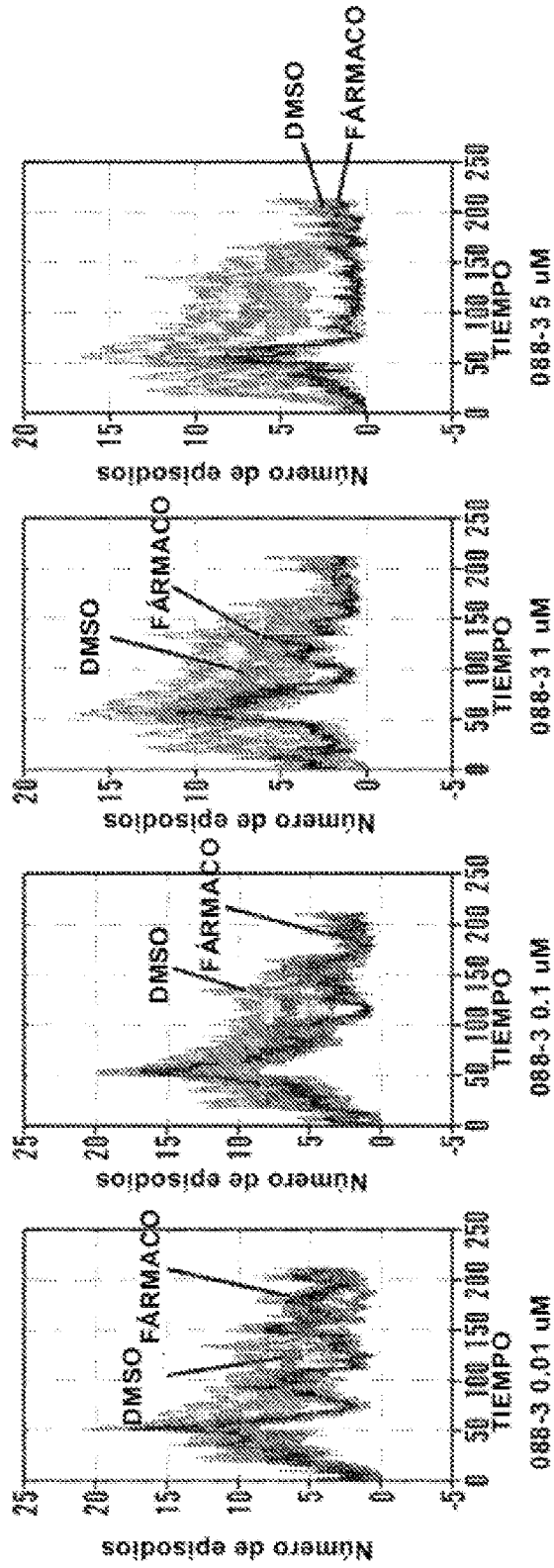


FIG. 39C

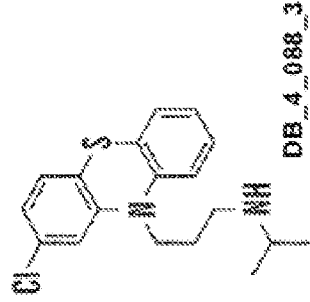


FIG. 39D

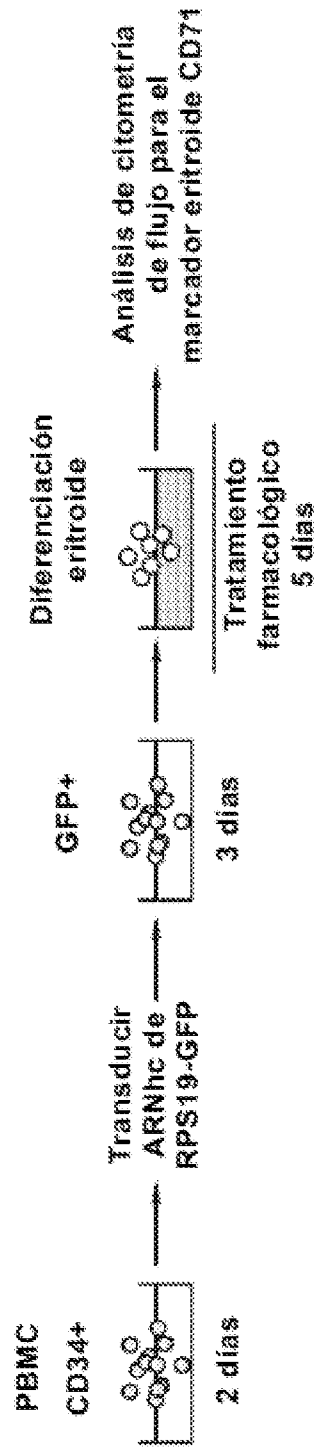


FIG. 40

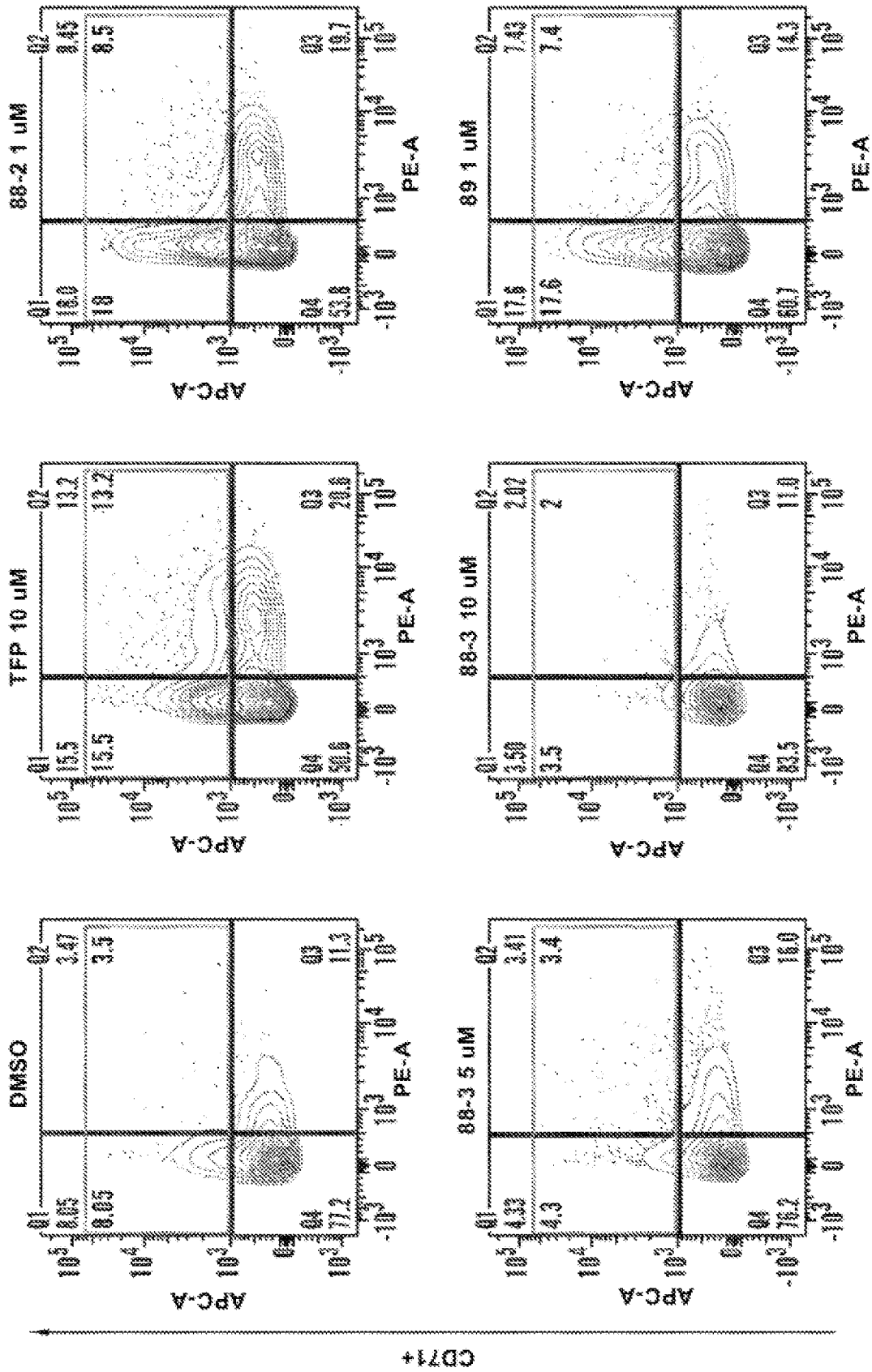


FIG. 41

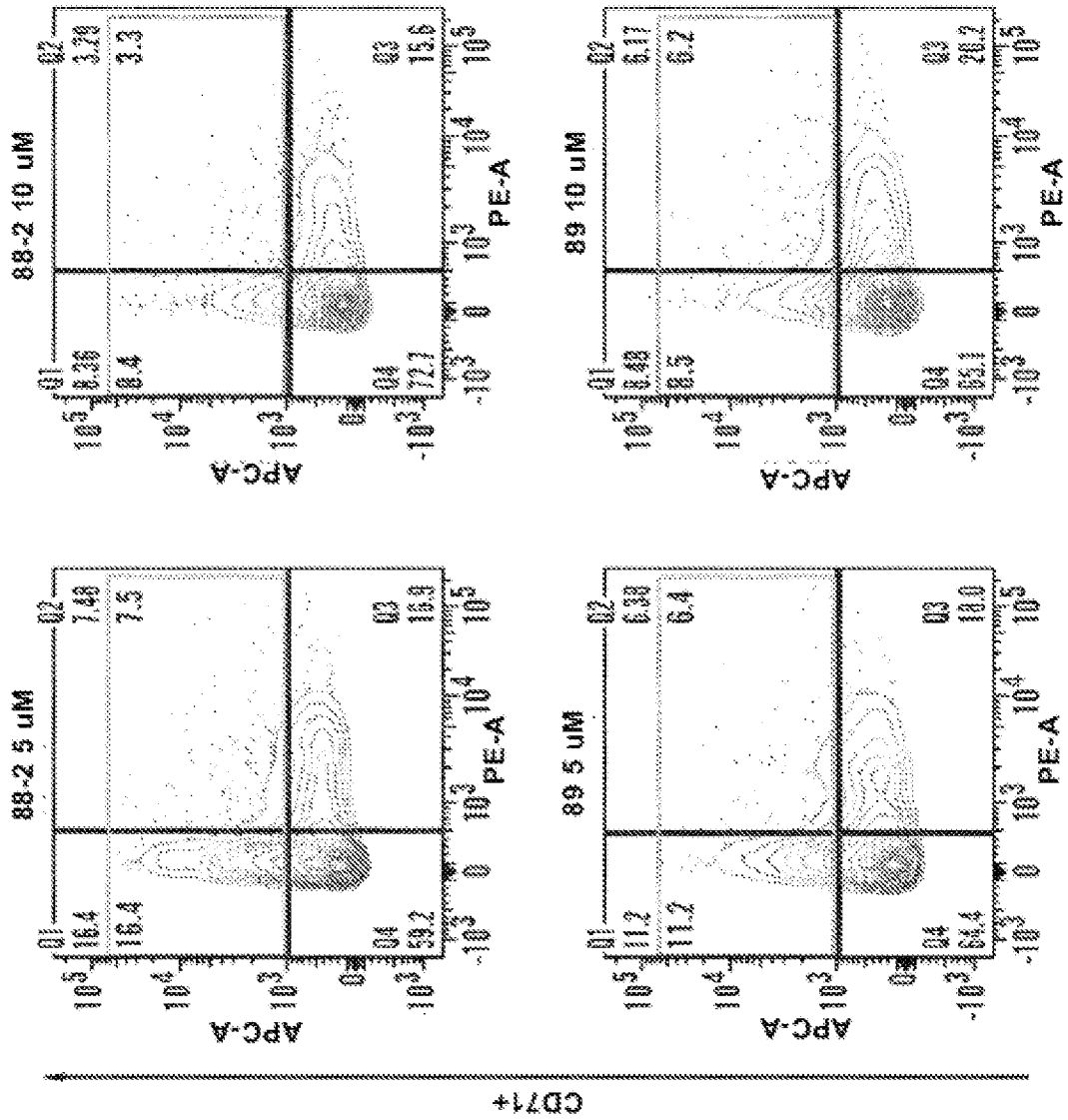


FIG. 41 (cont.)

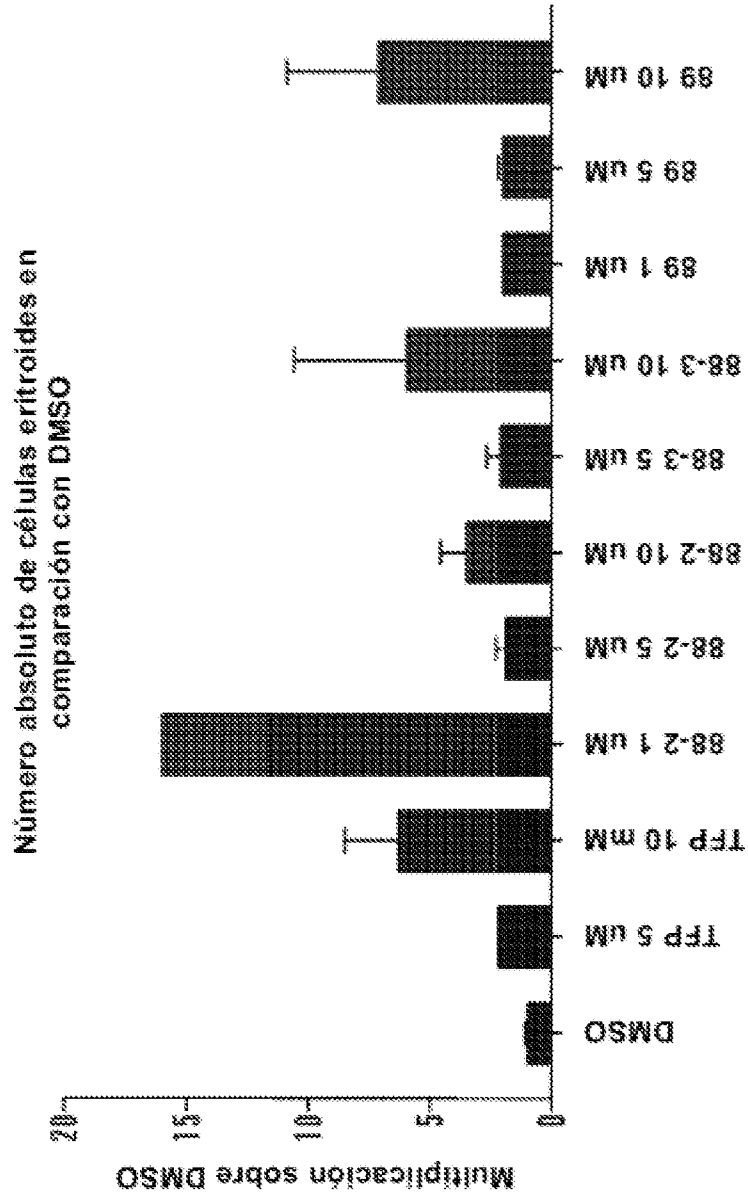


FIG. 42

Fármacos que aumentaron la Hb en embriones <i>rps29</i> en concentraciones más bajas que Flu	Fármacos que no aumentaron la Hb	Fármacos que se probaron en la prueba de comportamiento	Fármacos que no cambiaron el comportamiento	Fármacos que cambiaron el comportamiento	Fármacos que aumentaron la diferenciación de los glóbulos rojos
089	086	089	088-2	089	088-2
088-3	084	088-3		088-3	089
088-2	083	088-2		083	
		083			

FIG. 43