



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 213**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

A61K 31/167 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02769340 .7**

96 Fecha de presentación : **02.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1390491**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54

Título: **Procedimiento para tratar trastornos neurodegenerativos, psiquiátricos y otros trastornos con inhibidores de desacetilasa.**

30

Prioridad: **02.05.2001 US 288215 P**
11.04.2002 US 372724 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2009

73

Titular/es:
The Regents of the University of California
5th Floor, 1111 Franklin Street
Oakland, California 94607-5200, US

72

Inventor/es: **Steffan, Joan, S.;**
Thompson, Leslie, M.;
Marsh, J., Lawrence;
Bodai, Laszlo y
Pallos, Judit

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 310 213 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

Procedimiento para tratar trastornos neurodegenerativos, psiquiátricos y otros trastornos con inhibidores de desacetilasa.

5

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante, de aparición tardía, caracterizado por anomalías motoras, disfunción cognitiva y síntomas psiquiátricos (Harper, P. S., ed. (1991) *Huntington's Disease* (W. B. Saunders, Londres), págs. 141-178). La EH está provocada por una expansión de un tracto de poliglutamina en la parte amino-terminal de una proteína predominantemente citosólica, huntingtina (Htt) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) *Cell* 72, 971-983; DiFiglia, M., *et al.* (1995) *Neuron* 14, 1075-1081). Las expansiones de repeticiones superiores a aproximadamente 38 repeticiones provocan enfermedad, mientras que los individuos no afectados tienen longitudes de repetición de hasta 35 repeticiones (Gusella, J. F. y MacDonald, M. E. (1995) *Semin. Cell Biol.* 6, 21-28).

15

El documento WO 97/35990 describe polipéptidos Hdx que pueden modular la proliferación, supervivencia y/o diferenciación de células debido a su capacidad para alterar la estructura de la cromatina desacetilando histonas tales como H3 o H4.

20

Un modelo de ratón transgénico para la EH ha mostrado que el exón 1 de la huntingtina humana que porta una repetición CAG expandida es suficiente para provocar un fenotipo similar a la EH (Mangiarini, L., *et al.* (1996) *Cell* 87, 493-506). Precediendo a la aparición de síntomas neurológicos, la aparición de inclusiones intranucleares, agregados localizados nucleares que contienen las proteínas ubiquitina y Htt truncada se han encontrado en neuronas de ratones transgénicos con EH (Davies, S. W., *et al.* (1997) *Cell* 90, 537-548). Estas inclusiones también se han identificado en neuronas y neuritas distróficas en tejido cerebral con EH (DiFiglia, M., *et al.* (1997) *Science* 277, 1990-1993) y como agregados citosólicos en los procesos neuronales (neurópilo) de ambos, tejidos cerebrales de paciente con EH y de ratón transgénico (Gutekunst, C. A., *et al.* (1999) *J. Neurosci.* 19, 2522-2534; Li, S.-H., *et al.* (1999) *J. Neurosci.* 19, 5159-5172).

25

La localización conjunta de una variedad de proteínas celulares, incluyendo factores de transcripción tales como la proteína de unión a CREB (CBP) (Kazantsev, A., *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11404-11409), proteína de unión a TATA (TBP) (Huang, C., *et al.* (1998) *Somatic Cell Mol. Genet.* 24, 217-233), y mSin3a (Boutell, J. M., *et al.* (1999) *Hum. Mol. Genet.* 9, 1647-1655), se ha mostrado en inclusiones de cerebro humano (TBP y mSin3a) y cultivo celular (CBP). El papel que desempeña la agregación en la evolución de la enfermedad no está claro (Paulson, H. L. (1999) *Am. J. Hum. Genet.* 64, 339-345; Reddy, P. H., Williams, M. y Tagle, D. A. (1999) *Trends Neurosci.* 22, 248-255; Perutz, M. (1999) *Trends Biochem. Sci.* 24, 58-63); sin embargo, la localización nuclear de la proteína tras la rotura citosólica (Sieradzan, K., *et al.* (1999) *Exp. Neurol.* 156, 92-99) se ha implicado como que tiene un papel importante en la patogénesis de la enfermedad en ambos modelos, de cultivo celular (Saudou, F., *et al.* (1998) *Cell* 95, 55-66) y de ratón transgénico (Klement, I. A., *et al.* (1998) *Cell* 95, 41-53).

30

La EH da como resultado una degeneración neuronal selectiva, especialmente del cuerpo estriado y de la corteza cerebral (Vonsattel, J. P., *et al.* (1985) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 559-577). Hay evidencia de que la muerte celular programada (apoptosis) puede estar implicada en trastornos neurodegenerativos crónicos incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Desjardins, P. & Ledoux, S. (1998) *Metab. Brain Dis.* 13, 79-92).

35

La proteína supresora de tumores p53 desempeña un papel central en la determinación de si una célula experimentará diferenciación, senescencia o apoptosis (Levine, A. J. (1997) *Cell* 88, 323-331) y se ha implicado en la regulación de la apoptosis neuronal (Hughes, P. E., Alexi, T. & Schreiber, S. S. (1997) *NeuroReport* 8, 5-12). Ambas, CBP y mSin3a, interaccionan con p53 y están implicadas en la regulación transcripcional mediada por p53 (Murphy, M., *et al.* (1999) *Genes Dev.* 13, 2490-2501).

40

La muerte celular apoptótica en la EH se ha observado usando tejido cerebral con EH de cadáver (Petersen, A., Mani, K. & Brundin, P. (1999) *Exp. Neurol.* 157, 1-18) y en algunos modelos de ratón (Reddy, citado anteriormente), aunque el mecanismo para la muerte celular sigue sin estar claro. Actualmente, no existe ninguna cura ni tratamiento eficaz para esta enfermedad atroz y mortal. La etiología de otras varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la ataxia espinocerebelosa tipo I y la enfermedad de Kennedy, implica también una expansión de repeticiones de poliglutamina (Zoghbi, H. Y. y Orr, H. T. (2000) *Annu Rev Neurosci* 23, 217-247). Por tanto, lo que se necesita es un procedimiento para tratar pacientes con la enfermedad de Huntington u otras enfermedades por repetición de poliglutamina y/o neurodegenerativas, para prevenir o bien suprimir la neurodegeneración, incluso tras la aparición de la patología.

45

Sumario de la invención

La invención se refiere a un procedimiento novedoso para tratar una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo la degeneración neurológica, trastornos psiquiátricos, trastornos por agregación y enfermedades que surgen de la expansión de poliglutamina, tales como enfermedad de Huntington, que comprende administrar a los pacientes que lo necesiten una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más inhibidores de desacetilasa.

50

55

60

ES 2 310 213 T3

Además de la enfermedad de Huntington, la administración de inhibidores de desacetilasa según la práctica de la presente invención puede usarse para tratar la enfermedad de Kennedy, ataxia espinocerebelosa, atrofia dentatorrubropalidolusiana (ADRPL), enfermedad de Machado-Joseph, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y enfermedades priónicas. Otras enfermedades y trastornos, incluyendo aquellos que surgen de la expansión de poliglutamina, pueden tratarse también mediante inhibidores de desacetilasa tal como apreciará el médico experto.

La invención se refiere también a una mosca transgénica útil como modelo de enfermedades por expansión de poliglutamina que puede usarse para someter a prueba posibles agentes terapéuticos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de la interacción entre los complejos de histona desacetilasa y proteínas acetiltransferasa, con y sin inhibidores de los inhibidores de HDAC, en la regulación de la transcripción génica.

Figura 2. Inmunotransferencia de tipo Western de proteínas solubilizadas purificadas a partir de agregados generados en células HEK293 que expresan 103Q-GFP.

Figura 3. Autorradiograma de gel de SDS-PAGE que muestra la unión de p53(1-347) y p53(1-393) marcada con [³⁵S]metionina a proteínas de fusión GST-Htt.

Figura 4. Inmunotransferencia de tipo Western que usa anticuerpo anti-p53 monoclonal, que muestra la coprecipitación de p53 con Httex1p en células HEK293.

Figura 5. Gráfico de barras que muestra la represión de la transcripción mediante Httex1p expandida.

Figura 6. Gráfico de barras que muestra que la huntingtina reprime la transcripción de p21/WAF1/Cip 1 en células PC12 estables.

Figura 7. Autorradiograma de geles de SDS-PAGE que muestra la unión de mSin3a (II) o CBP (I) marcada con [³⁵S]metionina a proteínas de fusión GST-Htt.

Figura 8. Secciones estriadas teñidas que muestran la localización de CBP en inclusiones intranucleares neuronales en ratones R6/2. Las secciones estriadas de R6/2 (A-C) y controles de la misma camada (D) se inmunomarcaron con anticuerpos anti-Htt (A), anti-ubiquitina (B) y anti-CBP (C y D). Los núcleos se contratiñeron con verde de metilo. Las inclusiones nucleares se indican mediante flechas. Barra de escala, 15 μm.

Figura 9. Representaciones esquemáticas de la proteína de unión a CREB (CBP) y p300/factor asociado a CBP (P/CAF). RID, dominio de interacción con el receptor de la hormona nuclear; CH1, CH2, CH3, regiones 1, 2, y 3 ricas en cisteína-histidina; Br, bromodominio; KIX, dominio de unión a CREB. Los residuos de aminoácido usados como sondas marcadas con ³⁵S para ensayos de coprecipitación de GST con proteínas GST-Htt se designan debajo de cada diagrama de proteínas.

Figura 10. Gráfico que muestra los resultados de ensayos de coprecipitación de GST usando dominios radiactivos de CBP y P/CAF con GST-51QP Htt. Los dominios de acetiltransferasa (AT) de ambas, CBP y P/CAF, interaccionan con GST-51QP.

Figura 11. Interacción de proteínas de fusión GST-Htt, que contienen tramos de poliglutamina de tipo natural y expandida, con y sin el dominio rico en prolina, con sondas radiactivas que contienen los dominios AT de CBP y P/CAF. Se muestra un autorradiograma representativo del panel central. La ligera alteración en el patrón de CBP (1.459-1.877) en el carril de GST-51QP en comparación con los otros carriles se debe a la migración conjunta de GST-51QP con CBP(1.459-18.77) marcada.

Figura 12. Gráficos que muestran la inhibición de la actividad acetil-transferasa de CBP, p300 y P/CAF mediante Htt *in vitro*. La proteínas de fusión de GST, GST-20QP, GST-51QP y GST-51Q inhiben la actividad acetiltransferasa de GST-CBP (aminoácidos 1099-1877), GST-p300 (aminoácidos 1195-1707) y GST-P/CAF (aminoácidos 87-832) en el péptido de H4 biotinilado.

Figura 13. (a) Las células PC12 inducidas para expresar 25QP-GFP o 103QP-GFP muestran una reducción en el nivel de acetilación de ambas histonas H3 y H4. (b) Una segunda cepa de células PC12 transfectadas de manera estable, que se hicieron crecer en ausencia de butirato pero inducidas para expresar F103QP-EGFP, muestra una reducción en el nivel de acetilación de la histona H4, que puede revertirse mediante tratamiento con butirato. Se muestran niveles equivalentes de histonas mediante tinción con azul de Coomassie (a y b) o con anti-histona H3 (a solamente).

Figura 14. Gráfico que muestra la pérdida progresiva en el número de rabdómeros por ommatidio en los días 1 y 6 tras la eclosión en moscas que expresan Httex1p Q93.

ES 2 310 213 T3

Figura 15. Gráfico que muestra que la administración de SAHA ralentiza la degeneración de fotorreceptores. El número de rabdomeros por ommatidio a los 6 días tras la eclosión se mejora notablemente en moscas que expresan Httex1p Q93 alimentadas con SAHA. Se alimentó a los animales con SAHA 0,5, 2 y 10 μM . Se muestran los resultados con SAHA 2 μM .

Figura 16. Gráfico que muestra que la administración de butirato ralentiza la degeneración neuronal. El número de rabdomeros por ommatidio a los 6 días tras la eclosión se mejora notablemente en las moscas que expresan Httex1p Q93 alimentadas con butirato. Se alimentó a los animales con butirato 10, 30 y 100 mM. Se muestran los resultados con butirato 100 mM.

Figura 17. Gráfico que muestra que la administración de SAHA mejora la supervivencia en el día 6 de moscas adultas que expresan Httex1p. Se alimentó a los animales con SAHA 0,5, 2 y 10 μM disuelto en DMSO. Se calculó el porcentaje de rescate tal como sigue: (porcentaje de supervivencia - porcentaje de supervivencia con disolvente solo)/(1 - porcentaje de supervivencia con disolvente solo).

Figura 18. Gráfico que muestra que reducir genéticamente la actividad desacetilasa en heterocigotos *Sin3A* ralentiza la degeneración. Las moscas que expresan Httex1p Q93 y heterocigóticas para una mutación *Sin3A* se compararon con moscas similares sin la mutación *Sin3A*. La distribución de fotorreceptores se controló a los 6 días.

Figura 19. Inmunotransferencia de tipo Western que muestra que la expresión del transgén Httex1p Q93 permanece inalterada mediante el tratamiento con SAHA o bien butirato. Una inmunotransferencia de tipo Western de extractos de larvas que expresan Httex1p Q93 y tratadas con disolvente solo o bien disolvente con SAHA o butirato se trató con sonda con anticuerpo anti-Htt. Se cargaron cantidades similares de proteína, según lo determinado mediante los ensayos de Bradford y se confirmó mediante tinción con Coomassie del gel (no mostrado).

Figura 20. Gráfico que muestra que los rabdomeros en los ojos de las moscas que expresan péptidos Q48 marcados muestran una pérdida progresiva.

Figura 21. Gráfico que muestra que la degeneración progresiva de neuronas fotorreceptoras se detiene mediante SAHA 2 μM incluso cuando se inicia la alimentación sólo en moscas adultas.

Figura 22. Gráfico que muestra que la degeneración progresiva de neuronas fotorreceptoras se detiene mediante butirato 100 mM incluso cuando se inicia la alimentación sólo en moscas adultas.

Figura 23. Fotografías de ommatidios de una mosca normal y de moscas que expresan Q48 con y sin los inhibidores de desacetilasa, butirato y SAHA.

Figura 24. Gráfico que muestra la distribución de rabdomeros por ommatidio en moscas Sir-2.

Figura 25. Gráfico que muestra la distribución de rabdomeros por ommatidio en moscas Mi-2.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas. Las abreviaturas usadas en el presente documento se indican en la tabla 1.

TABLA 1

Abreviatura	Significado
AR	Receptor de andrógenos
AT	Acetiltransferasa
Br	Bromodominio
CBP	Proteína de unión a CREB
CH	Región rica en cisteína-histidina
ADRPL	Atrofia dentatorrubropalidoluisiana
GFP	Proteína fluorescente verde
GSTq	Glutación-S-transferasa

HAT	Histona acetiltransferasa
EH	Enfermedad de Huntington
HDAC	Histona desacetilasa
Htt	Huntingtina
Httex1p	Proteína del exón 1 huntingtina
KIX	Dominio de unión a CREB
P/CAF	p300/factor asociado a CBP
PMSF	Fluoruro de fenil-metilsulfonilo
Poli Q	Poliglutamina
RID	Dominio de interacción con el receptor de la hormona nuclear
RXR α	Receptor X de retinoide alfa
SAHA	Suberoilánilida del ácido hidroxámico
SH3	Homología Src tipo 3
TBP	Proteína de unión a TATA
TSA	Tricostatina A
UAS	Secuencia activadora en sentido de 5'

35 *Visión general de la invención.* Usando un enfoque novedoso para evaluar la presencia de proteínas celulares asociadas con agregados, los presentes inventores han demostrado que la proteína del exón 1 Htt mutante (Httex1p) que contiene una repetición de poliglutamina expandida se agrega conjuntamente con p53 en inclusiones generadas en cultivo celular e interacciona con p53 en ensayos bioquímicos. Los presentes inventores también han demostrado que la Httex1p expandida interacciona *in vitro* con otros dos factores de transcripción críticos, el co-activador CBP y el co-represor mSin3a. Los presentes inventores han mostrado además que la CBP se localiza en inclusiones intranucleares neuronales en un modelo de EH de ratón transgénico.

45 Además, los presentes inventores han demostrado que la Httex1p se une directamente a los dominios de acetiltransferasa de dos proteínas distintas, la proteína de unión a CREB (CBP) y p300/factor asociado a CBP (P/CAF) y que en ensayos libres de células, la Httex1p también inhibe la actividad acetiltransferasa de al menos tres enzimas: p300, P/CAF y CBP. Los presentes inventores han mostrado que la expresión de Httex1p en células cultivadas reduce el nivel de histonas H3 y H4 acetiladas, y que esta reducción puede revertirse administrando inhibidores de histona desacetilasa (HDAC). Finalmente, los presentes inventores han demostrado que, *in vivo*, los inhibidores de HDAC detienen la degeneración neuronal progresiva en curso inducida por la expansión de repeticiones de poliglutamina y reduce la mortalidad en dos modelos de *Drosophila* de enfermedad por poliglutamina.

55 Estos datos sugieren que las repeticiones de poliglutamina expandidas en el contexto de una proteína patológica pueden provocar una regulación transcripcional aberrante, conduciendo a una disfunción neuronal y degeneración en la EH y otras enfermedades por repetición de tripletes, perturbando la interacción entre las proteínas acetiltransferasa y los complejos de histona desacetilasa, dando como resultado una disminución en los niveles de acetilación de proteínas. Un modelo de la interacción entre complejos de histona desacetilasa, proteínas acetiltransferasa y Htt, con y sin inhibidores de HDAC, se muestra en la figura 1.

60 La presente invención se refiere por tanto al uso de inhibidores de HDAC para ralentizar y/o prevenir la neurodegeneración progresiva observada en la enfermedad de Huntington y otras enfermedades por repetición de poliglutamina y/o enfermedades por agregación, incluso tras la aparición de los síntomas. La presente invención se refiere además al uso de inhibidores de HDAC para tratar diversas enfermedades y trastornos psiquiátricos, incluyendo esquizofrenia, trastorno bipolar y enfermedad depresiva, en la que se ha implicado la represión transcripcional.

65 Además, la presente invención se refiere al uso de una reserva de *Drosophila* transgénica como modelo de enfermedad por poliglutamina, para someter a prueba y evaluar posibles agentes terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades por poliglutamina.

ES 2 310 213 T3

Constructos plasmídicos. Repeticiones CAG/CAA alternas, que codifican un intervalo normal o bien un tracto de poliglutamina expandido, se pusieron en el contexto de un exón 1 de Htt truncado [primeros 17 aminoácidos más repetición poli(Q)] o bien uno completo (Kazantsev, A., *et al.* citado anteriormente) y se subclonaron en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, California). Las repeticiones que codifican 25 aminoácidos de glutamina (25QP-GFP) o 103 (103QP-GFP) dentro la secuencia del exón 1 completo se fusionaron en marco con la secuencia codificante para una etiqueta de proteína fluorescente verde potenciada en el extremo 3' de cada constructo. Se crearon también constructos de exón 1 truncado que codifican una etiqueta de epítipo myc en el extremo carboxilo-terminal en lugar de proteína fluorescente verde potenciada. Diversos constructos Httexp1-poliQ se describen en Waelter, S. *et al.* (2001) *Molecular Biology of the Cell*, 12, 1393-1407.

Las proteínas de fusión de exón 1 de Htt-GST que contienen 20, 51 y 83 repeticiones de poliglutamina se prepararon según lo descrito en Scherzinger, E., *et al.* (1997) *Cell* 90, 549-558. La proteína de fusión GST-103Q truncada se derivó del constructo 103Q-myc mediante subclonación en pGEX-3X (Amersham Biosciences, Piscataway, Nueva Jersey), eliminando la región codificante myc. Se usó pGEX-2T (Amersham Biosciences) para el control de GST. Las moléculas de ADN que codifican proteínas de fusión de GST se ligaron a pcDNA3.1 para su expresión en células de mamífero.

La p53 de longitud completa (que codifica los aminoácidos 1-393), codificada en un fragmento de *Bam*HI de 1,8 kb, se subclonó en pcDNA6.0 *myc*/His C (Invitrogen). Para crear una p53 truncada (aminoácidos 1-347), se digirió el constructo previo con *Sma*I y se volvió a ligar. Se usaron ADNc que codifican CBP en pcDNA3.1 o bien mSin3a en pcDNA3 para la síntesis de proteínas. Para la expresión en células de mamífero, se usaron constructos del exón 1 de Htt que codifican 20 tractos de poliglutamina (20QP) o 93 (93QP) en pTL1 (Sittler, A., *et al.* (1998) *Mol. Cell* 2, 427-436.).

Se creó la fusión WAF1-luciferasa reasociando los dos oligonucleótidos, 5'-CGCGTGAATTCGAACATGTCC CAACATGTTGCCC-3' y 5'-GGGCAACATGTTGGGACATGTTTCAATTCA-3', que contiene dos copias del sitio de unión a p53 WAF1, generando un dúplex con sitios *Eco*RI y *Mlu*I en 5' y un sitio *Sma*I en 3' y subclonándolo en el sitio *Mlu*I-*Sma*I del vector pGL3-promotor (Promega, Madison, Wisconsin).

También se construyeron el dominio pGST-P/CAF/A (que contiene el fragmento *Sac*II/*Nco*I que codifica los aminoácidos 87-768) y pcDNA3 que contiene el ADNc para P/CAF (Yang, X. J., *et al.* (1996) *Nature* 382, 319-324). Se clonó una etiqueta FLAG delante de repeticiones CAG/CAA alternas para crear F103QP-EGFP. Para las líneas de *Drosophila* transgénicas, se subclonaron constructos del exón 1 de Htt en pUAST, descrito en Brand, A. y Perrimon, N. (1993) *Development* 118, 401-415.

La p53 de longitud completa se proporcionó por Eric Stanbridge, Universidad de California, Irvine. La mSin3A (disponible de Affinity BioReagents, Golden, Colorado) en pcDNA3 se proporcionó por Maureen Murphy, Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, Pensilvania).

Aislamiento y análisis bioquímicos de agregados de poli(Q). Se transfectaron de manera transitoria células HEK293 con constructos que codifican 103Q-GFP o 103QP-GFP usando LIPOFECTIN® (Invitrogen) o GENEPORTER™ II (Gene Therapy Systems, San Diego, California). Los agregados en los medios de las placas de células transfectadas eficazmente (85-90%) que mostraban una extensa formación de agregados se hicieron sedimentar mediante centrifugación y se lavaron con PBS y Triton X-100 al 0,1%/PBS.

Se incubaron los agregados con oscilación durante 30 min. en Triton X-100 al 0,1%/PBS, durante la noche en Triton X-100 al 1%/PBS, 2 h en SDS al 0,1%/PBS y 30 min. en SDS al 1%/PBS; tras cada etapa de incubación, se hicieron sedimentar los agregados mediante centrifugación. Para las células intactas, se usó en primer lugar NP-40 al 0,3% para lisar las células.

Los experimentos se realizaron con y sin PMSF 100 μ M en los tampones y a temperatura ambiente o a 4°C con resultados similares debido a la estabilidad de los agregados. El enriquecimiento de los agregados se siguió microscópicamente controlando la fluorescencia de GFP.

Se llevaron a ebullición los agregados semipurificados en 2X tampón de carga que contenía SDS al 4%, β -mercaptoetanol al 10%, DTT 10 mM, glicerol al 20%, Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) y EDTA 4 mM durante 10 min. Se determinaron los niveles de proteína inmunorreactiva para cada anticuerpo en extractos de células completas de las células transfectadas y se cargaron cantidades proporcionales de proteína inmunorreactiva en proporciones equivalentes del extracto de células completas para agregar la preparación en geles de SDS al 8%.

Los geles se transfirieron durante la noche a una membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, Massachusetts) mediante procedimientos de transferencia en húmedo de inmunotransferencia de tipo Western convencionales. Se bloqueó la membrana Immobilon durante 1 h en la fracción V de BSA al 5% (United States Biochemical, Cleveland, Ohio) en 1X TBS/Tween 20, se cortó en tiras y se incubó durante 1 h en anticuerpo, se lavó tres veces y se incubó con anticuerpos conjugados con peroxidasa del rábano blanco de cabra anti-conejo o de cabra anti-ratón (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Los anticuerpos usados incluían anti-p53 (DO-1), anti-mSin3a (AK-11), anti-CBP (A-22), anti-mdm2 (SMD14), anti-RXR α (D-20), anti-p65 de NF- κ B (F-6), anti-AR (N-20) (todos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) y anti-Htt policlonal (Q51) (Sittler, A., *et al.*, citado anteriormente).

ES 2 310 213 T3

Se detectaron bandas inmunorreactivas usando quimioluminiscencia potenciada (Amersham Biosciences). Tras la quimioluminiscencia potenciada, se incubaron las inmunotransferencias con ¹²⁵I-proteína A, se lavaron tres veces en TBS/Tween 20 y se cuantificaron mediante análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad.

5 *Ensayos de coprecipitación (pull-down) de GST.* Se realizaron ensayos de coprecipitación de GST según lo descrito previamente (Steffan, J. S., *et al.* (1998) Mol. Cell. Biol. 18, 3752-3761; Steffan, J. S., *et al.* (1996) Genes Dev. 10, 2551-2563). Se sintetizaron *in vitro* p53 de longitud completa marcada con [³⁵S]-metionina (1-393), p53 truncada (1-347), CBP y mSin3a usando sistemas de lisado de reticulocitos de conejo (Promega). Las proteínas radiomarcadas se añadieron en cantidades molares aproximadamente iguales a las proteínas de fusión GST equilibradas previamente con tampón A (Hepes-KOH 20 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 0,1% y PMSF 100 μM) que contenía BSA al 0,2% en un volumen final de 200 μl. Tras una oscilación de 30 min. a temperatura ambiente, se recuperaron las perlas y se lavaron tres veces a temperatura ambiente en 1 ml de tampón A. Las proteínas unidas se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de autorradiografía y análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad.

15 Para los experimentos de cultivo celular, se transfectaron de manera transitoria 2-X placas de 100 mm de células HEK293 con un total de 40 μg de plásmidos pcDNA3.1 que codifican las siguientes proteínas, usando LIPOFECTIN® (Invitrogen): 13 μg de cualquiera de GST, GST-20QP, GST-83QP o GST103Q, 13 μg de p53 y 14 μg de CBP. Veinticuatro horas más tarde se recogieron las células y se resuspendieron en 400 μl de tampón A que incluía 10 μg/ml de aptenina y leupeptina, con 100 μl de perlas de vidrio estériles lavadas con ácido en un tubo de microcentrífuga de 1,6 ml.

20 Las células se agitaron con vórtex durante 30 s y entonces se pusieron en hielo. Los lisados se centrifugaron en una microcentrífuga a 2000 rpm durante 2 min. y se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar la concentración de proteína mediante análisis de Bradford. Se incubaron trescientos microgramos de lisados con 30 μl de perlas de glutatión-agarosa (Sigma, St. Louis, Missouri) durante 30 min. a 4°C con oscilación en tampón A. Entonces se lavaron las perlas cinco veces en 1 ml de tampón A, se resuspendieron en 2X tampón Laemmli, se mantuvieron en ebullición 3 min. y se cargaron directamente en un gel de SDS-poliacrilamida al 8%. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western se realizó tal como anteriormente.

30 Los datos de unión y de actividad se compararon mediante un análisis de la varianza con StatView.

35 *Ensayos de luciferasa.* Para los ensayos de WAF1-luciferasa, se transfectaron de manera transitoria células SAOS-2 en placas de 6 pocillos mediante precipitación con fosfato de calcio usando 100 ng de vector de expresión de p53, 2 μg de vector de expresión de WAF1-luciferasa y 2 μg de vector pcDNA3.1 solo o que codifica 25QP-GFP, 103QP-GFP, 25Q-myc o 103Q-myc. Para los ensayos de MDR-1 luciferasa en células SAOS-2, se realizó una transfección con LIPOFECTIN® en placas de 6 pocillos de 2,5 μg de plásmido de MDR1-luciferasa (Pellegata, N. S., *et al.* (1995) Oncogene 11, 337-349.) y 500 ng de vector pcDNA3.1 solo o plásmidos que codifican p53, 20QP, 93QP, 25Q-myc o 103Q-myc usando pBlueScript (Stratagene, La Jolla, California) para igualar todas las concentraciones de ADN hasta 40 5 μg.

45 Para todos los ensayos de luciferasa, se usaron tampón de lisis y tampones de sustratos de luciferasa A y B según lo descrito por el fabricante (PharMingen, San Diego, California). Se midió la actividad de luciferasa durante 10 s con un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, California). Las concentraciones de proteína de los lisados se determinaron mediante análisis de Bradford y la actividad luciferasa se calculó por miligramo de proteína.

50 *Inmunohistoquímica en cerebro de ratón transgénico.* Se usó la línea de ratón transgénico R6/2 (Mangiarini, L., *et al.* (1996) Cell 87, 493-506) [código Jackson B6CBA-TgN(HDexon 1)62] y se mantuvo el retrocruzamiento en ratones (CBA X C57BL/6)F₁. El genotipado y el dimensionamiento de las repeticiones de CAG fueron según lo descrito previamente (Mangiarini, L., *et al.* (1997) Nat. Genet. 15, 197-200).

55 Las diluciones originales y de trabajo de anticuerpos eran tal como sigue: S830 (1:1000) se produjo frente a una proteína de fusión de exón 1 de Htt en oveja, anti-ubiquitina (1:2000; Dako, Carpintería, California) y anti-CBP (A22) (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Se realizó la inmunohistoquímica según lo descrito previamente (Davies, S., *et al.* (1999) Methods Enzymol. 309, 687-701) en secciones de 15 μm cortadas de cerebros congelados en isopentano usando el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California). El anticuerpo anti-oveja secundario biotinilado era de la Scottish Antibody Production Unit (Carluke, Escocia).

60 Ensayos de acetiltransferasa. El efecto de las proteínas Htt sobre la actividad acetiltransferasa se sometió a ensayo *in vitro* mediante una técnica modificada, según lo descrito en Ail-Si-Ali, S., *et al.* (1998) Nucleic Acid Res. 26, 3869-3870). Las proteínas de fusión de GST se lavaron en 1X tampón HAT (butirato 10 mM a pH 7,5, glicerol al 10%, Tris HCl 50 mM a pH 8,0, DTT 0,5 mM, EDTA 0,1 mM, PMSF 0,1 mM), entonces se eluyeron con glutatión 15 mM en 1X tampón HAT que contenía NaCl 50 mM. Cuantificadas mediante tinción con Coomassie, se incubaron 0,6 nmoles de proteínas de fusión Htt GST o GST sola durante 10 minutos a temperatura ambiente con 10 pmoles de GST-CBP (aminoácidos 1.099-1.877), 4 pmoles de GST-p300 (aminoácidos 1.195-1.707) (Upstate Biotechnology, Waltham, Massachusetts) o 360 pmoles de GST-P/CAF (aminoácidos 87-832), según lo estimado mediante el análisis de Bradford, en un volumen total de 55 μl.

ES 2 310 213 T3

A continuación, se añadieron 10 μCi de ^{14}C -acetil-coenzima A (52 mCi mmoles $^{-1}$, DuPont NEN, Boston, Massachusetts) y 2 μg de péptido de H4 N-terminal biotinilada (aminoácidos 1-21) (Upstate Biotechnology) en un volumen de 4 μl y se incubó la mezcla durante 45 min. a 30°C. Entonces se añadió una alícuota de 500 μl de 1 X tampón HAT con 30 μl de una suspensión al 50% de estreptavidina-agarosa (Upstate Biotechnology) equilibrada previamente con 1X tampón HAT. Se hizo rotar esta mezcla a 4°C durante 20 min., entonces se centrifugó en una microcentrífuga a 2.600 g durante 2 min.

Se retiró el sobrenadante, se lavó el sedimento dos veces en tampón RIPA (Tris 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, EDTA 1 mM y PMSF 0,1 mM) y se contó en un contador de centelleo líquido. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se calculó el error estándar de la media.

Análisis de acetilación de histonas en un extracto de células PC12. Se colocaron en placas células PC12, transfectadas de manera estable con F103QP-EGFP inducible por ecdisona (Invitrogen), se indujeron con ponasterona 5 μM (Invitrogen) durante 48 h y se trataron las últimas 24 h con butirato de sodio 5 mM. Los controles incluían células no inducidas y/o no tratadas con butirato. Se lisaron las células en 1X tampón HAT con NaCl 50 mM, NP-40 al 0,3% y un cóctel de inhibidores de proteasas en hielo durante 10 min. Se analizó una alícuota de 50 μg de extracto de células completas mediante inmunotransferencia de tipo Western.

También se analizaron líneas celulares PC12 inducibles por ecdisona, separadas, derivadas independientemente, denominadas células PC12/pBWN:Htt ex1Q103-EGFP y PC12/pWN:Httex1Q25-EGFP (E.S. Schweitzer, UCLA). Estas células clonales contienen un exón 1 de Htt modificado insertado en un vector de expresión que contiene el elemento regulado por ecdisona *Bombyx* (descrito en Suhr, S. T., *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 7999-8004).

Se analizaron veinticinco microgramos de extractos de células completas de células PC12 transfectadas de manera estable con plásmidos que codifican 25QP-EGFP y 103QP-EGFP inducibles para determinar la actividad acetiltransferasa. Se analizaron células control (no inducidas) y células inducidas con tebufenicida 1 μM durante 12 h mediante inmunotransferencias de tipo Western. Se usaron anti-histona H4 acetilada, anti-histona H3 y anti-histona H3 acetilada (todas de Upstate Biotechnology) para determinar los niveles de histonas H3 y H4 acetiladas con respecto a los niveles de H3 total.

Reservas de Drosophila y cruces. La expresión de péptidos que contienen poliglutamina está dirigida por la secuencia activadora del sistema de expresión biparental (UAS)-GAL4 en moscas transgénicas (Marsh, J. L. *et al.* (2000) Hum. Mol. Gen. 9, 13-25).

La inyección de plásmidos que expresan Httex1p con 20 ó 93 glutaminas produjo nueve y diez líneas, respectivamente. Se eligieron dos líneas con el fenotipo neuronal más grave (P463 y P465) para los experimentos descritos en el presente documento. Las reservas de poliglutamina son $w;P(w^{+mC} = \text{UAS} - Q93\text{htt exon1})^{4F1}$ y $w;P(w^{+mC} = \text{UAS} - Q48 + \text{myc/flag})^{20}$. Se cruzaron los constructos bajo el control de una UAS de levadura en moscas que expresan el activador transcripcional GAL4 de levadura (Brand, A. y Perrimon, N., citado anteriormente) dirigido por el promotor específico de neuronas *elav* (activador del cromosoma 2 para líneas Q48, Luo, L. *et al.* (1994) Genes Dev. 8.1787-1802, y activador del cromosoma X para las líneas del exón 1 de Htt, Lin, D. M. & Goodman, C. S. (1994) Neuron 13, 507-523) que se expresa en todas las neuronas desde la embriogénesis en adelante: $w;P(w^{+mC};w+; \text{elav-GAL4})/CyO$, $P(w^{+mC} = \text{Act-GFP})/JMR1CyO$ *actina-GFP* o $w;P(w^{+mW}.hs = \text{GawB})/\text{elav}C155$.

Los intervalos de concentración de inhibidor sometidos a prueba se basaban en experimentos de cultivo celular (SAHA; Calbiochem, San Diego, California) o estudios de variegación por el efecto de la posición publicados (butirato; Reuter, G., Dorn, R. & Hoffman, H. J. (1982) Mol. Gen. Genet. 188, 480-485). Para someter a prueba el efecto de *Sin3A* sobre los fenotipos de poliglutamina, se cruzaron hembras vírgenes $w;P(w^{+mC} = \text{UAS-Q93htt exon1})^{4F1}$ con machos $w;P\{w^{+mC}wPw; \text{elav-GAL4}\}/Y; \text{Sin3A}^{08269}/Bc \text{ Gla}$.

Análisis de pseudopupila y expresión transgénica. El análisis de pseudopupila permite la visualización de la disposición de los rabdómeros en los ommatidios del ojo compuesto (Franceschini, N. (1972) in Information processing in the visual systems of arthropods, ed. Wehner, R., págs. 75-82). Se decapitaron moscas adultas, se sumergió un ojo en una gota de esmalte de uñas y se montó la cabeza sobre un portaobjetos de microscopio. Se analizaron los ojos con un microscopio Nikon EFD-3/Optiphot-2 usando un objetivo 50x, y se tomaron fotografías con una cámara Spot. Al menos 200 ommatidios se evaluaron para cada afección. Para el análisis de tipo Western de la expresión transgénica, se molieron 20 larvas de cada muestra en un tampón que contenía fosfato 0,1 M a pH 7,1, sacarosa 0,3 M, feniltiourea 0,02 mM, cóctel de proteasas y PMSF 0,1 mM, y se cargaron 200 μg de lisado total por carril.

p53 se agrega conjuntamente con Httex1p expandida en inclusiones en cultivo de células de mamífero. La parte amino-terminal de Htt que queda tras la rotura citoplásmica y que puede localizarse en el núcleo parece incluir la repetición de poliglutamina y una región rica en prolina que tiene características en común con una variedad de proteínas implicadas en la regulación transcripcional (Gerber, H.-P., *et al.* (1994) Science 263, 808-810). Por tanto, la Htt puede posiblemente interactuar directamente con factores de transcripción o el aparato transcripcional y mediar en las alteraciones en la transcripción.

ES 2 310 213 T3

Para explorar las posibles interacciones de Htt con las proteínas nucleares implicadas en la regulación transcripcional, se evaluó la composición de proteínas celulares asociadas con agregados semipurificados, o inclusiones, usando una técnica de purificación novedosa. La Httex1ps que contenía la repetición de poliglutamina expandida, marcada con epítipo en el extremo carboxilo-terminal con GFP, se expresó de manera transitoria en células HEK293 y el análisis de fluorescencia de células fijadas, tanto 103QP-GFP (proteína del exón 1 completa) como 103Q-GFP (una forma truncada de proteína del exón 1 que carece de la región rica en prolina) formó inclusiones predominantemente en el citosol, perinúcleo o medios (datos no mostrados).

Los agregados extracelulares se aislaron a partir del medio y las proteínas solubles de la preparación de agregado (AGG) se resolvieron mediante SDS-PAGE al 8% junto con alícuotas de la fracción de células completas de las células transfectadas (WC), usando proporciones equivalentes de WC:AGG. El gel se sometió a inmunotransferencia de tipo Western y se usaron antisueros para examinar los niveles relativos de 103Q-GFP Htt, p53, CBP, mSin3a, mdm2, AR, p65 de NF- κ B y RXR α .

Los resultados para los agregados generados en células HEK293 que expresan 103Q-GFP se muestran en la figura 2. Los resultados eran idénticos a los agregados purificados a partir de 103QP-GFP (datos no mostrados), mientras que no había proteína Htt inmunorreactiva en las muestras que correspondían a la fracción de agregados aislada a partir de células HEK293 que expresan 25Q-GFP (datos no mostrados).

Según lo mostrado en la figura 2, ambas Htt y p53 están presentes en las inclusiones generadas de 103Q-GFP. La proteína p53 está sumamente enriquecida en comparación con otras proteínas celulares, tales como CBP y mSin3a, las cuales se ha demostrado previamente que se localizan conjuntamente con las inclusiones mediante otros procedimientos. La purificación de agregados a partir de células intactas mostró un enriquecimiento similar para p53 (datos no mostrados). Se analizaron otras proteínas nucleares diversas para determinar una asociación con los agregados tras la normalización de la inmunorreactividad de cada proteína en lisados de células completas usando la cuantificación de ¹²⁵I. El AR y mdm2 parecen estar ausentes en la preparación de agregados, mientras que la subunidad p65 de NF- κ B y RXR α parece estar presente.

Httex1p interacciona con la proteína p53 in vitro y en cultivo celular. Se usaron experimentos de coprecipitación de GST para determinar si hay una interacción directa entre la región amino-terminal de Htt y p53. Se purificaron las proteínas de fusión de GST a partir de *Escherichia coli* que expresa GST-20QP (exón 1 completo que contiene 20 glutaminas), GST-51QP (exón 1 que contiene 51 glutaminas), GST sola y GST-103Q (exón 1 truncado que contiene 103 glutaminas). Se incubaron p53 de longitud completa marcada con ³⁵S (aminoácidos 1-393) y p53 truncada (aminoácidos 1-347) que carecían de la región C-terminal con cada proteína de fusión de GST acoplada a perlas de glutatión-agarosa, se lavaron las perlas y se resolvieron cantidades similares de proteína mediante SDS-PAGE.

La autorradiografía de un experimento representativo se muestra en la figura 3. El porcentaje de unión \pm EE se calculó mediante análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad y se indica debajo de cada carril. También se analizó según lo mostrado el diez por ciento de la entrada de las proteínas marcadas. Una ligera alteración en el patrón de migración de p53 en el carril de GST-51QP en comparación con el carril de GST-20QP se debe a las grandes cantidades de GST-51QP que migra conjuntamente con p53 marcada.

Según lo mostrado en la figura 3, la p53 de longitud completa se une fuertemente a la proteína normal (GST-20QP) o bien de repetición expandida (GST- 51QP) *in vitro*. Sin embargo, una repetición larga que contiene poliglutaminas expandidas (GST-103Q), pero que carece de la región rica en prolina, muestra una unión enormemente reducida, lo que sugiere que la unión de p53 y Htt depende de la presencia de la región rica en prolina *in vitro*. La p53 truncada que carece de los aminoácidos C-terminales 348-393 ya no interacciona con Htt (figura 3). Estos datos demuestran que la región amino-terminal de Htt interacciona con p53 y esta interacción requiere la presencia de la región C-terminal de p53 así como la región rica en prolina de Htt.

Para someter a prueba una interacción entre p53 y las diversas Httex1ps en cultivo celular, se realizaron experimentos de coprecipitación de GST adicionales. Se transfectaron de manera transitoria células HEK293 con plásmidos que codifican p53 y GST, GST-20QP, GST-83QP o bien GST-103Q. Se rompieron las células y se incubaron los lisados con perlas de glutatión-agarosa. Tras un lavado extenso, se cargaron las perlas directamente en un gel de SDS al 8%. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western que usan anticuerpo anti-p53 monoclonal se muestra en la figura 4.

Según lo mostrado, se encontró que p53 se purificaba conjuntamente con Httex1p de intervalo normal y expandida (GST-20QP y GST-83QP) así como con una forma truncada de una Httex1p expandida que carece del dominio rico en prolina (GST-103Q), lo que demuestra una falta de dependencia de la región rica en prolina de Httex1p para una formación del complejo. Esta interacción de Htt y p53 también se confirmó en experimentos de co-inmunoprecipitación de lisados celulares usando anticuerpo anti-GFP (datos no mostrados). Las co-inmunoprecipitaciones estaban complicadas por el hecho de que el antisuero policlonal anti-p53 hacía inmunoprecipitar directamente 25QP-GFP en ausencia de p53, y, de manera similar, el antisuero anti-Q51 policlonal (Sittler, A., citado anteriormente) podía hacer inmunoprecipitar directamente la proteína p53 en ausencia de Httex1p.

La *Httex1p* *expandida* reprime la transcripción. Debido a la interacción directa observada entre p53 y Htt, se sometió a prueba si la expresión transitoria de *Httex1p* tiene un efecto sobre la transcripción de genes regulados por p53. La expresión de un indicador de $p21^{WAF1/CIP1}$, WAF1-luciferasa, que se activa transcripcionalmente por p53, se examinó en células SAOS-2 ($p53^{-/-}$) que expresan p53 exógena, ya que la activación mínima de este indicador se produce en ausencia de p53. Los resultados se muestran gráficamente en la figura 5.

Se observa la represión de WAF1-luciferasa por *Httex1p* *expandida* (103QP-GFP), mientras que las repeticiones de intervalo normal (2SQP-GFP) o los constructos de Htt que carecen de la región rica en prolina (2SQ-myc, 104Q-myc) no produjeron una represión significativa (figura 5, parte superior), lo que indica un papel para ambas, la repetición de poliglutamina *expandida* y la región rica en prolina, en la represión transcripcional.

También se realizaron ensayos de luciferasa en células PC12 ($p53^{+/+}$) transfectadas de manera estable con constructos de Htt inducibles, que contienen todos etiquetas de epítipo de GFP. Tras la diferenciación con factor de crecimiento nervioso en un fenotipo neuronal, las líneas celulares que expresaban 103QP-GFP reprimieron la transcripción de ambos, el promotor $p21^{WAF1/CIP1}$ completo (WWP-luciferasa; El-Deiry, W. S., *et al.* (1993) *Cell* 75, 817-825) y el indicador WAF1-luciferasa, de nuevo de una manera dependiente de la repetición *expandida* y de prolina (figura 6).

Un promotor sujeto a represión transcripcional mediada por p53 también se sometió a prueba usando ensayos de luciferasa realizados en células SAOS-2 ($p53^{-/-}$) transfectadas de manera transitoria (figura 5, parte inferior). Se ha mostrado previamente que el gen de resistencia a múltiples fármacos, *MDR-1*, se reprime transcripcionalmente por p53 (Pellegata, N. S., citado anteriormente; Chin, K.-V., *et al.* (1992) *Science* 255, 459-462), y se mostró que esta represión depende de la presencia de la región rica en prolina de p53 (Venot, C., *et al.* (1998) *EMBO J.* 17, 4668-4679). Por tanto se examinó la transcripción del promotor *MDR-1* fusionado a la luciferasa.

Las células SAOS-2, sin expresión de p53, mostraron altos niveles de transcripción de *MDR-1*. Cuando se expresaba p53 en estas células, se reprimía la transcripción de *MDR-1* (83%). Cuando se expresaban constructos de Htt en células SAOS-2, 93QP (*Httex1p* con 93 repeticiones) producía una represión extensa (81%) de la transcripción de *MDR-1*, incluso en ausencia de p53. Este perfil de represión transcripcional de *MDR-1* mediada por los constructos de Htt en ausencia de p53 era similar al observado para el indicador WAF1-luciferasa en las células SAOS-2 que expresan p53 y para el promotor $p21^{WAF1/CIP1}$ en células PC12 (mostrado gráficamente en la figura 6), lo que indica que la represión transcripcional por *Httex1p* *expandida* depende de la presencia de la región rica en prolina y de la longitud del tramo de glutamina.

La *Httex1p* *expandida* interactúa *in vitro* con CBP y mSin3a. La CBP es un factor de transcripción que contiene poliglutamina que activa conjuntamente la transcripción de p53 a través de la interacción con los residuos 1-73 de p53, incluyendo el dominio de activación y parte de la región rica en prolina (Gu, W., Shi, X.-L. & Roeder, R. G. (1997) *Nature* 387, 819-823). Puesto que la *Httex1p* *expandida* se asemeja estructuralmente a esta región de p53 y puesto que la CBP se agrega en inclusiones de cultivo celular junto con Htt (Kazantsev, A., citado anteriormente), se usaron experimentos de coprecipitación de GST para examinar la interacción entre CBP marcada con ^{35}S y diversas proteínas de fusión de GST.

Se mezclaron cantidades equivalentes de CBP marcada con [^{35}S]metionina (I) o mSin3a (II) con GST, GST-20QP, GST-51QP, GST-103Q o GST-p53 unidos a perlas de glutatión-agarosa, se lavaron y se analizaron las proteínas marcadas unidas a las perlas mediante SDS-PAGE. Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 7, con el porcentaje de unión \pm EE, calculado mediante análisis con el sistema de detección y cuantificación de la radiactividad, indicado debajo de cada carril. También se analizó según lo mostrado el diez por ciento de la entrada de las proteínas marcadas.

Según lo mostrado en la figura 7-I, CBP interactúa débilmente con *Httex1p* de manera dependiente de la longitud de repetición de poliglutamina y de prolina *in vitro*.

Se obtuvieron resultados análogos para mSin3a, un co-represor que puede mediar en la represión transcripcional a través de una interacción directa con p53 (Murphy, M., *et al.* (1999) *Genes Dev.* 13, 2490-2501). El co-represor mSin3a se une a la región amino-terminal de p53 a través de una interacción con los aminoácidos 40-160, que incluye parte del dominio de activación y la región rica en prolina de p53. Los experimentos de coprecipitación de GST, que usan las mismas proteínas de fusión de GST descritas anteriormente, muestran que mSin3a también interactúa débilmente con *Httex1p* de manera dependiente de la longitud de la repetición de poliglutamina y de prolina *in vitro* (figura 7-II).

La CBP se localiza en inclusiones intranucleares neuronales en ratones transgénicos. Para demostrar que las interacciones de *Httex1p* *expandida* con CBP se producen *in vivo* en las neuronas de un modelo de ratón transgénico con EH, se realizó la inmunohistoquímica de inclusiones intranucleares neuronales. Los resultados se muestran en la figura 8.

Se ha demostrado previamente que mSin3a está presente *in vivo* en inclusiones intranucleares neuronales en secciones de cerebro de pacientes humanos con EH (Boutell, J. M., citado anteriormente). Según lo mostrado en la figura 8C, la CBP se localiza en inclusiones nucleares frente a tinción nuclear de fondo en secciones de cerebro estriadas aisladas de ratones transgénicos R6/2 de 12 semanas de edad. Las inclusiones de estas secciones también se tiñen de

ES 2 310 213 T3

manera positiva para proteína Htt (figura 8A) y ubiquitina (figura 8B). La CBP también está presente en inclusiones a las 8 semanas (datos no mostrados), lo que sugiere que la localización de CBP en los agregados es un proceso que se produce relativamente pronto. El patrón de tinción nuclear difuso normal de CBP se muestra en controles de la misma camada de tipo natural (figura 8D).

5 *El fragmento 51QP Htt interactúa principalmente con los dominios de acetiltransferasa y CH3 de CBP.* Según lo mostrado anteriormente, la Htt truncada con un dominio de poliglutamina expandida interactúa con CBP de longitud completa *in vitro* y se agrega conjuntamente en cultivo celular, lo que sugiere dos hipótesis para la acción de Htt que no son mutuamente excluyentes. En primer lugar, es posible que la actividad disponible de las proteínas
10 celulares que contienen dominios de poliglutamina naturales pueda reducirse atrapándolos en agregados a través de interacciones poliglutamina-poliglutamina. Como alternativa, las interacciones solubles entre Htt y dianas celulares pueden afectar directamente a las actividades enzimáticas.

15 Para distinguir las contribuciones de las interacciones poliglutamina-poliglutamina de las de otras interacciones, se investigó qué dominios funcionales de CBP se dirigen a la unión por Httex1p, usando ensayos de coprecipitación de GST. Se incubaron sondas de proteína marcadas con ³⁵S que abarcan la longitud de CBP (mostrado en la figura 9) con perlas de glutatión-agarosa acopladas a Httex1p con 51 repeticiones de glutamina y el dominio rico en prolina.

20 Los resultados se muestran gráficamente en la figura 10. Se observó una unión significativa a las sondas que contenían el dominio CH2 y la parte amino-terminal del dominio de acetiltransferasa (residuos 1.069-1.459), a las sondas que contenían la parte carboxi-terminal del dominio acetiltransferasa (residuos 1.459-1.759) y a las sondas que contenían parte del dominio de acetiltransferasa así como el dominio CH3 (residuos 1.459-1.877).

25 Una sonda de CBP que contiene parte del dominio CH3 y el tramo de poliglutamina C-terminal (residuos 1.742-2.441) se unen a GST-51QP, mientras que la delección del tramo de poliglutamina (residuos 1.742-2.441ΔQ) tiene un efecto insignificante sobre la unión. Un fragmento de CBP que contiene el dominio poliglutamina C-terminal de CBP (residuos 1.832-2.441) no interactuó *in vitro* con GST-51QP. Estos datos indican que la interacción directa entre el fragmento 51QP Htt y CBP no está mediada por las interacciones glutamina-glutamina. Más bien, indican que 51QP
30 interactúa principalmente con la región de CBP que contiene los dominios de acetiltransferasa y CH3.

35 *Httex1p se une a otras proteínas que contienen dominios de acetiltransferasa.* A continuación se investigó si Httex1p se une a otras proteínas que contienen dominios de acetiltransferasa, tales como P/CAF. A diferencia de CBP, P/CAF no contiene una región rica en poliglutamina (véase la figura 9). No obstante, P/CAF de longitud completa (residuos 1-832), así como los residuos que contienen el dominio de acetiltransferasa (512-832), mostraron una unión significativa (12-13%) a GST-51QP *in vitro* (figura 10).

40 *La región rica en prolina de Httex1p potencia, pero no es esencial para, la interacción in vitro con el dominio de acetiltransferasa de CBP.* Habiéndose encontrado que el dominio de repetición expandida de Htt interactúa con ambas, CBP y P/CAF, principalmente a través de los dominios de acetiltransferasa y vecinos, se buscó la determinación de las características de Httex1p que son importantes para la unión. Se sometió a prueba si la longitud del tracto de poliglutamina o la presencia de la región rica en prolina afectaban a esta interacción. Los resultados se muestran en la figura 11.

45 La figura 11 es un autorradiograma representativo con cuantificación mediante análisis con el sistema de detección y cuantificación de la radiactividad, que muestra la unión de 1.459-1.877 de la sonda de CBP a los diferentes constructos GST-Htt. La unión de GST-Httex1p al dominio de acetiltransferasa/CH3 de CBP se potencia cuando la repetición de poliglutamina se expande desde el intervalo normal (GST-25QP o GST-25Q) a un intervalo patógeno (GST-51QP o GST-51Q). Las fusiones de GST que contienen el dominio rico en prolina de Htt (GST-20QP y GST-51QP) interactúan mejor con las sondas de dominio de acetiltransferasa que sus homólogos sin el dominio rico en
50 prolina (GST-20Q y GST51Q). Por tanto, la región rica en prolina potencia, pero no es esencial para, la interacción *in vitro*.

55 *Httex1p inhibe la actividad acetiltransferasa in vitro.* Httex1p interactúa *in vitro* con los dominios de acetiltransferasa de P/CAF y CBP. En consecuencia, se midió *in vitro* el efecto de Httex1p sobre la actividad acetiltransferasa de las proteínas co-activadoras transcripcionales expresadas ampliamente, CBP, p300 y P/CAF. Se incubaron cantidades equimolares de proteínas GST, GST-20QP, GST-20Q, GST-51QP y GST-51Q con GST-CBP-A (residuos 1.099-1.877), GST-p300-A (residuos 1.195-1.707) o GST-P/CAF-A (residuos 87-832), que contenían los dominios de acetiltransferasa. Tras una breve incubación, se controló la acetilación de un péptido de H4. La presencia de la proteína de fusión de GST de Htt, GST-51Q, así como GST-20QP y GST-51QP, que contenían la región rica en prolina, redujo
60 significativamente la actividad acetiltransferasa de CBP, p300 y P/CAF, mientras que GST y GST-20Q no, tal como se muestra gráficamente en la figura 12.

65 Esto demuestra que la interacción directa de Htt con dominios de acetiltransferasa (figura 11) inhibe la función de la acetiltransferasa y que los tramos largos de poliglutamina son más potentes que las repeticiones de intervalo normal cortas. La presencia de la región rica en prolina aumenta el potencial inhibitorio de los polipéptidos de poliglutamina. Sorprendentemente, GST-51Q inhibe la actividad acetiltransferasa casi tan bien como GST-51 QP, lo que demuestra que los tramos de poliglutamina expandida pueden interactuar con dominios de acetiltransferasa e inhiben la función sin la región rica en prolina.

ES 2 310 213 T3

Httex1p reduce la acetilación de las histonas H3 y H4 cuando se expresa en cultivo celular. Debido a que *Httex1p* interacciona directamente con dominios de acetiltransferasa e inhibe su función *in vitro*, se analizaron los niveles de acetilación de H3 y H4 en células PC12 transfectadas de manera estable con constructos de *Httex1p* inducibles. La figura 13 es una inmunotransferencia de tipo Western que muestra niveles de acetil-H3 y acetil-H4 con y sin inducción de constructos de *Httex1p*. Según lo mostrado en la figura 13a, la expresión de *Httex1p* con una repetición de intervalo normal (25QP) reduce la acetilación de ambas histonas H3 y H4 en comparación con las células no inducidas, con expresión de una *Httex1p* de repetición expandida (103QP) que muestra una reducción incluso mayor de la acetilación.

Para verificar estos resultados, se analizaron los niveles de acetilación en una segunda línea celular transformada, generada en una cepa diferente de células PC12. La inducción de una *Httex1p* de repetición de poliglutamina expandida (103QP) en la segunda línea de PC12 conduce también a una reducción de la acetilación de la histona H4 en los extractos de células completas en comparación con células no inducidas, mostrado en la figura 13b. Cuando se tratan estas células con el inhibidor de HDAC, butirato de sodio, se aumentan los niveles de acetilación de H4 en ambas células, no inducidas e inducidas (figura 13b). La tricostatina A y la suberoilánilida del ácido hidroxámico (SAHA) también aumentaron la acetilación de H3 y H4, revirtiendo la disminución inducida por *Httex1p* (datos no mostrados). Mientras que los niveles de acetilación están alterados, los niveles de histona total en extractos de células completas, determinados mediante tinción con azul de Coomassie de lisados de células totales, permanecen inalterados por la inducción de proteínas Htt. Por tanto, la expresión de *Httex1p* provoca una reducción global en la acetilación de las histonas H3 y H4 que se revierte en presencia de inhibidores de HDAC.

Según lo mostrado en las figuras 11 y 12, ambas, Htt de repetición normal y Htt expandida se unen e inhiben la actividad acetiltransferasa. Esto plantea la pregunta de por qué la patología se asocia sólo con Htt de repetición expandida. Se ha mostrado que la Htt expandida pueden procesarse proteolíticamente y que el fragmento patógeno que resulta del procesamiento proteolítico se localiza en el núcleo, donde puede inhibir la actividad acetiltransferasa (Paulson, H. L. (1999) *Am J Hum Genet* 64, 339-345; Klement, I. A. *et al.* (1998) *Cell* 95, 41-53; Saudou, F., *et al.* (1998) *Cell* 95, 55-66). Sin embargo, la Htt de repetición normal no expandida no se localiza normalmente en el núcleo (Sapp, E. *et al.* (1997) *Ann. Neurol.* 42, 604-611) y por tanto no está presente en el compartimento celular apropiado para inhibir la actividad de CBP nuclear. De hecho, las repeticiones de glutamina no expandidas pueden provocar patología. Por ejemplo, la proteína ataxina 1 humana no expandida, que contiene 30 glutaminas, se localiza normalmente en el núcleo; si se expresa a niveles suficientemente altos allí, puede producir fenotipos neurodegenerativos similares a ataxina-1 de 82 glutaminas expandida en *Drosophila* o bien ratones. (Fernandez-Funez, P. *et al.* (2000) *Nature* 408, 101-106.) Por tanto, la patogénesis de poliglutamina depende fuertemente de ambos, el nivel y la ubicación.

Los inhibidores de histona desacetilasa rescatan de la degeneración neuronal progresiva y la mortalidad en Drosophila. La acetilación reducida de histonas observada en presencia de *Httex1p* de repetición expandida *in vitro* (con o sin el tracto rico en prolina) y la reversión posterior de este efecto con inhibidores de HDAC en cultivo celular, sugería que la actividad acetiltransferasa reducida puede ser un componente importante de la patogénesis de poliglutamina *in vivo*. Los péptidos de poliglutamina expandida solos (Marsh *et al.*, citado anteriormente) así como la *Httex1p* de repetición expandida, según lo mostrado en el presente documento, son intrínsecamente citotóxicos y provocan una viabilidad reducida y degeneración neuronal cuando se expresan en neuronas de *Drosophila*.

Si la patología de poliglutamina implica la supresión de la acetilación de proteínas, entonces puede predecirse que la inhibición del proceso de desacetilación mediante dos mecanismos completamente independientes (por ejemplo, farmacológica o genéticamente) ralentizará o reducirá la patogénesis de poliglutamina *in vivo*. Para someter a prueba esta hipótesis, se modificaron mediante ingeniería genética moscas transgénicas para que expresaron *Httex1p* o bien sólo péptidos de poliglutamina en neuronas. Se evaluaron los efectos de alimentar moscas con los inhibidores de HDAC butirato y SAHA, y de reducir genéticamente la actividad HDAC de las moscas, sobre ambas, la mortalidad y la degeneración de neuronas fotorreceptoras.

La neurodegeneración se observa de la manera más fácil en el ojo compuesto de mosca, que se compone de una disposición trapezoidal regular de siete rabdómeros visibles (estructuras subcelulares que captan la luz) producidos por las neuronas fotorreceptoras de cada ommatidio de *Drosophila*. Según lo mostrado gráficamente en la figura 14, la expresión de *Httex1p* con un tracto expandido de 93 glutaminas (Q93) conduce a una pérdida progresiva de rabdómeros. En lugar de los 7 rabdómeros visibles normales, el número de rabdómeros observados en moscas que expresan *Httex1p* Q93 disminuye progresivamente desde un promedio de 6,35 en el día 1, hasta 5,13 y 4,66 en los días 6 y 12 tras la eclosión, respectivamente (es decir, tras la emergencia desde la cubierta de la pupa como un adulto). La cría de larvas que expresan *Httex1p* Q93 en alimento que contiene SAHA o bien butirato reduce el nivel de degeneración observado, según lo mostrado en las figuras 15 y 16, respectivamente. La expresión del transgén *Httex1p* Q93 también da como resultado aproximadamente un 70% de mortalidad (datos no mostrados) y muerte temprana de los adultos (figura 17). Por el contrario, los animales alimentados con el inhibidor de HDAC SAHA muestran un aumento en la viabilidad (SAHA 10 μ M suprime la mortalidad hasta el 45%; datos no mostrados) y la muerte temprana en adultos se reprime notablemente de manera dependiente de la concentración (figura 17).

Los efectos de los inhibidores de HDAC sobre moscas transgénicas que expresan los péptidos de poliglutamina expandida solos (Q48) fueron similares a los descritos anteriormente: las moscas Q48 alimentadas con butirato o SAHA tiene la misma distribución de rabdómeros en el día 6 que las moscas de 1 día de edad (datos no mostrados),

ES 2 310 213 T3

mientras que sus consanguíneos que no recibieron inhibidores de HDAC mostraron una degeneración significativa del número de rabdómeros a lo largo del tiempo (promedio de 5,47 en el día 1 frente a 3,92 en el día 6, según lo mostrado en la figura 18).

5 Incluso cuando se alimentan inhibidores de HDAC sólo tras la emergencia desde la cubierta de la pupa como adultos, aún se previno la degeneración progresiva de las neuronas fotorreceptoras (figura 19, que muestra el efecto de la administración de SAHA, y figura 20, que muestra el efecto de la administración de butirato). Las fotografías de ommatidios de moscas que expresan Q48 con y sin inhibidores de HDAC se muestran en la figura 21. Según lo mostrado, la administración de butirato o bien SAHA perturba el efecto neurodegenerativo de Q48. Por tanto, 10 incluso cuando se administran a animales que ya mostraban neurodegeneración, los inhibidores de HDAC retardan notablemente (o detienen) una degeneración neuronal adicional. Por tanto, los inhibidores de HDAC rescatan de los efectos patológicos de ambos, péptidos de poliglutamina y polipéptidos del exón 1 de Htt *in vivo*.

Es posible que los inhibidores de HDAC puedan afectar a procesos celulares distintos de las rutas de desacetilasa. 15 Como una prueba independiente de la significación de los niveles de acetilación en el proceso patógeno, se manipularon genéticamente los niveles de acetilación y se examinó la patología resultante. El locus *Sin3A* de *Drosophila* codifica una proteína co-represora que es un componente de los complejos de HDAC (Neufeld, T. P., Tang, A. H. & Rubin, G. M. (1998) *Genetics* 148, 277-286). La reducción de los niveles de HDAC mediante un mutante con pérdida de función parcial, *Sin3^{A08269}*, en heterocigotos aumentó la viabilidad de las moscas Httex1p Q93 desde el 29% hasta 20 el 65% y condujo a una reducción en la extensión y la tasa de neurodegeneración, según lo mostrado gráficamente en la figura 22. Debido a que el alelo mutante representa una pérdida parcial de la función de Sin3A, el efecto sobre el rescate de la neurodegeneración puede ser menor que el observado en presencia de inhibidores de HDAC. Por tanto ambas reducciones, genética y farmacológica, en la actividad de HDAC reducen la tasa y extensión de la patología inducida por poliglutamina.

25 Para descartar la posibilidad de que el rescate de la degeneración y mortalidad mediante inhibidores de HDAC se debiera simplemente a la expresión alterada de los transgenes de poliglutamina en presencia de inhibidores de HDAC, se prepararon extractos de larvas que expresan Httex1pQ93 y se trataron con disolvente solo o bien con SAHA o butirato. Se resolvieron cantidades similares de proteína, según lo determinado mediante ensayos de Bradford 30 y confirmado mediante tinción con Coomassie, en un gel de SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western. La inmunotransferencia de tipo Western, tratada con sonda con anticuerpo anti-Htt, se muestra en la figura 23 y demuestra que la expresión transgénica permanecía inalterada por la presencia de inhibidores de HDAC.

Aunque se han mostrado interacciones funcionales de Htt con CBP, P/CAF y p300, estos resultados no excluyen 35 la posibilidad de que se dirijan otras acetiltransferasas, pero no sugieren que los tratamientos que aumentan el nivel global de acetilación puedan ser eficaces para mejorar los efectos de la enfermedad de Huntington y otros procesos neurodegenerativos, incluso tras la aparición de los síntomas.

Diversas clases de HDAC pueden suprimir los fenotipos de poliglutamina. El inhibidor SAHA inactiva las histona 40 desacetilasas de clase I y clase II pero no afecta a la actividad de las proteínas HDAC de clase III. Los mutantes Sin3A reducen la cantidad de sólo un complejo de HDAC, el complejo Sin3A.

En este caso, se muestra que la perturbación genética de diversos complejos de HDAC diferentes y la reducción de 45 la dosificación de histona desacetilasas de clase III mejoran también el fenotipo poliQ. Pero también se encuentra que el fenotipo es insensible a los cambios en el nivel de algunos productos génicos.

El gen *Sir2* codifica una histona desacetilasa de clase III que no se ve afectada por los compuestos inhibidores de HDAC clásicos. Para determinar el efecto del nivel de *Sir2* reducido sobre la patogénesis de poliQ, se cruzaron machos elav>GAL4; Httex1pQ93/TM6 con hembras *Sir2⁰⁵³²⁷/CyO*, se clasificó la progenie en eclosión y se investigó 50 la pérdida de células neuronales usando la técnica de pseudopupila descrita anteriormente.

La mutación *Sir2* redujo ambas, la mortalidad y la pérdida de células neuronales. Dado que sólo un 29% de los animales que expresan poliQ sobrevive a 25°C, un 57% de las moscas que expresan poliQ heterocigóticas *Sir2⁰⁵³²⁷* 55 sobrevivieron hasta la edad adulta. El número promedio de rabdómeros visibles en un ommatidio del ojo era de 5,84 en comparación con 5,33 en el grupo control, que portaba los alelos *Sir2* de tipo natural, según lo mostrado en la figura 24.

El gen *Mi-2* codifica un cofactor de clase I de HDAC que es una subunidad crítica del complejo de HDAC NuRD. Para determinar si la perturbación de este complejo puede suprimir los fenotipos poliQ, se cruzaron machos 60 elav>GAL4; Httex1pQ93/TM6 con hembras *Mi-2^{j3D4}/TM3*, se puntuó la progenie en eclosión y se investigó la pérdida de células neuronales usando la técnica de pseudopupila. Las moscas que expresan poliQ que portan el alelo mutante *Mi-2^{j3D4}* muestran un 53% de viabilidad en comparación con el 29% de viabilidad de las moscas que expresan poliQ con alelos *Mi-2* de tipo natural. El número promedio de rabdómeros visibles en un ommatidio del ojo es de 5,63 en comparación con 5,09 en el grupo control, mostrado en la figura 25.

65 Estudios con otros elementos genéticos han mostrado que múltiples, pero no todos los complejos HAT/HDAC pueden ser dianas eficaces para reducir la neurodegeneración mediada por poliglutamina. Por ejemplo, aún no se ha encontrado un efecto significativo demostrable de la reducción de los elementos genéticos Su(var)205, CtBP y Pcaf,

ES 2 310 213 T3

mientras que Sir2, Mi-2 y Df(HAT) sí que muestran respuestas medibles. Estos resultados indican que múltiples, pero no todos los complejos HAT/HDAC puede ser dianas eficaces para reducir la neurodegeneración mediada por poliQ.

Estos datos sugieren que las estrategias de tratamiento farmacológico combinatorio pueden ser eficaces y que la 5 identificación de dianas permitirá centrarse en el subconjunto de loci que son más importantes. Los inhibidores de molécula pequeña de Sir2 se han descrito recientemente e incluyen sirtinol y vitamina B3 (Luo, *et al.* (2001) *Cell* 107: 137-148) y esplitomicina (Bedalov, *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15113-15118).

10 *Los inhibidores de HDAC como agentes terapéuticos.* Según lo mostrado en el presente documento, los péptidos de Htt pueden conducir a niveles reducidos de acetilación y transcripción, ambos, mediante la unión a dominios de acetiltransferasa y la inhibición de la actividad soluble, y secuestrando los factores de transcripción que contienen poliglutamina (tales como CBP y otros) atrapándoles en agregados. Cuando se sometió a prueba *in vivo* en modelos de *Drosophila* de patogénesis de poliglutamina, la inhibición del proceso de desacetilación mediante dos mecanismos independientes - farmacológico (inhibidores de HDAC) y genético (reducción de actividad Sin3A) - redujo la 15 degeneración de neuronas fotorreceptoras y la mortalidad.

Estos resultados demuestran un papel del estado de acetilación en el proceso patógeno y, más específicamente, la utilidad de los inhibidores de desacetilasa como agentes terapéuticos para la enfermedad de Huntington y otras 20 enfermedades relacionadas. Varios inhibidores de HDAC, incluyendo SAHA (Marks, P. A., Richon, V. M. y Rifkind, R. A. (2000) *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1210-1216), están aprobados actualmente por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. para su uso en otras prácticas clínicas o están en ensayos clínicos en fase I, particularmente para el tratamiento del cáncer.

La presente invención extiende la utilidad de estos inhibidores al tratamiento de la enfermedad de Huntington 25 y otras enfermedades neurodegenerativas, tales como las provocadas por péptidos de poliglutamina (enfermedad de Kennedy, atrofia dentatorrubropalidolusiana, ataxia espinocerebelosa, tipos 1, 2, 3 (Machado-Joseph), 6 y 7, y TBP (atrofia cerebelosa grave)) o caracterizadas por la agregación de proteínas en el cerebro (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, enfermedad priónica y otras encefalopatías espongiiformes). Los inhibidores de acetilasa son también útiles en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas 30 tales como esquizofrenia, trastorno bipolar y enfermedad depresiva, y en el tratamiento de la epilepsia.

Enfermedades por repetición de poliglutamina. Según lo mostrado en el presente documento, las moscas que expresan péptidos de poliglutamina, incluso en ausencia de polipéptidos patológicos específicos, muestran una neuro- 35 degeneración progresiva, un efecto que puede suprimirse mediante inhibición farmacológica (usando inhibidores de HDAC) o bien inhibición genética (función de Sin3A reducida). Véanse las figuras 18-22. También se ha demostrado la acetilación de histonas reducida en levadura que expresa péptidos de poliglutamina (Hughes, *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13201-06). Esto sugiere que la acetilación reducida es un mecanismo común de todas las enfermedades por repetición de poliglutamina y, por tanto, que tales enfermedades pueden tratarse con inhibidores de desacetilasa.

40 Con respecto a la enfermedad de Huntington, usando ensayos de *Drosophila*, de cultivo celular e *in vitro*, los presentes inventores han mostrado que la acetilación de histonas (y, presumiblemente, otras proteínas celulares) se ve alterada por Httex1p con poliglutaminas expandidas; además, el uso de inhibidores de histona desacetilasa suprime el fenotipo patógeno en *Drosophila* que expresa Httex1p con poliglutaminas expandidas. Los presentes inventores también han mostrado que la Htt se une al dominio de acetiltransferasa de CBP y P/CAF, e inhibe la acetilación de 45 histonas mediante los dominios de acetiltransferasa de CBP, P/CAF y p300 *in vitro*.

De manera similar, con respecto a la enfermedad de Kennedy (atrofia muscular espinobulbar), la acetilación de histonas disminuye en cultivo celular en presencia del receptor de andrógenos de poliglutamina expandida, y los 50 inhibidores de histona desacetilasa suprimen esta disminución así como la muerte celular mediada por el receptor de andrógenos de poliglutamina expandida en cultivo (McCampbell, A. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15179-84). Además, los presentes inventores han mostrado que el receptor de andrógenos de poliglutamina expandida se une más eficazmente a P/CAF que el receptor de andrógenos no expandido normal (datos no mostrados).

Además, ambas atrofias, expandida y normal, se unen a los dominios AT y CH3 de CBP y a P/CAF, y la ataxina 55 1 de poliglutamina expandida se une a P/CAF mejor que la ataxina 1 no expandida normal (datos no mostrados).

Todo lo anterior desempeña un papel para las expansiones de poliglutamina en el hecho de afectar a la acetilación de proteínas y, significativamente, el potencial de los inhibidores de desacetilasa como agentes terapéuticos en el 60 tratamiento de enfermedades por repetición de poliglutamina tales como la enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, atrofia dentatorrubropalidolusiana, ataxia espinocerebelosa, tipos 1, 2, 3 (Machado-Joseph), 6 y 7, TBP (atrofia cerebelosa grave) y otras.

Enfermedades por agregación. Una característica común de muchas enfermedades neurodegenerativas es la pre- 65 sencia de agregación de proteínas en el cerebro. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por agregación de proteínas incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, enfermedad priónica y otras encefalopatías espongiiformes.

ES 2 310 213 T3

Los presentes inventores han demostrado que la Httexpl de poliglutamina expandida se agrega conjuntamente con p53 en inclusiones generadas en cultivo celular, e interaccionan *in vitro* con CBP y mSin3A; además, la CBP se localiza en inclusiones nucleares neuronales en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Huntington. Véanse las figuras 2-4, 7 y 8. Según lo tratado anteriormente, tales agregaciones de proteínas reducen los niveles de acetilación en células secuestrando proteínas celulares que tienen actividad acetiltransferasa, tales como el factor de transcripción CBP, conduciendo a neurodegeneración y muerte celular. Los presentes inventores han demostrado que tales niveles de acetilación reducidos se compensan mediante la adición de inhibidores de desacetilasa, suprimiendo el fenotipo patógeno.

Esto indica que las enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la agregación de proteínas implican también el secuestro de acetiltransferasas y, como resultado, niveles de acetilación alterados. Por ejemplo, se ha mostrado que la proteína precursora de amiloide, una proteína implicada en el daño de células nerviosas en la enfermedad de Alzheimer, interacciona con la histona acetiltransferasa (Cao, X. y Sudhof, T.C. (2001) *Science* 293, 115-120), lo que, en vista de los hallazgos de los presentes inventores, sugiere un papel para los niveles de acetilación alterados en el estado de la enfermedad de Alzheimer. En consecuencia, los inhibidores de desacetilasa tales como SAHA y butirato tienen un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades por agregación tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, enfermedad priónica y otras encefalopatías espongiiformes.

Enfermedades psiquiátricas. Finalmente, los niveles de acetilación alterados están ligados a varias enfermedades psiquiátricas. Por ejemplo, los presentes inventores han demostrado que KSCa3, un gen del canal de potasio que contiene repetición de poliglutamina y un gen candidato para la esquizofrenia, se une a los dominios de acetiltransferasa y CH3 de CBP y a P/CAF (datos no mostrados). Además, se ha mostrado recientemente que hay represión transcripcional de dos genes, reelina y GAD67, que pueden usar ambos p300/CBP como co-activadores, en los cerebros de pacientes con esquizofrenia y trastorno bipolar. Guidotti, A. *et al.* (2000) *Arch. Gen. Psychiatry* 57, 1061-69.

Además, el valproato, un fármaco usado para tratar el trastorno bipolar, la enfermedad depresiva y trastornos convulsivos tales como epilepsia, ha mostrado recientemente tener actividad histona desacetilasa. Gottlicher, M. *et al.* (2001) *EMBO J.* 20, 6969-6978; Phiel, C.J. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 36734-36741.

Además, existen una fuerte evidencia clínica que respalda la eficacia anticonvulsiva de una dieta cetogénica en el tratamiento de la epilepsia. Una dieta cetogénica aumenta los niveles de una sustancia con similitud estructural con el inhibidor de histona desacetilasa butirato (beta-hidroxibutirato) que puede tener una función de inhibidor de histona desacetilasa. (Rho, J.M., *et al.* (1999) *Epilepsy Research* 37, 233-240.) Por tanto, una dieta cetogénica deberá demostrar también ser útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas aumentando los inhibidores de histona desacetilasa endógenos.

Todo lo anterior demuestra la utilidad terapéutica de los inhibidores de desacetilasa en el tratamiento de trastornos psiquiátricos tales como esquizofrenia, trastorno bipolar, enfermedad depresiva y trastornos convulsivos tales como epilepsia.

Inhibidores de histona desacetilasa. Los inhibidores de histona desacetilasa conocidos incluyen butiratos (incluyendo butirato de sodio y fenilbutirato de sodio), tributitrina, tricostatina A (TSA), análogo de TPX-HA (compuestos de CHAP formados a partir de TSA y tripéptidos cíclicos, a base de ácido hidroxámico), trapoxina, MS-275 (MS-27-275), NSC-706995, NSC-625748, NSC-656243, NSC-144168, análogos de psammaplina, oxamflatina, apicidina y derivados, análogos de clamidocina, dimetilsulfóxido, depudecina, Scriptaid, isoquinolinimida, depsipéptido (FR901228), N-acetildinalina, SAHA, ácido subérico/bis-hidroxámico, piroxamida y análogos, ácido m-carboxi-cinámico/ácido bis-hidroxámico (CBHA), cotara 1311-chTNT-1/B, CI-944, valporato, esplitomicina, sirtinol, vitamina B3, compuestos de alil-azufre e hidroxamato dimetilaminobenzamidilcaprílico (DBCH).

Los inhibidores de histona desacetilasa caen dentro de seis clases estructurales, según lo mostrado en la tabla 2. Véase Kramer, O.H. *et al.* (2001) *Trends in Endo. & Metab.* 12, 294-300.

TABLA 2

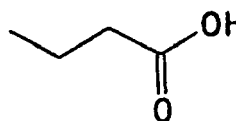
Clase estructural	Ejemplos de inhibidores de HDAC
Ácidos grasos de cadena corta y derivados	Ácido butírico y butirato de fenilo
Epóxidos	Depudecina
Tripéptidos cíclicos	Depsipéptido
Tripéptidos cíclicos con un resto 2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-decanoilo	Trapoxina
Ácidos hidroxámicos	TSA, SAHA, Scriptaid, oxamflatina
Benzamidas	MS-27-275

Las estructuras químicas de estos inhibidores de HDAC se muestran en la tabla 3.

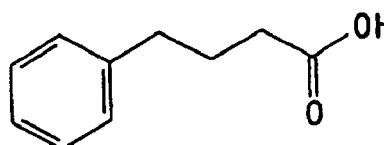
TABLA 3

Inhibidor de HDCA

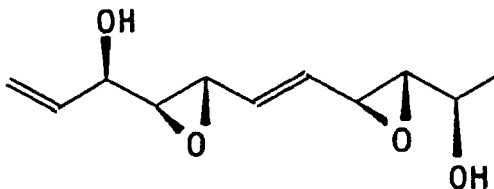
Ácido butírico

Estructura química

Butirato de fenilo



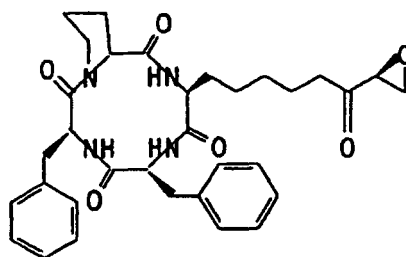
Depudecina



Trapoxina

5

10

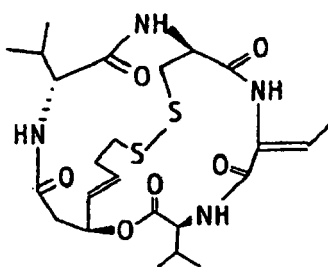


Depsipéptido

15

20

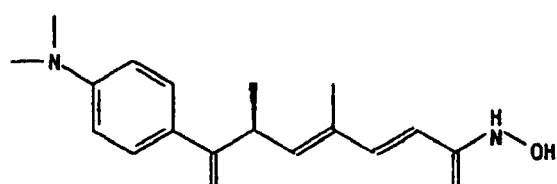
25



TSA

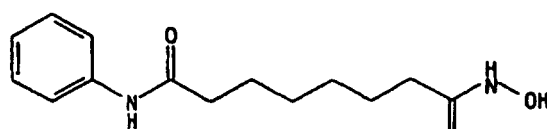
30

35



SAHA

40



Scriptaid

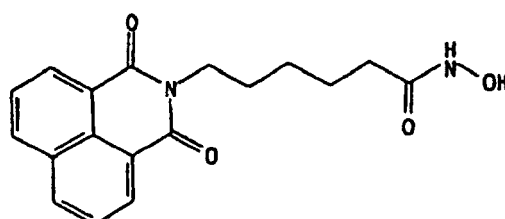
45

50

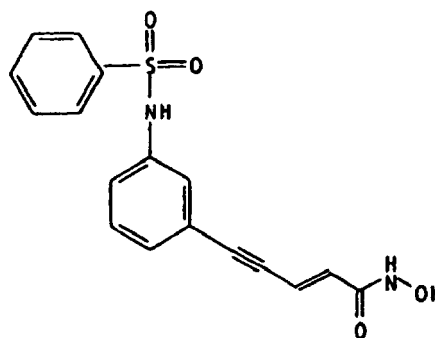
55

60

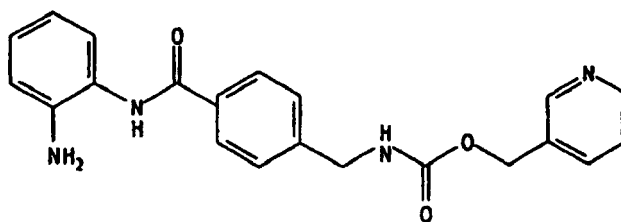
65



Oxamflatina



MS-275



La fórmula general I a continuación representa algunos de los inhibidores de desacetilasa útiles en la práctica de la presente invención:



en la que,

S se selecciona de H, grupo hidrocarbilo cíclico o acíclico, quiral o aquiral, lineal o ramificado, saturado o insaturado, con 1 a 10 carbonos, -OR₁ y -NR₁, en los que R₁, se selecciona de H, grupo hidrocarbilo cíclico o acíclico, quiral o aquiral, lineal o ramificado, saturado o insaturado, con 1 a 10 carbonos, arilo, aralquilo, heterociclilo y heterociclilalquilo, opcionalmente sustituidos con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, pirrolidino, piperidino, acilamino, ciano, aminometilo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, alcoxicarbonilo y nitro;

R se selecciona de -CO-X- o bien -X-CO-, en los que X se selecciona de N-R₂ o está ausente y R₂ se selecciona de H, grupo hidrocarbilo cíclico o acíclico, quiral o aquiral, lineal o ramificado, saturado o insaturado, con 1 a 10 carbonos, arilo, acilo y aralquilo, heterociclilalquilo tal como 2,3 y 4-piridilmetilo;

R₁ y R₂ pueden combinarse para formar un anillo heterocíclico;

B se selecciona de arilo, grupo hidrocarbilo cíclico o acíclico, quiral o aquiral, lineal o ramificado, saturado o insaturado, con 1 a 10 carbonos, heterociclilo o está ausente;

M se selecciona de grupo hidrocarbilo cíclico o acíclico, quiral o aquiral, lineal o ramificado, saturado o insaturado, con 1 a 10 carbonos o arilo;

T se selecciona de grupo uretano (-O-CO-NH- o -NH-CO-O-), grupo amida (-NH-CO- o -CO-NH-), grupo sulfonamida (-SO₂-NH- o -NH-SO₂-), grupo urea (-NR₁-CO-NR₂-), en el que R₁ y R₂ son según lo definido anteriormente, grupo imida (R₃-CO-NCO-R₄), en el que R₃ y R₄ pueden combinarse para formar un grupo arilo tal como un resto 1,8-naftilo o grupo carbonilo (-CO-) o está ausente;

Q se selecciona de H, OH, grupo hidrocarbilo cíclico o acíclico, quiral o aquiral, lineal o ramificado, saturado o insaturado, con 1 a 10 carbonos o arilo, arilo sustituido, aralquilo, aralquilo sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, heterociclilalquilo y heterociclilalquilo sustituido, en los que los sustituyentes, de 1 a 3, se seleccionan de halógeno, amino, alquilamino, dialquilamino, pirrolidino, piperidino, acilamino, ciano, aminometilo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, alcoxicarbonilo, nitro o están ausentes; y n es 1 ó 2.

Diversos inhibidores de desacetilasa se han sintetizado y usado previamente para otros fines. Véase por ejemplo, Kramer, citado anteriormente, y las referencias citadas en el mismo; Uesato, S. *et al.* (2002) *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 12, 1347-1349; Finnin, M.S. *et al.* (1999) *Nature* 401, 188-193; Richon, V.M. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10014-10019; Richon, V.M. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3003-3007; Marks, P.A. *et al.* (2001) *Curr. Opin. Oncol.* 13, 477-483; patente estadounidense número 6.087.367; patente estadounidense número 5.773.474; pa-

ES 2 310 213 T3

tente estadounidense número 5.840.960; patente estadounidense número 5.932.616; patente estadounidense número 5.700.811; patente estadounidense número 5.668.179; patente estadounidense número 5.608.108; patente estadounidense número 5.369.108; patente estadounidense número 5.330.744; y patente estadounidense número 5.175.191.

5 Es posible modificar los inhibidores de desacetilasa descritos en el presente documento para producir análogos que tengan características mejoradas, tales como mayor especificidad por la enzima, solubilidad o estabilidad mejoradas, captación celular mejorada o mejor actividad de unión. Las sales de los productos pueden cambiarse por otras sales usando protocolos convencionales.

10 Otros inhibidores de desacetilasa, así como inhibidores de desacetilasa modificados, adecuados para la práctica de la presente invención resultarán evidentes al médico experto, e incluyen cualquier compuesto que inhiba la actividad desacetilasa, incluso si no es estructuralmente similar a los compuestos mostrados anteriormente.

15 Los modos de administración para los inhibidores de desacetilasa incluyen, pero no se limitan a, oral, transdérmico, transmucosa (por ejemplo, sublingual, nasal, vaginal o rectal) o parenteral (por ejemplo, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, en bolo o infusión continua). La cantidad real de fármaco necesaria dependerá de factores tales como la altura, la edad y la gravedad de la enfermedad en el individuo afectado.

20 La cantidad real de fármaco necesaria dependerá también de los intervalos de concentración inhibidora eficaz de los diversos inhibidores de desacetilasa. Los diferentes inhibidores de desacetilasa tienen diferentes intervalos de concentración inhibidora eficaz, según lo mostrado en la tabla 4.

TABLA 4

Intervalo de concentración inhibidora eficaz	Inhibidor(es) de desacetilasa
nM	Apicidina Trapoxina Análogo de TPX-HA
nM - μ M	TSA Depsipéptido SAHA Scriptaid DBCH Ácido subérico/bis-hidroxiámico Piroxamida Ácido m-carboxi- cinámico/ácido bis-hidroxiámico
μ M	Oxamflatina Benzamida (MS-27-275) Depudecina
mM	Ácido butírico Butirato de fenilo

55 Los intervalos de dosificación apropiados para la práctica de la presente invención están en el intervalo de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 500 mM, preferiblemente de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 280 mM. Las dosificaciones ajustadas al peso corporal apropiadas para la práctica de la presente invención oscilan entre aproximadamente 1 miligramo por kilogramo de peso corporal y 1.000 miligramos/kilogramo, preferiblemente de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

60 Para esta invención, el inhibidor de desacetilasa se administrará a dosificaciones y durante periodos de tiempo eficaces para reducir, mejorar o eliminar los síntomas de la enfermedad o afección patológica. Los regímenes de dosis pueden ajustarse con fines de mejorar la respuesta terapéutica o profiláctica del compuesto. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente, una dosis o una administración cíclica de los compuestos para conseguir el resultado terapéutico deseado. Puede administrarse un único inhibidor de desacetilasa o pueden administrarse
65 combinaciones de diversos inhibidores de desacetilasa. También podrían añadirse agentes que mejoran la solubilidad de estos compuestos.

ES 2 310 213 T3

Los inhibidores de desacetilasa pueden formularse con uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables según la vía de administración seleccionada. La adición de gelatina, agentes aromatizantes o material de revestimiento puede usarse para aplicaciones orales. Para las disoluciones o emulsiones en general, los vehículos pueden incluir suspensiones, emulsiones o disoluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir cloruro de sodio y cloruro de potasio entre otros. Además, los vehículos intravenosos pueden incluir agentes de reposición de fluidos y nutrientes, agentes de reposición de electrolitos y similares.

También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos. Por ejemplo, pueden añadirse agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Mack, (1980)).

Modelos de Drosophila de patogénesis de poliglutamina útiles para someter a prueba posibles agentes terapéuticos. Además de proporcionar un procedimiento para tratar diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas mediante la administración de inhibidores de desacetilasa, la presente invención se refiere también a un modelo de mosca transgénica útil para someter a prueba posibles agentes terapéuticos. Según lo tratado anteriormente, los presentes inventores han desarrollado una reserva de mosca transgénica que expresa Httex1pQ93, y se ha mostrado que la expresión del transgén da como resultado mortalidad celular y neurodegeneración según lo medido mediante la pérdida progresiva de rabdómeros. Los presentes inventores también han demostrado que la mortalidad y neurodegeneración en la mosca transgénica pueden suprimirse mediante la administración de inhibidores de desacetilasa tales como SAHA y butirato. Otros indicadores de la patogénesis de poliglutamina, incluyendo la pérdida de la función motora, disminución de la viabilidad (por ejemplo, muerte prematura de la mosca antes de completar su desarrollo en la forma adulta) y muerte temprana de la mosca adulta, también pueden evaluarse en la reserva de mosca transgénica.

Por tanto, la reserva de mosca transgénica proporciona una herramienta útil para evaluar el potencial terapéutico de fármacos candidatos para tratar la patología neurodegenerativa de la enfermedad de Huntington y otras enfermedades o trastornos relacionados con la poliglutamina, cuando se les alimenta con diversos fármacos candidatos o se someten a prueba de otra manera en moscas transgénicas para evaluar la supresión de la mortalidad y/o neurodegeneración.

La presente invención se demuestra de una manera más completa mediante los siguientes ejemplos proféticos, que no pretenden ser limitantes de ningún modo.

Ejemplo 1

Suberoilánilida del ácido hidroxámico (SAHA): Administración para tratar la neurodegeneración relacionada con la poliglutamina. Una realización a modo de ejemplo para tratar la neurodegeneración relacionada con la poliglutamina de acuerdo con la práctica de los principios de esta invención comprende administrar por vía parenteral una dosificación terapéuticamente eficaz de SAHA, de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 500 μ m, en una disolución acuosa al paciente.

Ejemplo 2

Fenilbutirato de sodio: Administración para tratar la esquizofrenia. Una realización a modo de ejemplo para tratar la esquizofrenia de acuerdo con la práctica de los principios de esta invención comprende administrar por vía oral comprimidos que comprenden 500 mg de fenilbutirato de sodio en polvo tres veces al día al paciente.

Ejemplo 3

Piroxamida: Administración para tratar la enfermedad de Huntington. Una realización a modo de ejemplo para tratar la enfermedad de Huntington de acuerdo con la práctica de los principios de esta invención comprende administrar por vía parenteral una dosificación terapéuticamente eficaz de piroxamida, que oscila entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 500 μ m, en una disolución acuosa al paciente.

Ejemplo 4

Suberoilánilida del ácido hidroxámico (SAHA): Administración para tratar la neurodegeneración relacionada con la poliglutamina. Una realización a modo de ejemplo para tratar la neurodegeneración relacionada con la poliglutamina de acuerdo con la práctica de los principios de esta invención comprende administrar por vía parenteral 25 mg de SAHA por kg de peso corporal en una disolución acuosa al paciente.

Ejemplo 5

Depsipéptido: Administración para tratar la enfermedad de Huntington. Una realización a modo de ejemplo para tratar la enfermedad de Huntington de acuerdo con la práctica de los principios de esta invención comprende administrar por vía parenteral 100 mg de depsipéptido por kg de peso corporal en una disolución acuosa al paciente.

ES 2 310 213 T3

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de inhibidor de histona desacetilasa para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa relacionada con la expansión de poliglutamina.

2. El uso según lo expuesto en la reivindicación 1, en el que la enfermedad se selecciona del grupo constituido por: enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, enfermedades de ataxia espinocerebelosa, ADRPL, y enfermedad de Machado-Joseph.

10 3. El uso según lo expuesto en la reivindicación 1, en el que el inhibidor de histona desacetilasa se selecciona del grupo constituido por SAHA, butirato, piroxamida, depsipéptido, MS-275 y derivados de los mismos.

15 4. El uso según lo expuesto en la reivindicación 1, en el que el inhibidor de histona desacetilasa es un inhibidor de Sir2 o un derivado del mismo.

5. El uso según lo expuesto en la reivindicación 1, en el que el inhibidor de histona desacetilasa es una SAHA o un derivado de la misma.

20 6. El uso según lo expuesto en la reivindicación 1, en el que el inhibidor de histona desacetilasa es un fenilbutirato de sodio o un derivado del mismo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

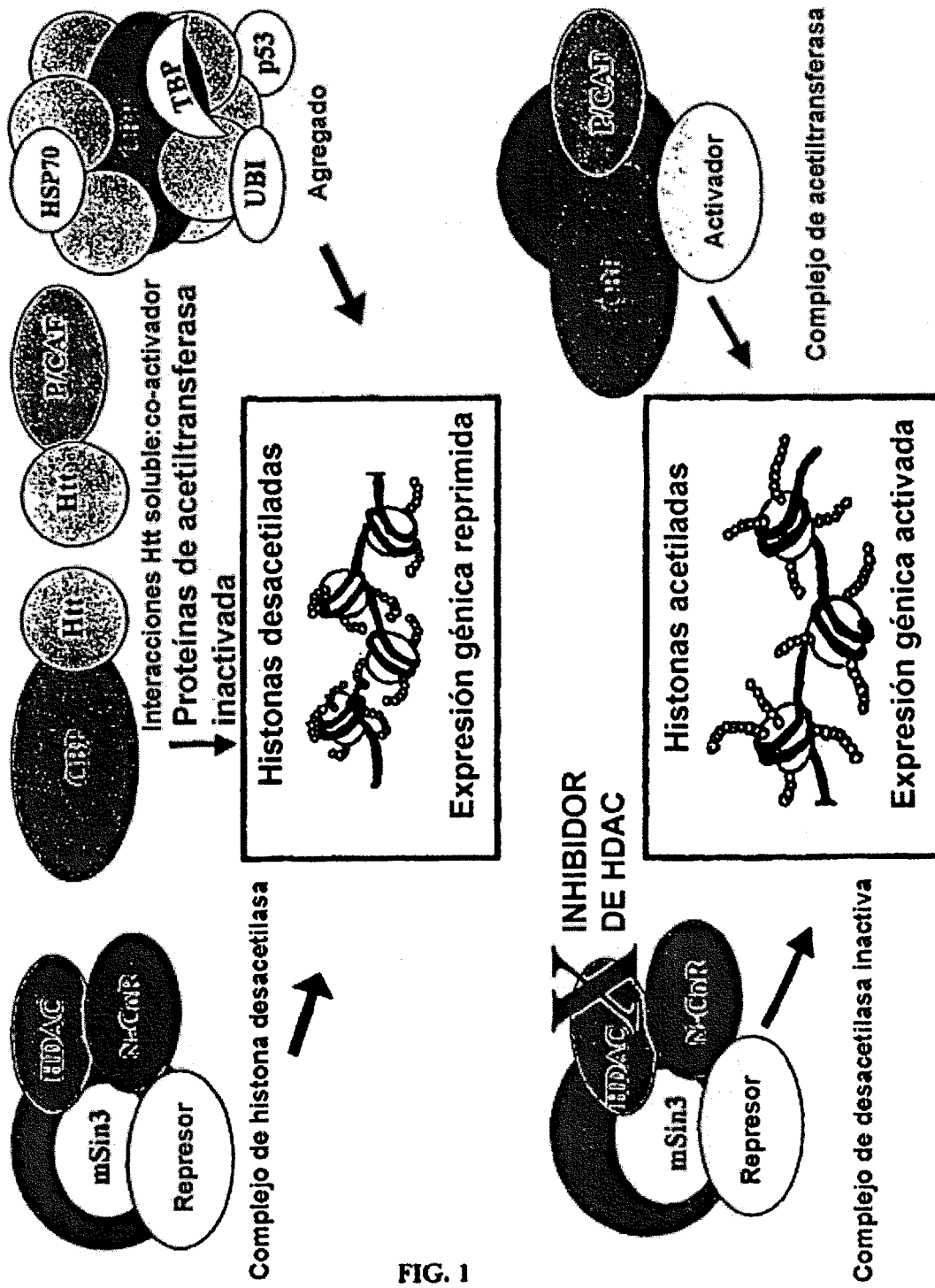


FIG. 1

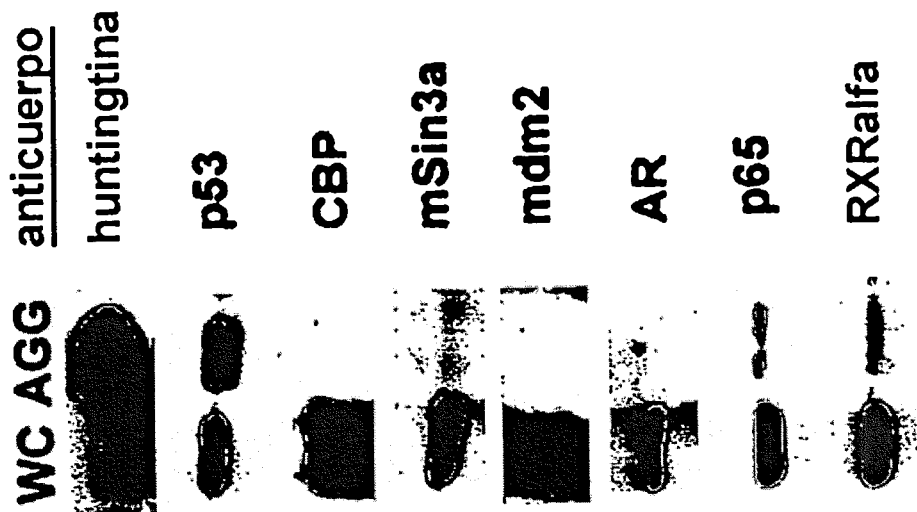


FIG. 2

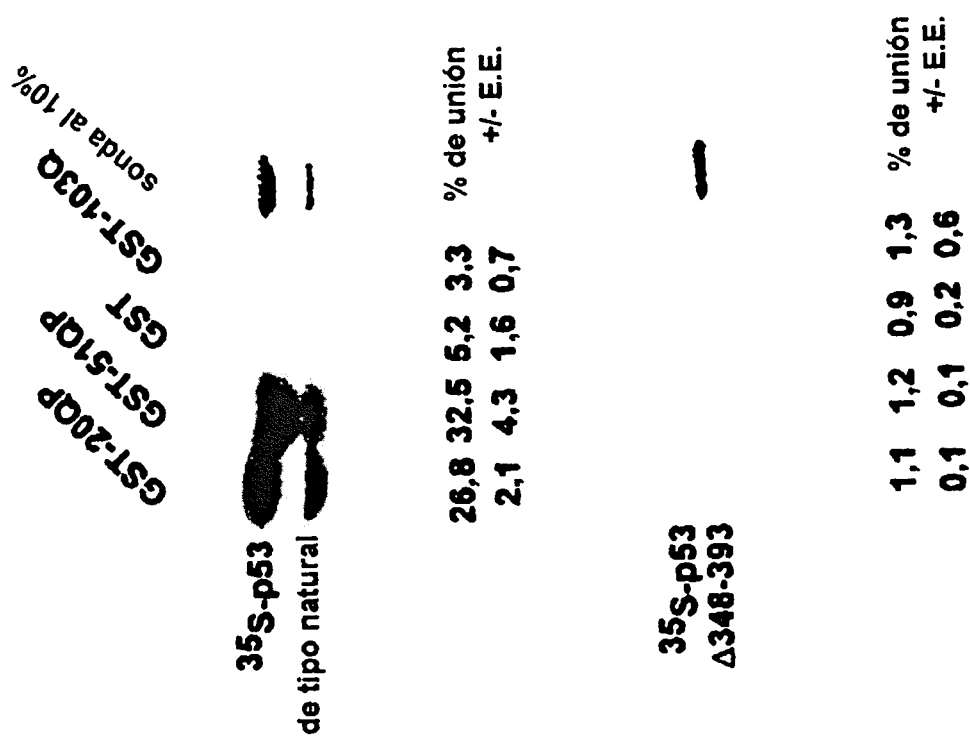


FIG. 3

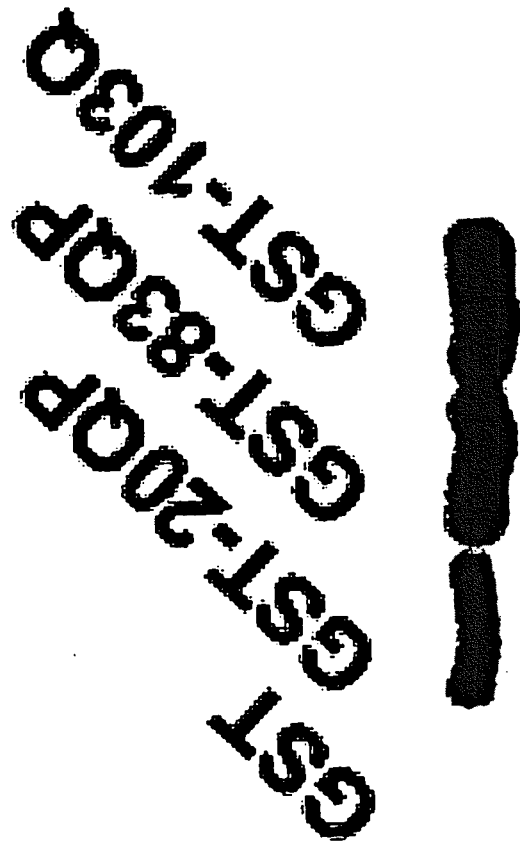


FIG. 4

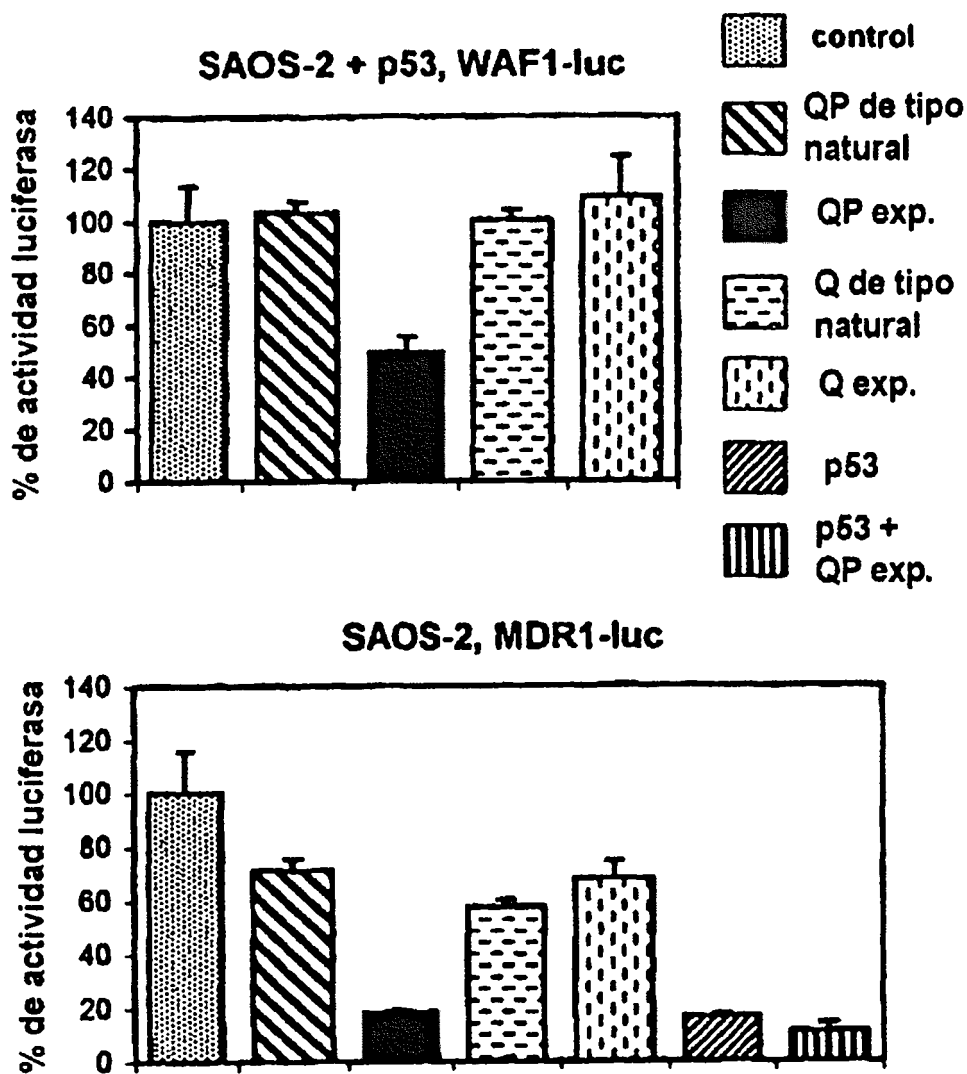


FIG. 5

La huntingtina reprime la transcripción de p21/WAF1/Cip1

Células PC12 estables + NGF

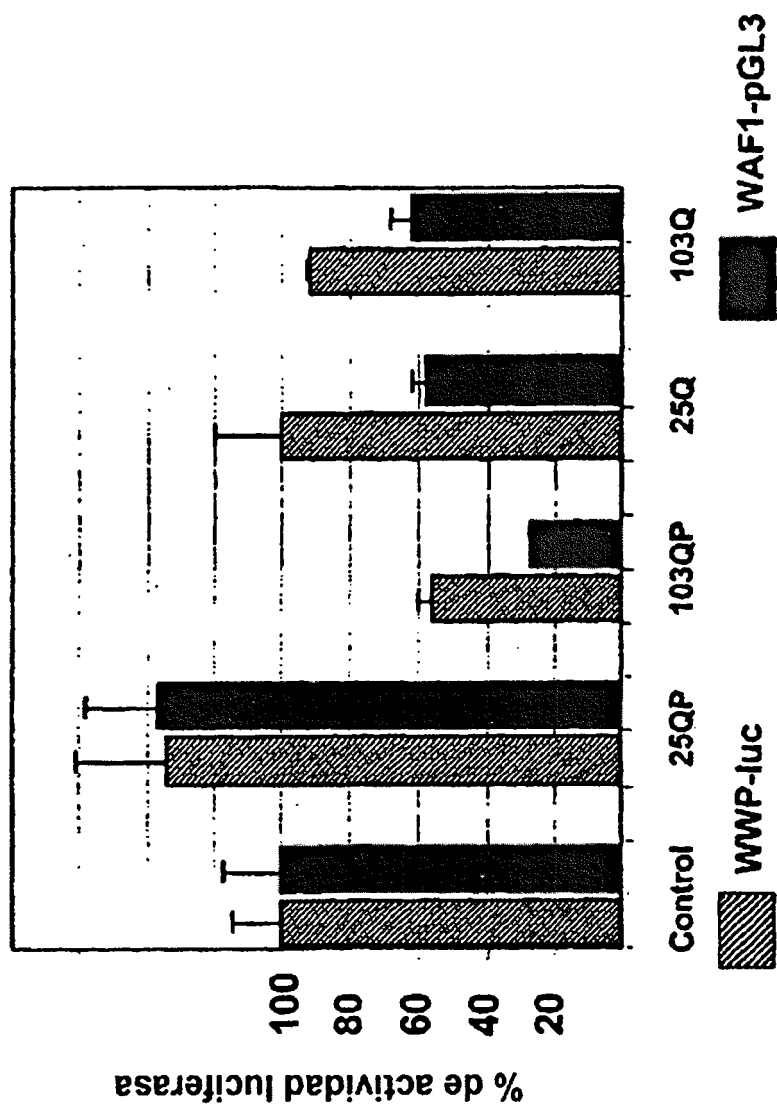


FIG. 6

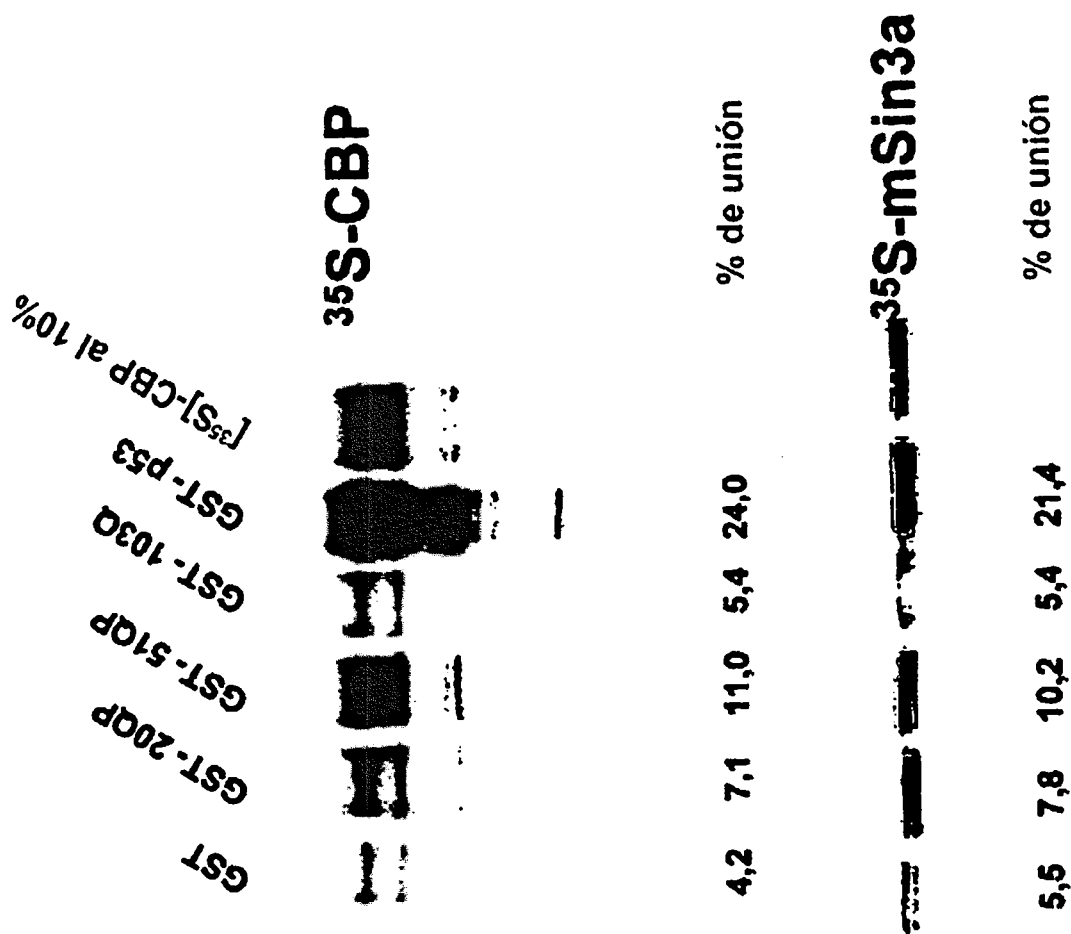


FIG. 7

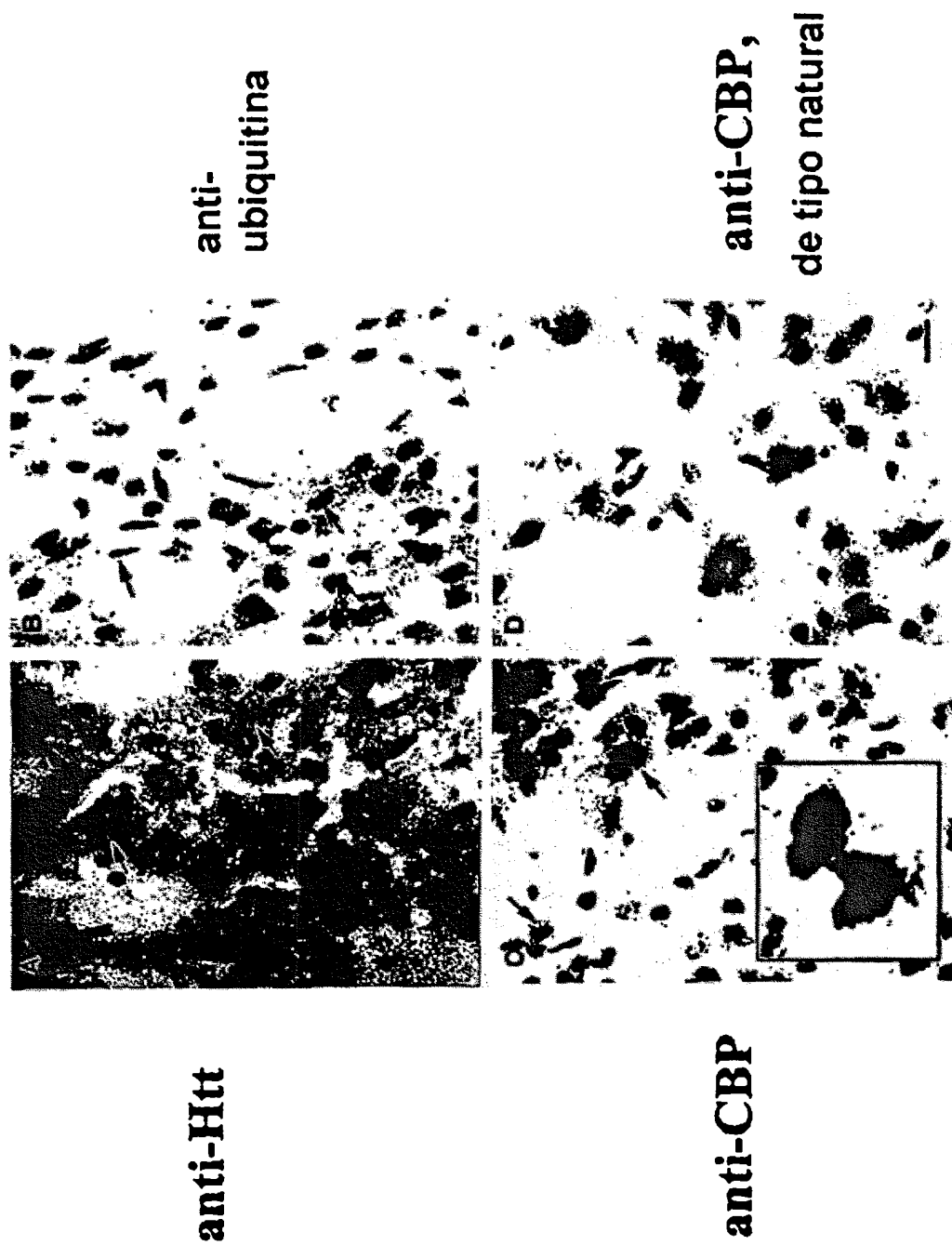


FIG. 8

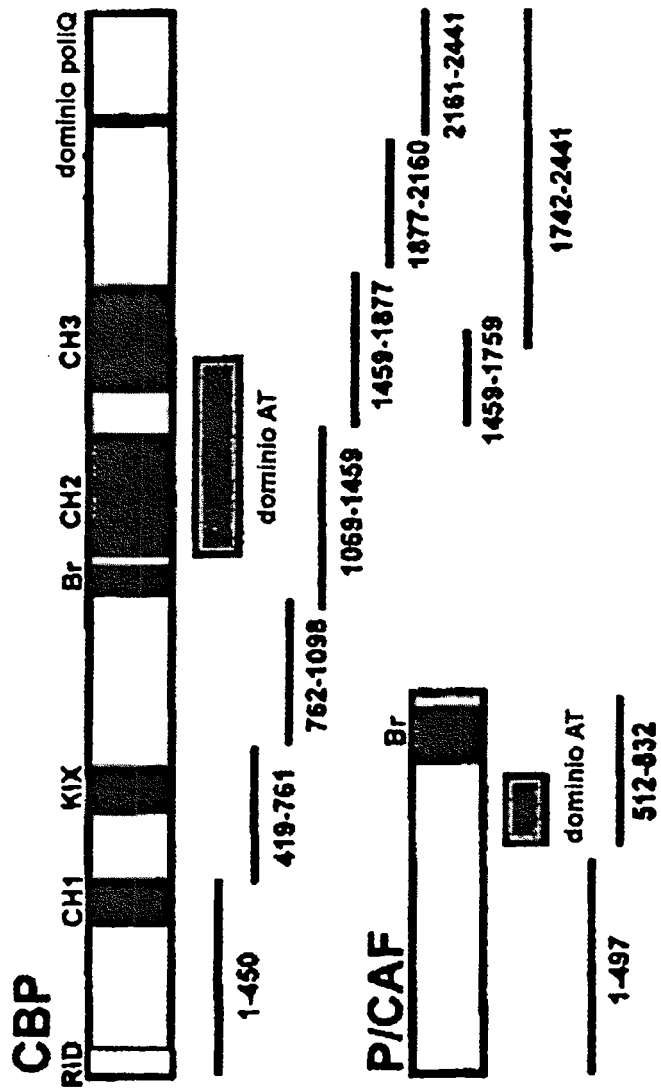


FIG. 9

Unión de ³⁵S-sondas de CBP y P/CAF a GST-51QP

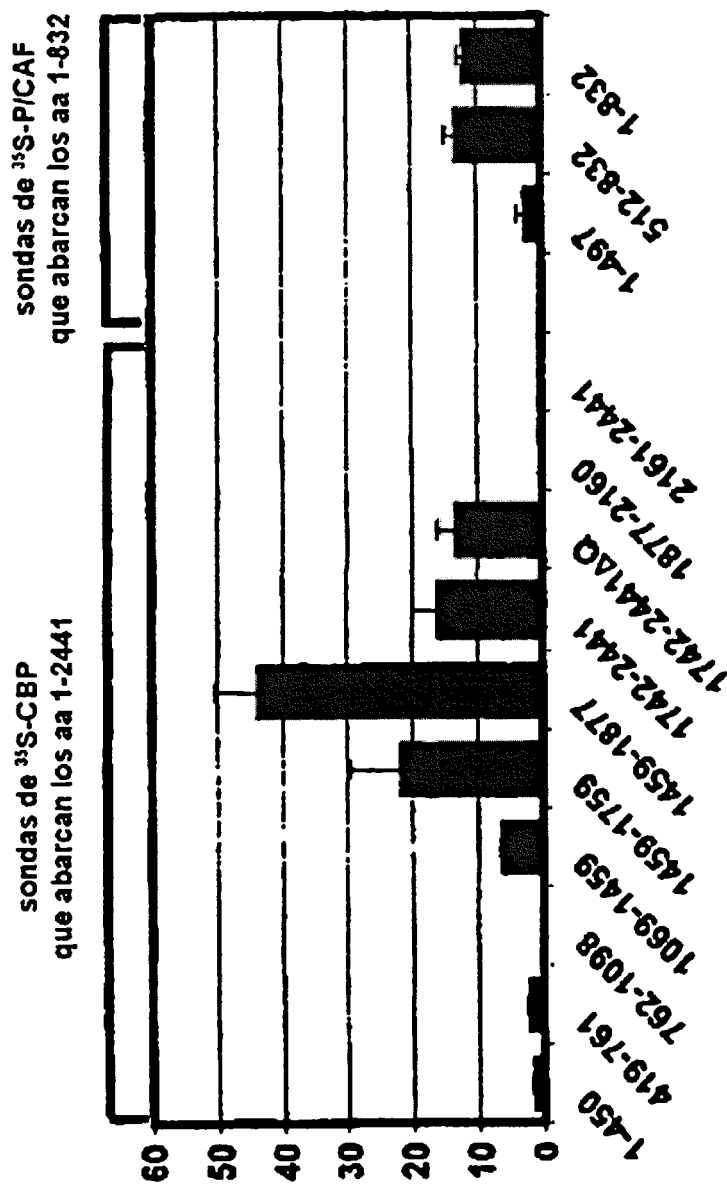


FIG. 10

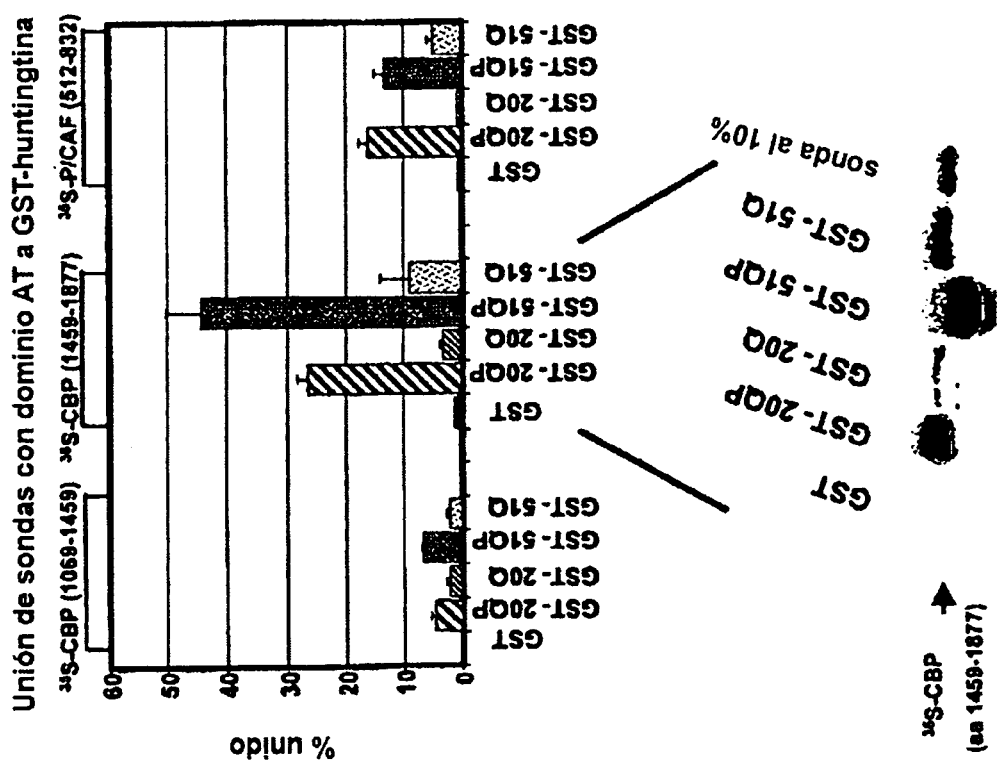


FIG. 11

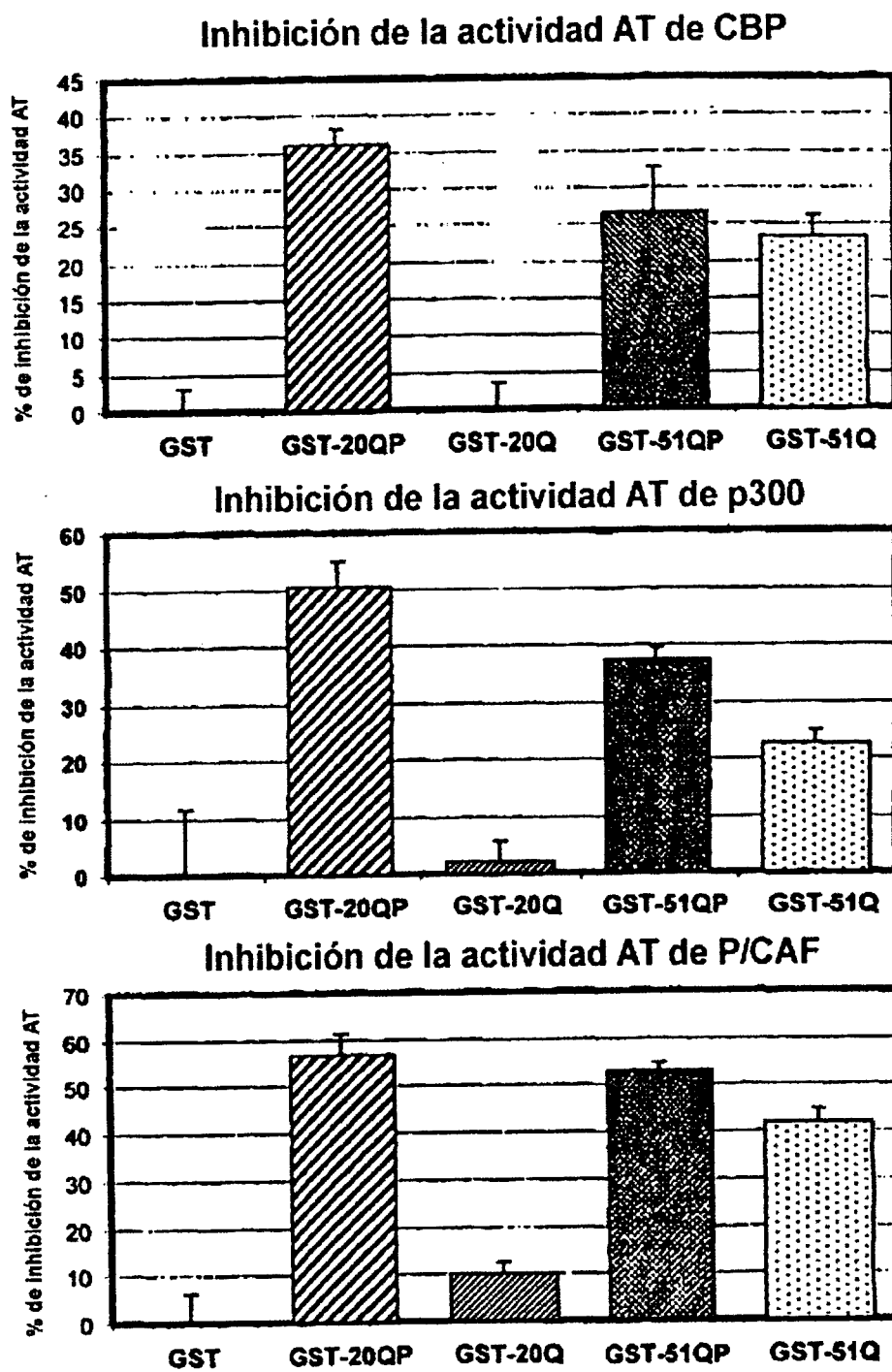


FIG. 12

La acetilación de histonas se reduce mediante la expresión de Httex1p

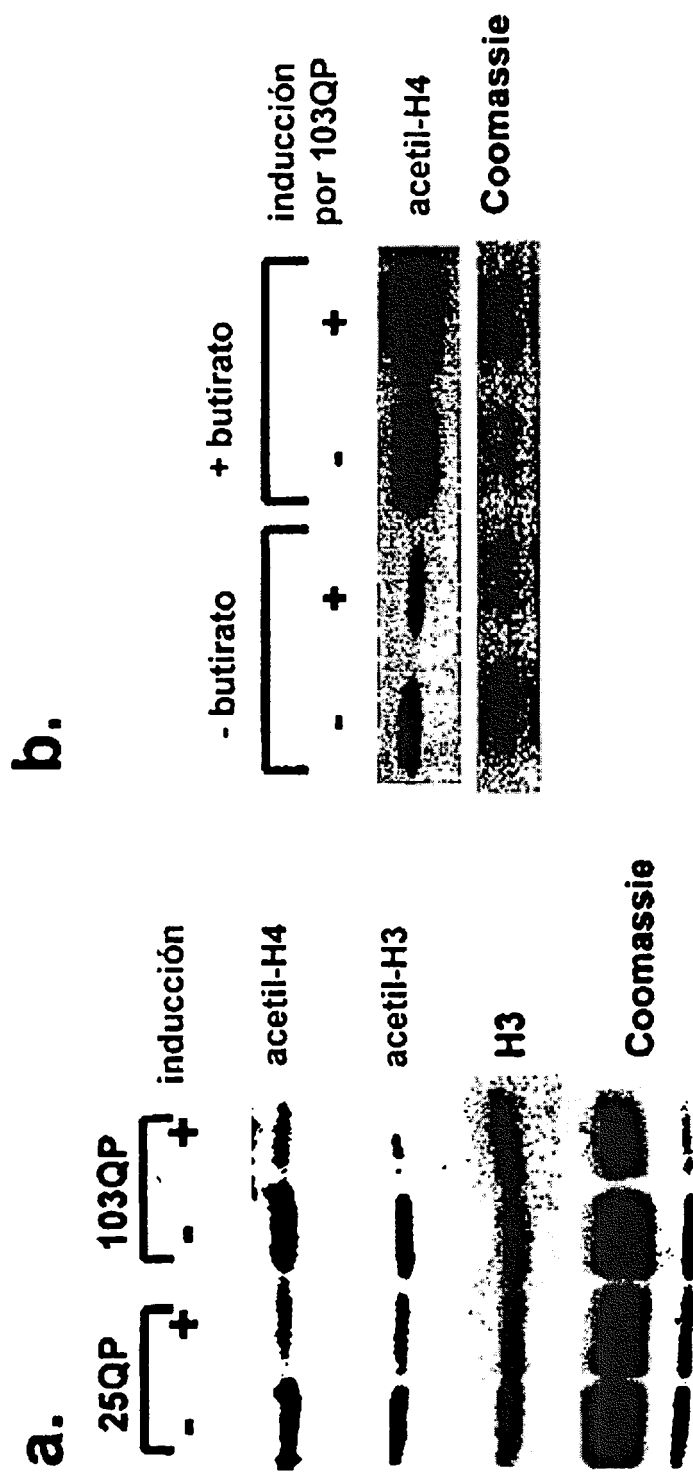


FIG. 13

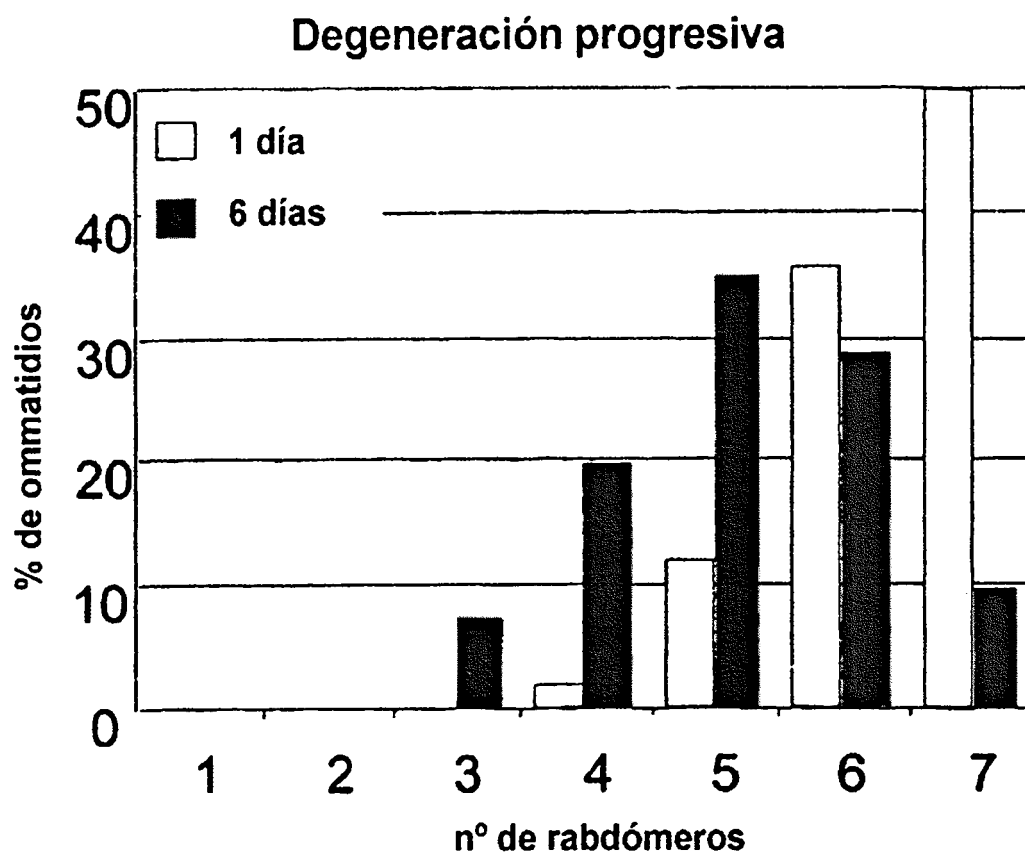


FIG. 14

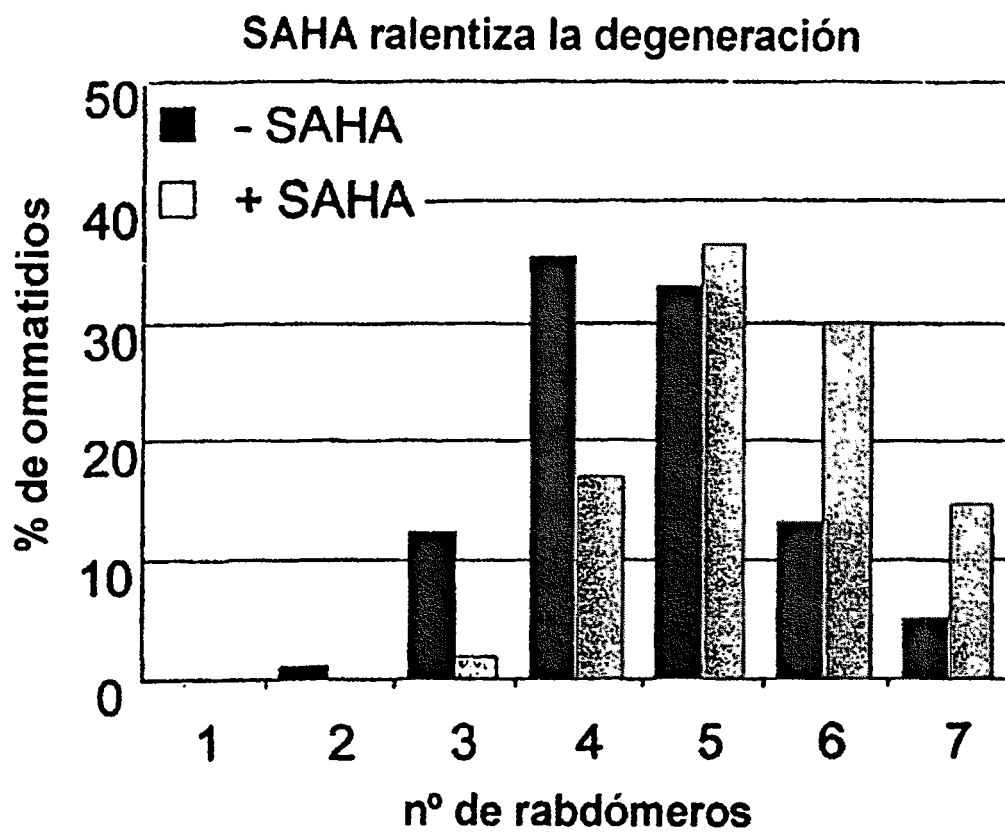


FIG. 15

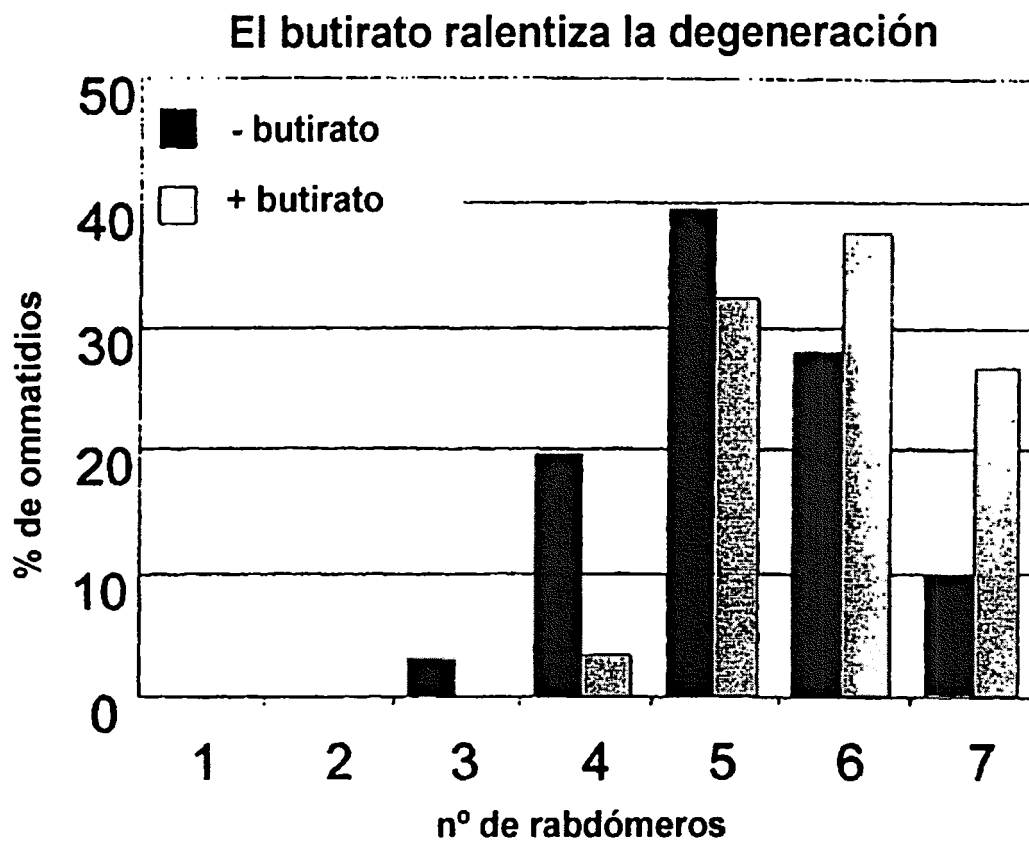


FIG. 16

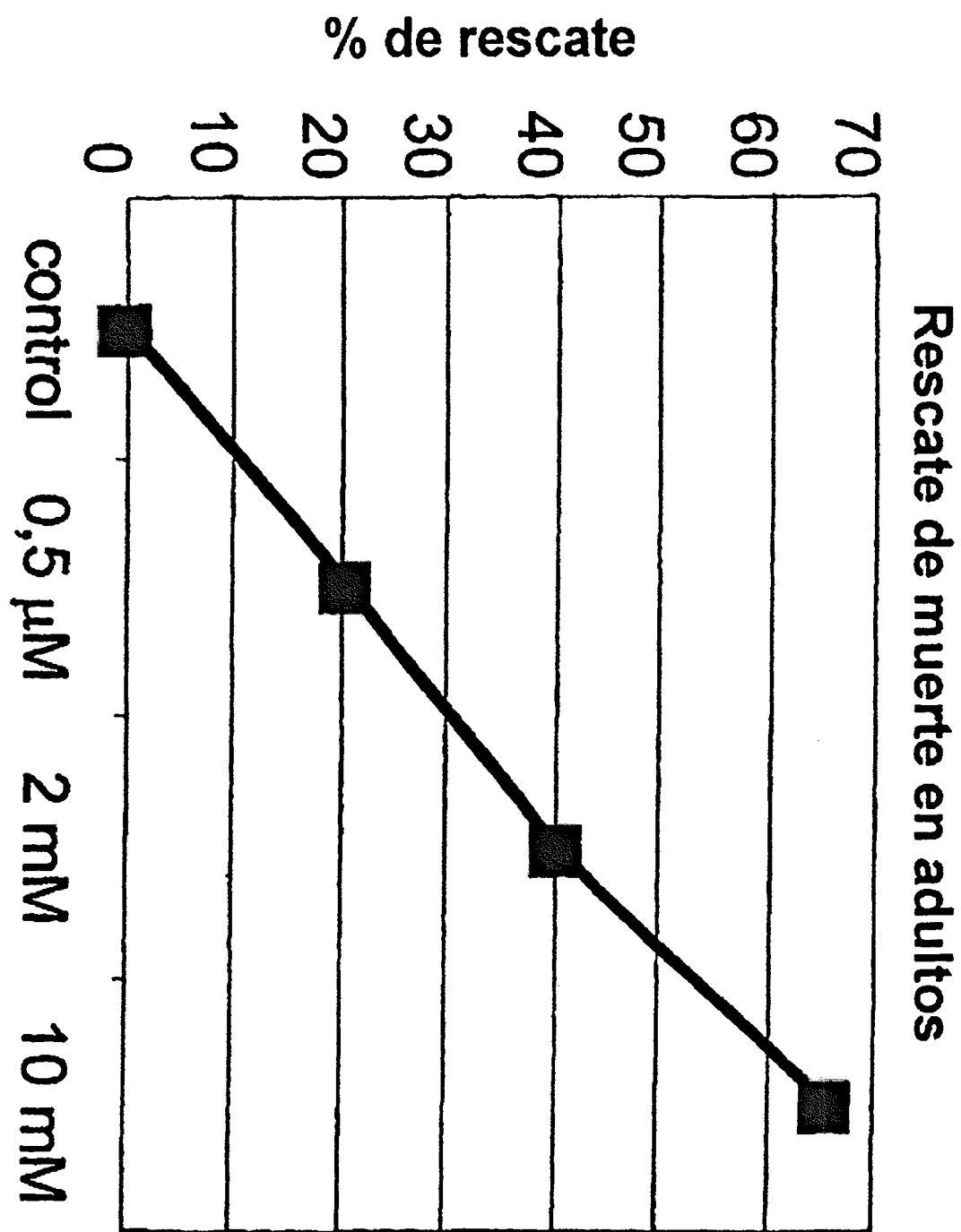


FIG. 17

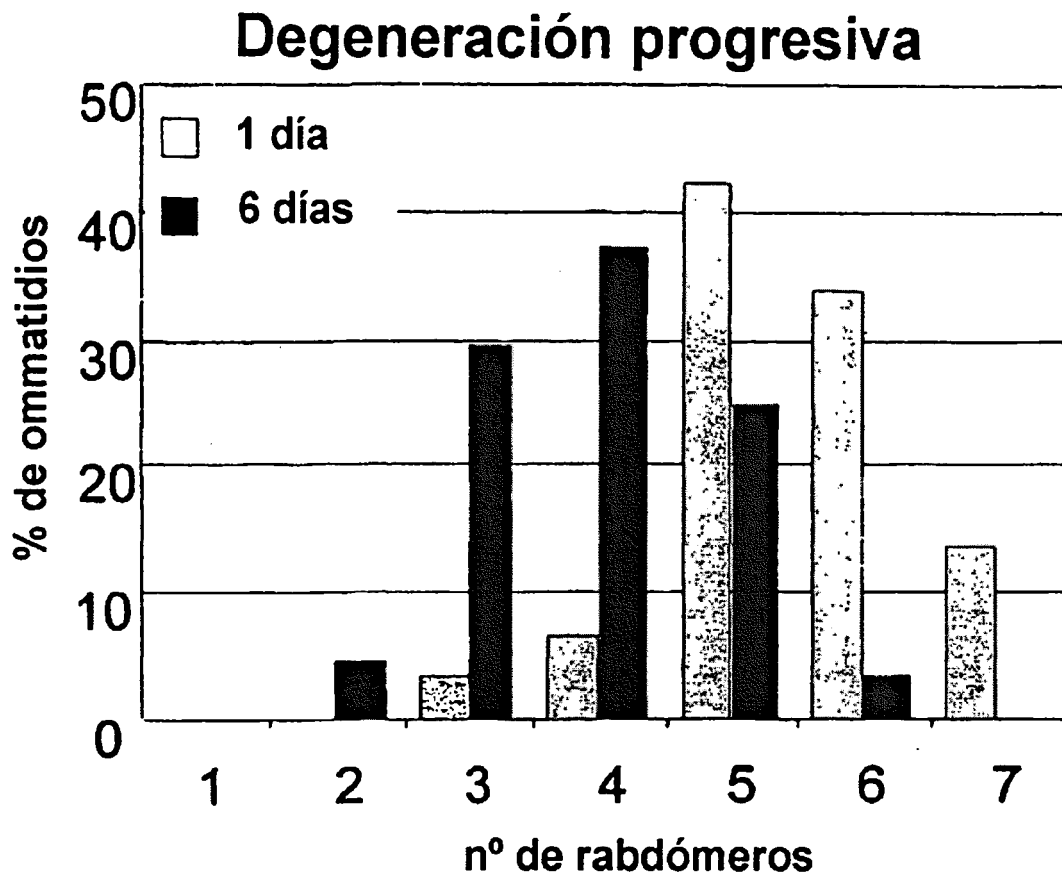


FIG. 18

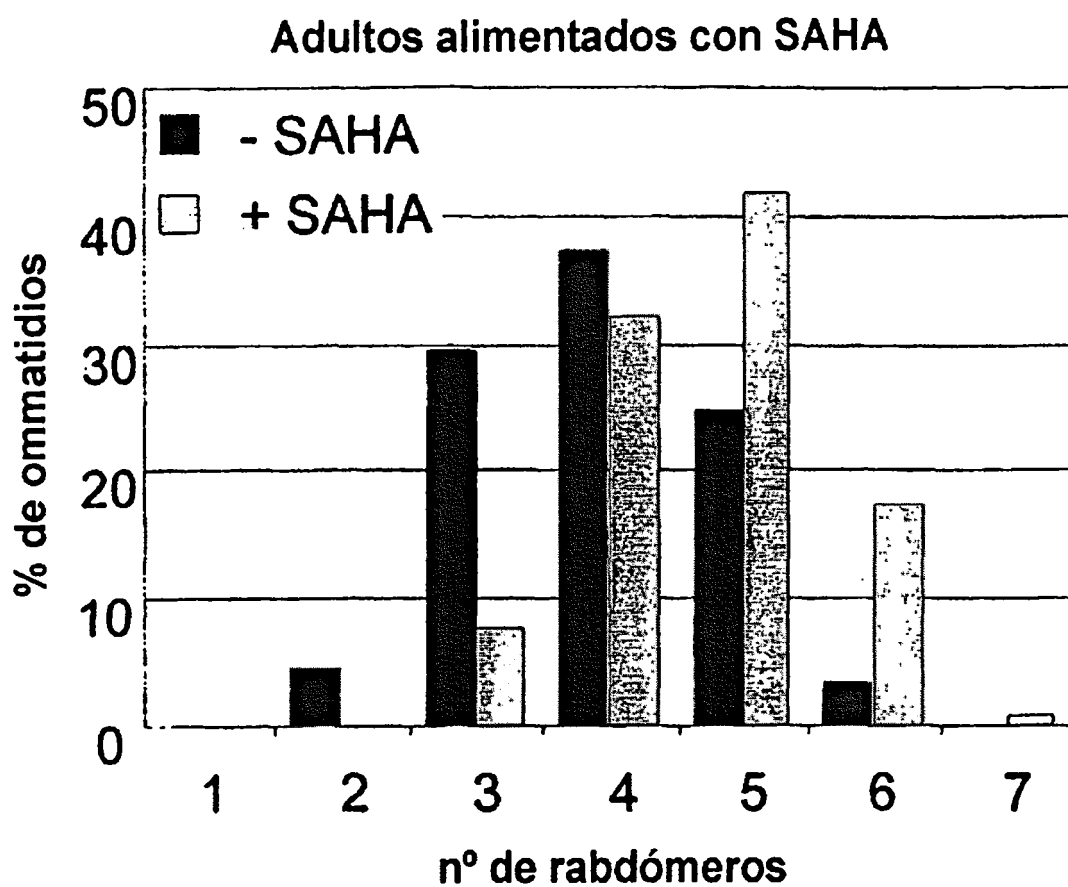


FIG. 19

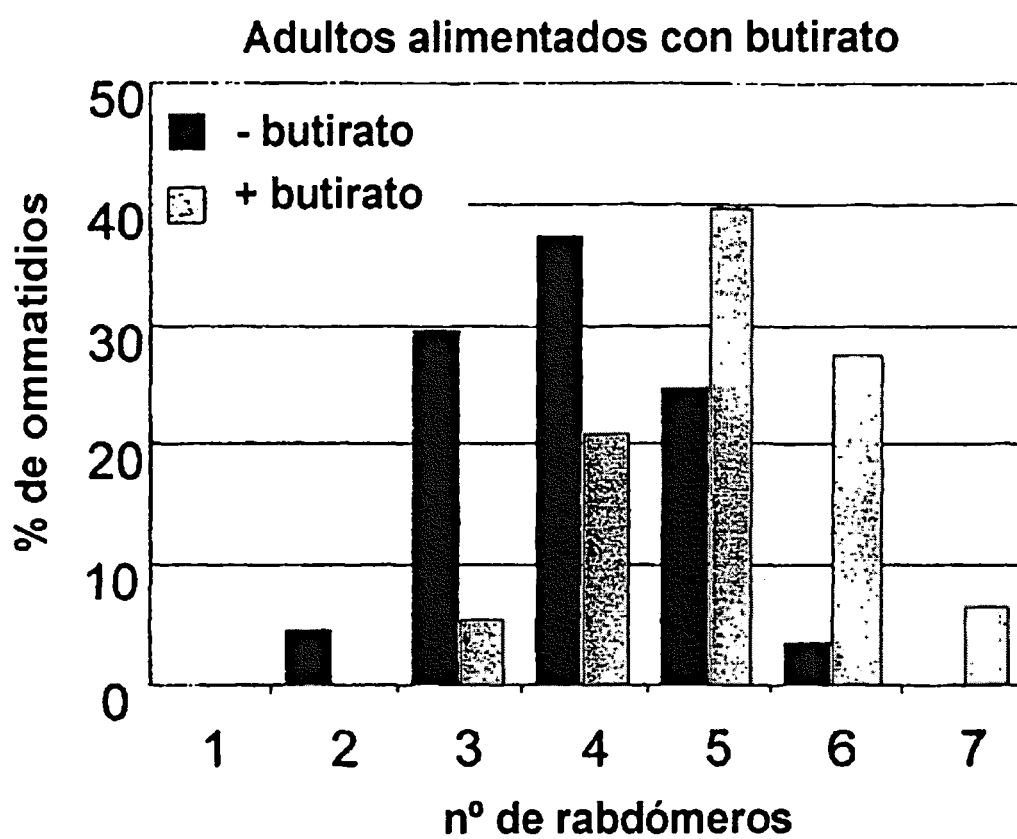


FIG. 20

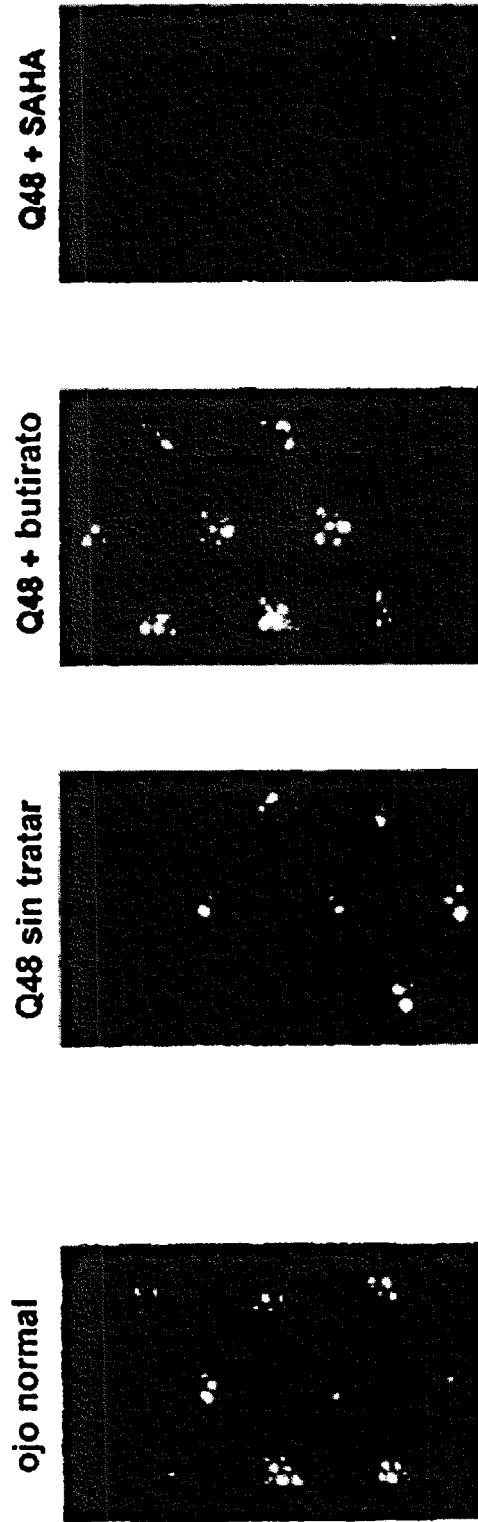


FIG. 21

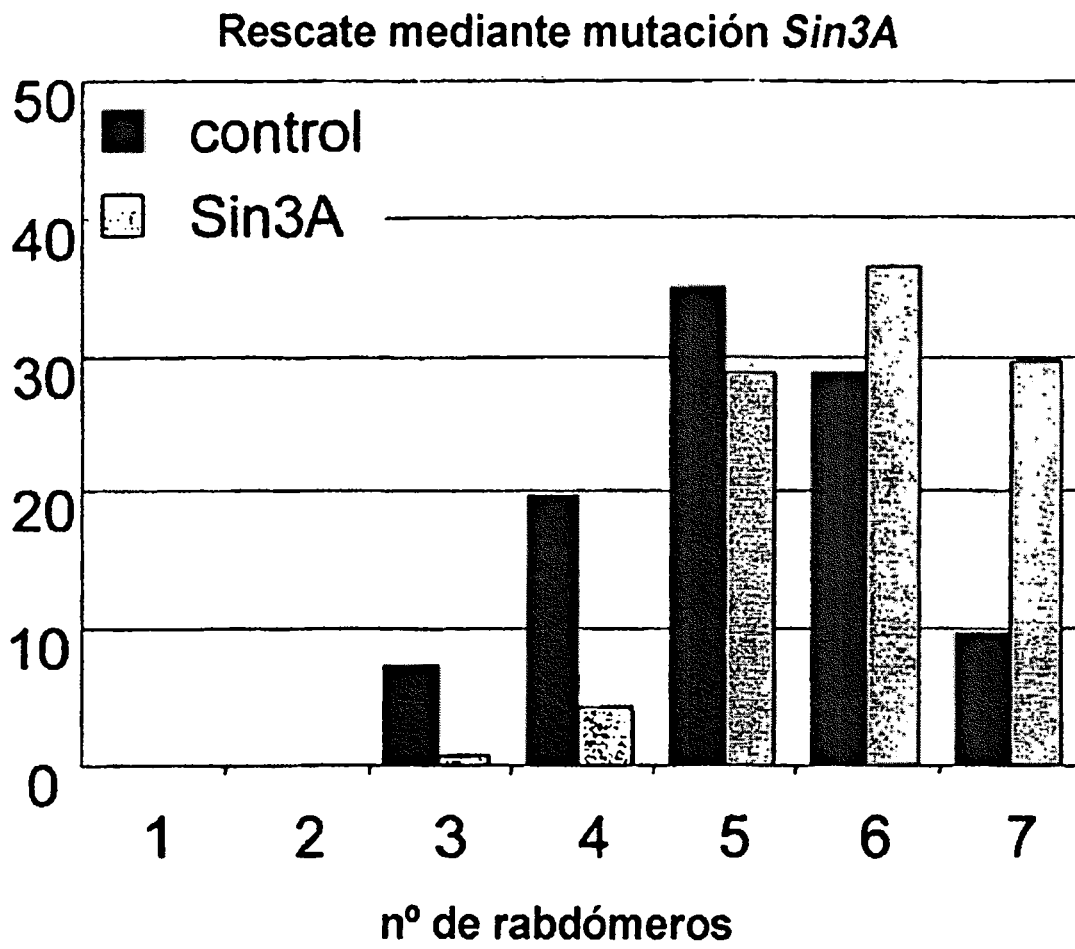


FIG. 22

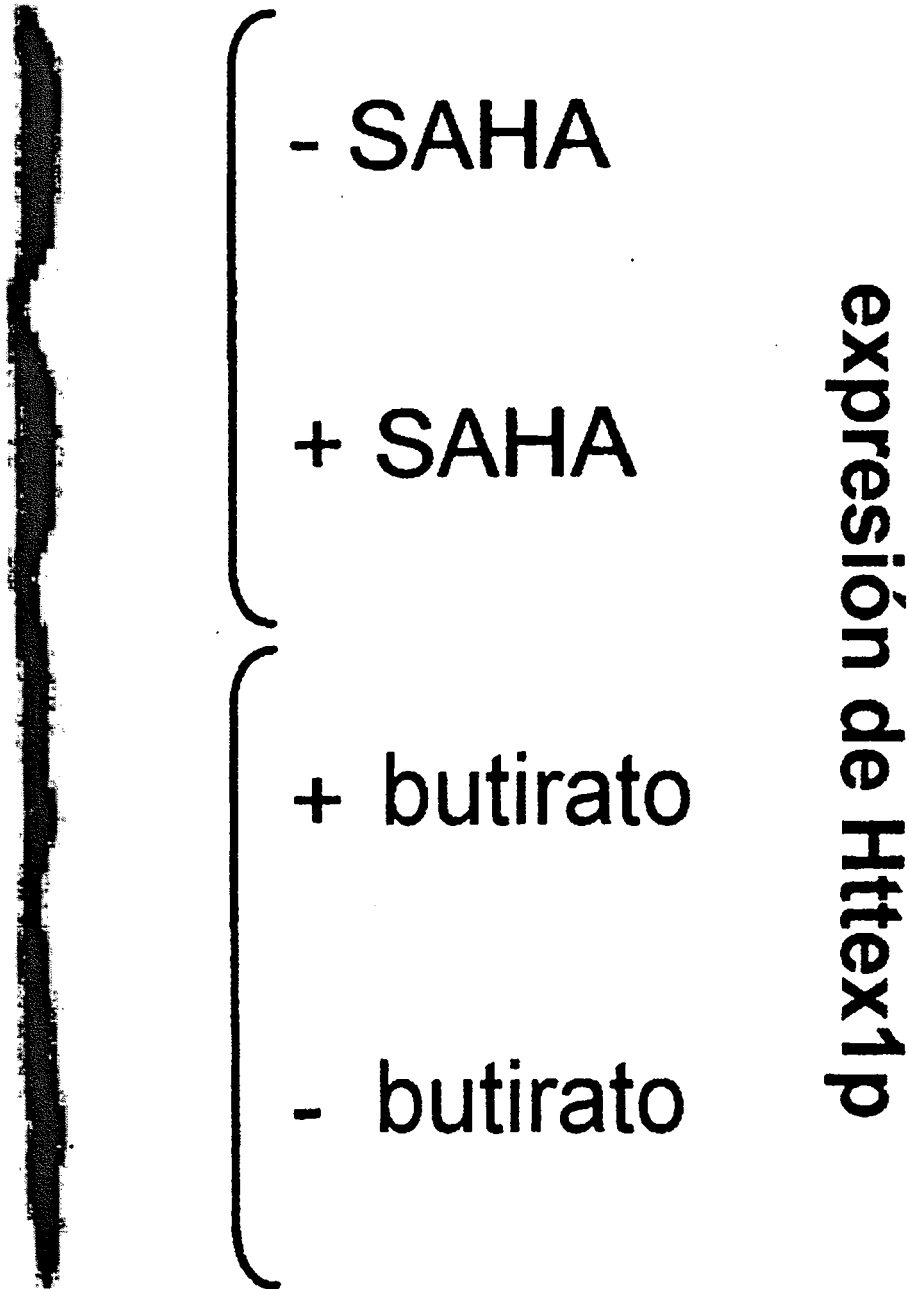


FIG. 23

FIG. 24

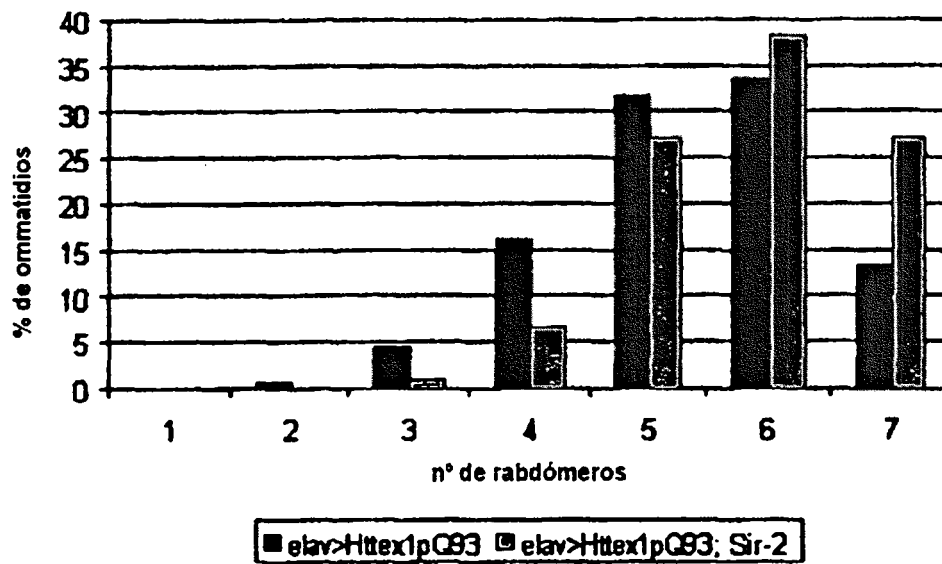


FIG. 25

