

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 130**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2016 E 21189549 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3960195**

54 Título: **Engrailed para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

23.09.2015 EP 15306482

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2025

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.00%)**

**3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE - INSERM (25.00%);**

**COLLEGE DE FRANCE (25.00%) y
SORBONNE UNIVERSITE (25.00%)**

72 Inventor/es:

PROCHIANTZ, ALAIN

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 010 130 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

Engrailed para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

- 5 La presente invención se refiere a la proteína Engrailed o a una composición que comprende la proteína Engrailed para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 El estudio de los procesos de envejecimiento es importante, en parte porque muchas enfermedades o afecciones se vuelven más prevalentes entre las personas mayores, por ejemplo, cánceres, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, glaucoma, enfermedad cardiovascular, por nombrar solo algunas, entre las cuales muchas aún carecen de procedimientos preventivos o de tratamiento efectivos. Aunque una abundante bibliografía ha contribuido a la comprensión de los procesos de envejecimiento, la comprensión
15 completa de los procesos sigue siendo un desafío importante. Dada la creciente población de personas mayores en todo el mundo y la creciente carga y coste de la atención médica asociados con la misma, los estudios de los procesos de envejecimiento que conducen al descubrimiento eficaz de agentes anti-envejecimiento para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad son cada vez más importantes.

- 20 El ADN celular se encuentra bajo constante desafío por estreses genotóxicos exógenos y endógenos (por ejemplo, estrés oxidativo, subproductos tóxicos, función mitocondrial reducida) que modifican el ADN a través de la modificación o la incorporación incorrecta de bases, lo que da lugar a daño en el ADN. El daño en el ADN es una anomalía física en la estructura del ADN, tal como roturas de cadena simple y doble. El daño en el ADN puede ser reconocido por enzimas específicas y, de este modo, puede repararse correctamente a través de la respuesta al
25 daño en el ADN (DDR, *DNA Damage Response*). La pérdida de esta capacidad natural de reparación del ADN da como resultado una inestabilidad genética que puede conducir a una disfunción celular y la muerte celular. Se ha demostrado, además, que la remodelación de la cromatina y las vías de DDR están interconectadas, ya que el daño en el ADN induce cambios en la cromatina, que son necesarios por sí mismos para dar acceso a la maquinaria de reparación del ADN (Soria et al., 2012, *Mol Cell* 46, 722-734).

- 30 La acumulación de daño en el ADN se ha relacionado con el proceso de envejecimiento y con la aparición de enfermedades relacionadas con la edad, que incluyen trastornos neurodegenerativos, tales como ataxias, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de Huntington y Parkinson (Canugovi et al., 2013, 12, 578-587; Madabhushi et al., 2014, *Neuron* 83, 266-282). Se han probado algunos compuestos antioxidantes o fármacos neuroprotectores, tales como factores de crecimiento, para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (Zarei et al., 2015, *Surgical Neurology International*, 6: 1, 171).

- 40 Además, en trastornos neurodegenerativos, tales como la isquemia y la enfermedad de Alzheimer, las neuronas manifiestan una actividad aberrante del ciclo celular, expresando marcadores del ciclo celular, tales como la ciclina A, y experimentan un grado limitado de remodelación del ADN. Este comportamiento es notable teniendo en cuenta que en los seres humanos las neuronas se diferencian terminalmente durante el desarrollo y permanecen quiescentes durante décadas antes de la aparición de estos eventos. Si bien los mecanismos subyacentes son poco conocidos, múltiples líneas de evidencia sugieren que estas actividades desempeñan un papel temprano y contribuyente en la muerte neuronal (Andorfer et al., 2005, *J. Neurosci.*, 1.25, 5446-54).

- 45 Se ha demostrado, además, que dicho daño en el ADN y la reentrada en el ciclo celular pueden constituir una vía común en la apoptosis en enfermedades neurológicas (Kim y Tsai, 2009, *Ann NY ACAD Sci.*, 1170, 674-9 o Pizarro et al., 2009, *Free Radic. Res.*, 43, 985-994).

- 50 Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos que promuevan la reparación del ADN, que sean capaces de prevenir y/o tratar el daño en el ADN y/o los trastornos relacionados con el envejecimiento celular y/o regular el ciclo celular.

- 55 Las homeoproteínas, o proteínas homeodominio, son factores de transcripción que desempeñan un papel importante en los procesos de migración y diferenciación celular implicados en la morfogénesis. Se caracterizan por la presencia de una secuencia de 60 aminoácidos, el homeodominio, que es un dominio de unión al ADN con una estructura de hélice/giro/hélice. Se ha demostrado que el dominio aislado de la proteína Antennapedia de *Drosophila* atraviesa la membrana de las neuronas en cultivo, se acumula en el núcleo y promueve el crecimiento de las neuritas (Patente EP0485578). El homeodominio está altamente conservado y confiere la propiedad de
60 internalización a una gran cantidad de homeoproteínas (Spatazza et al., 2013, *Pharmacol. Rev.* 65, 90-104).

- Las proteínas Engrailed (Engrailed-1 y Engrailed-2) son homeoproteínas con actividad biológica similar que se designan colectivamente en lo sucesivo con el término general Engrailed (EN para el ser humano o En1/2 para ratones). En neonatos y adultos, Engrailed se expresa en células granulares cerebelosas y en núcleos dopaminérgicos (DA) mesencefálicos, incluyendo la sustancia negra pars compacta (SNpc que se degenera en la enfermedad de Parkinson) y el Área Tegmental Ventral (VTA, *Ventral Tegmental Area*). En1/2 desempeña papeles

importantes en el desarrollo del mesencéfalo y, en el mesencéfalo, de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (mDA) (Joyner, 1996, Trends Genet 12, 15-20). En1/2 también desempeña funciones redundantes en la supervivencia de las neuronas mDA adultas que se localizan en la SNpc y el VTA en la parte ventral del mesencéfalo (Alberi et al., 2004, Development 131, 3229-3236), y, por lo tanto, se propuso para prevenir o tratar la pérdida de neuronas DA en la enfermedad de Parkinson. En la Patente WO 2013/128239 se informó que la administración local de En1/2 mediante infusión en el mesencéfalo aumenta la síntesis de DA por las neuronas DA y la actividad motora asociada. Prochiantz et al. (2011, FEBS Letters, 278, 52 (Resumen, Brunet et al., Nature 438: 94-98, 2005 y Álvarez-Fisher et al., Nature Neurosci 14: 1260-1266, 2011) han informado que Engrailed no es solo un factor de transcripción, sino también un regulador de la traducción que aumenta la traducción de los ARNm mitocondriales transcritos en el núcleo y se ha demostrado que la transducción de Engrailed regula positivamente la traducción de Ndufs1 y Ndufs3, dos proteínas del complejo mitocondrial I y aumenta la síntesis de ATP (véase también Álvarez-Fischer et al., 2011, Nature Neuroscience, 14, 1260-1266, Stettler *et al.* 2012). De manera alternativa, en la Patente WO 2007/099227 se demostró que la administración sistémica de En1/2 a ratones induce un aumento en el recambio de DA en el cuerpo estriado, reflejado por un aumento en la producción del metabolito de DA ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) sin modificación de los niveles de dopamina.

Otx2 (homólogo 2 de ortodéntico) es otra homeoproteína que contiene un homeodominio de tipo bicoide (Simeone et al., 1993, EMBO J 12, 2735-2747). Pertenece a la familia de proteínas Otx, que desempeña papeles fundamentales durante la embriogénesis cerebral (Acampora *et al.*, 1995; Simeone *et al.*, 2002). También se ha demostrado que Otx2 está implicada en la formación de la retina y en la supervivencia y fisiología de las células ganglionares de la retina adultas (Bernard *et al.*, 2013; Torero Ibad *et al.*, 2011). Por lo tanto, se propuso utilizar homeoproteínas de la familia bicoide, en particular de la familia Otx, tal como Otx2, para mejorar la supervivencia de neuronas ganglionares de la retina adultas (RGC, *retinal ganglionic neurons*) en cultivo *in vitro*, y también para prevenir o tratar, *in vivo*, la degeneración de las RGC (Patente WO 2009/106767).

Los inventores de la presente invención han demostrado ahora que las homeoproteínas son capaces de proteger a las células del daño en el ADN y de la remodelación de la cromatina, de disminuir el número de roturas de cadenas de ADN, de restaurar todas las marcas de heterocromatina nuclear y nucleolar, de regular el ciclo celular y de proteger a las células contra la excitotoxicidad similar al envejecimiento, incluida la apoptosis. En particular, demostraron que Engrailed, cuando se administra en la región SNpc, es capaz de reparar los daños que conducen a la muerte celular provocada por un fuerte estrés oxidativo. En particular, activan las vías antiapoptóticas y promueven la supervivencia a largo plazo restaurando las marcas de heterocromatina, incluida la integridad del nucléolo, y aboliendo las roturas de doble cadena en un modelo de estrés oxidativo agudo. Estos resultados permiten proponer la utilización de Engrailed en patologías en las que se produce daño en el ADN.

Según la presente invención, el término "daño en el ADN" cubre de manera colectiva daño en el ADN, roturas de cadenas de ADN (de cadena simple y doble) y alteración de la heterocromatina nuclear y nucleolar.

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 8.

La presente invención se refiere a la proteína Engrailed para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis lateral amiotrófica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende la proteína Engrailed para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis lateral amiotrófica.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización, tal como se ha definido anteriormente, en la que la proteína Engrailed se administra por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, por infusión, subcutánea, enteral, rectal, intranasal, por inhalación, bucal, sublingual, intramuscular, transdérmica, intradérmica, tópica, intraocular, vaginal, rectal o por inyección intracraneal, o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización, tal como se ha definido anteriormente, en la que la proteína Engrailed se administra una vez.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización, tal como se ha definido anteriormente, en la que la proteína Engrailed se administra directamente en la región de la sustancia negra pars compacta.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización, tal como se ha definido anteriormente, en la que dicha composición comprende otro fármaco farmacéutico seleccionado entre el grupo de factor de crecimiento, azúcar complejo y sirtuina.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización, tal como se ha definido anteriormente, en la que dicho azúcar complejo es ácido polisialílico.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición para su utilización, tal como se ha definido

anteriormente, en la que la proteína Engrailed protege a las células del daño en el ADN y/o la remodelación de la cromatina.

La presente divulgación se refiere, aunque no reivindica, a la utilización de, como mínimo, una homeoproteína, o derivados peptídicos de la misma, para el tratamiento o la prevención de daño en el ADN y/o el envejecimiento celular. La divulgación se refiere, además, aunque no reivindica, a la utilización de, como mínimo, una homeoproteína, o derivados peptídicos de la misma, para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con el daño en el ADN y/o el envejecimiento celular, y más particularmente, para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con el daño en el ADN y enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

La presente divulgación se refiere, aunque no reivindica, a la utilización de un vector recombinante que codifica dichas proteínas o péptidos para el tratamiento o prevención de daño en el ADN y/o envejecimiento celular y para el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con el daño en el ADN y/o el envejecimiento celular, y más particularmente, para la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con el daño en el ADN y enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “homeoproteína” y “proteínas de homeodominio” son sinónimos y se refieren a productos génicos, proteínas y polipéptidos conocidos habitualmente bajo estas denominaciones en la técnica. Los términos abarcan dichos productos génicos, proteínas y polipéptidos de cualquier organismo donde se encuentren, y particularmente, de animales, de manera preferente, vertebrados, de manera más preferente, mamíferos, incluyendo mamíferos no humanos, e incluso de manera más preferente, de seres humanos. Más particularmente, “homeoproteína” se refiere a una proteína que comprende un homeodominio. Las homeoproteínas incluyen homeoproteínas naturales y homeoproteínas recombinantes u homeoproteínas sintéticas.

La presente invención abarca la proteína Engrailed nativa, incluyendo las variantes alélicas de la misma. La proteína Engrailed para su utilización, según la presente invención, comprende el homeodominio de longitud completa.

Las variantes adecuadas de la proteína Engrailed para su utilización en la presente invención son biológicamente activas y conservan, como mínimo, una de las actividades descritas en el presente documento en relación con la homeoproteína nativa correspondiente. De manera preferente, se conserva el efecto sobre el daño en el ADN y/o la alteración de la cromatina, aunque una función determinada de la proteína Engrailed nativa puede verse afectada positiva o negativamente en cierto grado, por ejemplo, con variantes que muestran una actividad biológica reducida.

La proteína Engrailed para su utilización, según la presente invención, puede prepararse mediante las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, en particular mediante la expresión de un ADN recombinante en un sistema celular adecuado (eucariota o procariota) o mediante síntesis en fase sólida o líquida. De manera más específica, la proteína Engrailed se produce habitualmente a partir de un polinucleótido de ADN que comprende una secuencia codificante de la proteína, obtenida mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia, incluyendo la amplificación de una secuencia nucleica mediante PCR o RT-PCR, el cribado de bibliotecas de ADN genómico mediante hibridación con una sonda homóloga, o bien, mediante síntesis química total o parcial. Los vectores recombinantes se construyen e introducen en células huésped mediante técnicas convencionales de ADN recombinante y manipulación genética, que son conocidas en la materia. El polinucleótido de ADN se clona en un vector de expresión eucariota o procariota y la proteína producida en las células modificadas con el vector recombinante se purifica mediante cualquier medio adecuado, en particular mediante cromatografía de afinidad. El péptido se sintetiza habitualmente en fase sólida, según la técnica Fmoc, descrita originalmente por Merrifield et al. (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-2154) y se purifica mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

Según una realización más preferente, los términos designan proteínas y polipéptidos que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos (homeodominio) RRRKRTA-YTRYQLLE-LEKEFLF-NRYLTRRRRIELAHSL-NLTERHIKWFQN-RRMK-WKKEN [los sitios de inserción típicos se indican con guiones] (SEQ ID NO: 1) (véase <http://homeobox.biosci.ki.se/>).

Entre los ejemplos de homeoproteínas que se pueden utilizar se incluyen todas las homeoproteínas expresadas en diferentes subconjuntos de neuronas adultas, tales como: proteínas Engrailed (Engrailed-1 o Engrailed-2), y, no reivindicadas, sino sólo para fines ilustrativos, homeoproteínas de la familia bicoide, en particular la subfamilia Otx como Otx2, proteínas de la familia pareada (Pax), la familia Lhx, por ejemplo, Lhx9, y Gbx2.

Las secuencias de genes de homeoproteína y las secuencias de aminoácidos deducidas son bien conocidas en la técnica y están disponibles en las bases de datos de secuencias.

La proteína o el polipéptido En1/2 de ejemplo incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido En1/2 de ratón que tiene una secuencia de aminoácidos primaria (SEQ ID NO: 2):
musEn1: NP_034263 (401 aa)

MEEQQPEPKSQRDSSGLGAVAAAAPSGLSLSLSPGASGSSGSDGDSVPVSPQPAPPSPPPAAPCLPPLAHH
PHLPPHPPPPPPPPPPPPPPQHLLAAPAHQPOPAQAQLHRTTNFFIDNLRPDFGCKKEQPLPQLLVASAAAGG
GAAAGGGSRVERDRGQTGAGRDPVHSLGTRASGAASLLCAPDANCGPPDGSQPATAVGAGASKAGNP
AAAAAAAAAAAAAAAAVAAAAAAAAASKPSDSGGGSGGNAGSPGAQGAQKFEHNPAILLMGSANGGPVVK
TDSQQPLVWPAWVYCTRYSDRPSGPRTRKLLKKKXNEKEDKRPRTAFTAELQLQLKAEFQANRYITEQR
RQTLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIKKATGIKNGLALHLMAQGLYNHSTTTVQDKDESE

5 La proteína o el polipéptido Gbx2 de ejemplo incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido Gbx2 de ratón que tiene una secuencia de aminoácidos primaria (SEQ ID NO: 3), no reivindicada:
musGbx2: NP_034392 (la variante más larga, 348 aa)

MSAAFPPSLMMMQRPLGSSTAFSIDSIGSPPQPSPGHFVYTGYPMFMPYRPVVLPPPPPPPPALPQAA
LQPALPPAHPHHQIPSLPTGFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSASPOHQEAAAARKFAPOPLPGGGNF
DKAEALQADAEDGKAFLAKEGSLAFSAEAVOASLVGAVRGQGKDESKVEDDPKGKEESFSLESVDYS
SDDNLPGQTAHKEEDPGHALEETPQSGGAAGSTTSTGKNRRRRRTAFTSEQLLELEKEFHCKKYLSLTERSQ
IAHALKLESEVQVKIWFQNRRAKWKRKAGNANSKTGEPSSRNPKIVVPIPVHVSRAIRSQHQLEQARP

10 La proteína o el polipéptido Lhx9 de ejemplo incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido Lhx9 de ratón que tiene una secuencia de aminoácidos primaria (SEQ ID NO: 4), no reivindicada:
musLhx9: NP_001036042 (la variante más larga, 397 aa)

MEIVGCRAENNSCFRPPAMLFHGISGGHIQGIMEEMERRSKTEARLTGKGTQLNGRDAGMPPLSPEKPA
LCAGCGGKISDRYLLAVDKQWHLRCLKCECKLALESELTCAFADGSIYCKEDYRFRFSVQRCARCHLGIS
ASEMVMRARDSVYHLSCFTCSTCNKTLTTGDHFGMKDSLVCRAHFETLLQGEYPPQLSYTELAAKSGGL
ALPYFNGTGTVQKGRPRKRK5PALGVDIVNYN5GCNENEADHLDROQQPYPPSQKTKRMRTSFKHHQL
RTMKSYFAINHNPDAKDLK

15 La proteína o el polipéptido En1 de ejemplo incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido EN1 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria, tal como está anotada en el número de acceso de Genbank AAA 53502.2 o NCBI NP_001417.3.

20 La proteína o el polipéptido En2 de ejemplo incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido EN2 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria, tal como está anotada en el número de acceso de Genbank AAA 53504.2 o NCBI NP_001418.2.

25 La proteína o el polipéptido Gbx2 de ejemplo, no reivindicado, incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido Gbx2 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria, tal como está anotada en el número de acceso de Genbank EAW71084.1.

30 La proteína o el polipéptido Lhx9 de ejemplo, no reivindicado, incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido Lhx9 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria, tal como está anotada en el número de acceso de Genbank NP_001014434.1 o NP_064589.2.

Según la presente invención, la homeoproteína es la proteína Engrailed (Engrailed-1 o Engrailed-2). Según otra realización preferente de la presente invención, dicha homeoproteína es una homeoproteína de un vertebrado.

35 La homeoproteína para su utilización, según la presente invención, es capaz de proteger a las células *in vivo* del daño en el ADN, en particular roturas de cadenas de ADN, en particular roturas de doble cadena de ADN (DSB, *double strand breaks*), formación y remodelación de la cromatina, en particular relajación de la cromatina, especialmente aquellas que son inducidas por factores de estrés o envejecimiento. Los factores de estrés se refieren, en particular, al estrés oxidativo o exocototóxico.

40 El efecto de la homeoproteína hacia el daño en el ADN no está restringido a las neuronas o a un tipo particular de neurona (por ejemplo, neuronas DA mesencefálicas o RGC) y, por lo tanto, puede aplicarse a otro tipo de células, tales como, por ejemplo, neuronas motoras, fibroblastos y células epiteliales.

45 Los siguientes ejemplos no son según la presente invención y se presentan sólo con fines ilustrativos.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “trastornos relacionados con daños en el ADN” incluye trastornos y enfermedades neurodegenerativas, tales como cáncer, envejecimiento y otros trastornos causados por daño en el ADN debido a la exposición al estrés oxidativo, carcinógenos, toxinas, radicales libres, tales como radicales de oxígeno o radiación que daña el ADN, tal como radiación ionizante y radiación UV. Aunque no se requiere una comprensión del mecanismo para la práctica de la presente invención, se cree que la administración de homeoproteína, según la presente invención, previene el daño en el ADN, inhibe los efectos del daño en el ADN, reduce el número de roturas de cadenas de ADN y/o estimula una respuesta de reparación celular al daño en el ADN.

10 El daño en el ADN puede tomar la forma de disfunción cromosómica, tal como roturas de la cadena de ADN, o modificación química del ADN (por ejemplo, alquilación). Según una realización preferente, el daño en el ADN significa roturas de la cadena de ADN, incluyendo roturas de cadena simple y doble, de manera preferente, roturas de cadena doble.

15 Según la presente invención reivindicada, la expresión “trastornos relacionados con daño en el ADN” se refiere a la esclerosis lateral amiotrófica. Sin embargo, la característica patológica importante es el daño en el ADN. Por lo tanto, la supresión o limitación del daño en el ADN y/o la disminución de la cantidad de roturas de cadenas de ADN proporciona un procedimiento para disminuir la muerte de células neuronales y/o tratar/prevenir trastornos neurológicos asociados a daños en el ADN.

20 El siguiente aspecto no es según la presente invención y se presenta sólo con fines ilustrativos.

25 En otro aspecto, la descripción ilustra un procedimiento para tratar un trastorno relacionado con el daño en el ADN en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que lo necesita una composición que comprende, como mínimo, una homeoproteína, o derivados peptídicos de la misma, o un vector recombinante que codifica dicha proteína, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, un “vehículo aceptable farmacéuticamente” pretende incluir todos y cada uno de los portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

35 La composición de la presente invención está adecuadamente tamponada para que sea apropiada para uso humano a un pH fisiológico o ligeramente básico (por ejemplo, de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 9). Entre los tampones adecuados se incluyen, sin limitación, tampón de fosfato (por ejemplo, PBS), tampón de bicarbonato, tampones HEPES y PIPES y/o tampón Tris. La composición de la presente invención puede comprender, además, un diluyente apropiado para uso humano o animal. De manera preferente, es isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una fuerza iónica relativamente baja. Entre los ejemplos representativos se incluyen agua estéril, solución salina fisiológica (por ejemplo, cloruro de sodio), solución de Ringer, soluciones de glucosa, trehalosa o sacarosa, solución de Hank y otras soluciones salinas acuosas equilibradas fisiológicamente (véase, por ejemplo, la edición más actual de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins). Los vehículos aceptables farmacéuticamente incluidos en la composición de la presente invención también deben permitir la conservación de su estabilidad en las condiciones de fabricación y almacenamiento a largo plazo (es decir, como mínimo, un mes, con preferencia durante, como mínimo, un año) a temperaturas de congelación (por ejemplo, -70 °C, -20 °C), refrigerada (por ejemplo, 4 °C) o ambiente. Se pueden utilizar excipientes aceptables farmacéuticamente adicionales para proporcionar propiedades deseables, que incluyen, por ejemplo, modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución de la formulación, modificar o mantener la liberación o absorción en un organismo humano o animal, promover el transporte a través de la barrera sanguínea o la penetración en un órgano particular (por ejemplo, el cerebro).

50 Una composición que comprende la proteína Engrailed descrita en el presente documento puede formularse para una liberación sostenida o lenta (también denominada liberación temporizada o liberación controlada). Dichas composiciones pueden prepararse, en general, utilizando tecnología bien conocida y administrarse, por ejemplo, mediante implantación oral, rectal, intradérmica, intranasal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio diana deseado. Las formulaciones de liberación sostenida pueden contener el compuesto disperso en una matriz portadora y/o contenido dentro de un depósito rodeado por una membrana que controla la velocidad.

60 La composición puede comprender ventajosamente, como mínimo, otro fármaco farmacéutico, tal como, por ejemplo: factor de crecimiento, azúcar complejo (glicosaminoglicanos, ácido polisiálico), sirtuina o activadores de sirtuina, anticolinesterasa o inhibidores de la transcriptasa inversa, en particular inhibidores de la transcriptasa nucleosídica.

65 Tal como lo entiende una persona experta en la técnica médica, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren a la gestión médica de una enfermedad, trastorno o afección de un individuo (es decir, paciente). En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan la homeoproteína en una cantidad suficiente para proporcionar

un beneficio terapéutico y/o profiláctico. El beneficio terapéutico para los individuos a quienes se administra la homeoproteína descrita en el presente documento incluye, por ejemplo, un resultado clínico mejorado, en el que el objetivo es prevenir o retardar o ralentizar un cambio fisiológico no deseado asociado con la enfermedad, o prevenir o retardar o ralentizar la expansión o gravedad de dicha enfermedad. Tal como se analiza en el presente documento, la eficacia de una o más homeoproteínas puede incluir resultados clínicos beneficiosos o deseados que comprenden, pero sin limitarse a los mismos, reducción, disminución o alivio de los síntomas que resultan de la enfermedad a tratar o están asociados con la misma; disminución de la aparición de síntomas; calidad de vida mejorada; estado libre de enfermedad más prolongado (es decir, disminución de la probabilidad o la propensión de que un individuo presente síntomas sobre la base de los cuales se realiza un diagnóstico de una enfermedad); reducción de la extensión de la enfermedad; estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la enfermedad; retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad; mejora o paliación del estado de la enfermedad; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable; y/o supervivencia general. La eficacia de la homeoproteína descrita en el presente documento también puede significar prolongar la supervivencia celular, más particularmente de las neuronas, en comparación con la supervivencia celular esperada si un sujeto no recibiera la homeoproteína según la presente invención.

Entre los individuos que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad o el trastorno, así como individuos propensos a padecer o a estar en riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno, y aquellos en los que la enfermedad, afección o trastorno se va a tratar de forma profiláctica. Un individuo puede tener predisposición a desarrollar una enfermedad o trastorno que se beneficiaría del procedimiento de la presente invención o puede tener una edad determinada en la que recibir el procedimiento de la presente invención proporcionaría un beneficio clínico que retrasaría el desarrollo o reduciría la gravedad de una enfermedad, incluyendo una enfermedad o trastorno relacionado con daño en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad.

La dosis de homeoproteína, según la presente invención, para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con daño en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad puede depender de la condición del individuo, es decir, la etapa de la enfermedad, la gravedad de los síntomas causados por la enfermedad, el estado de salud general, así como la edad, el sexo y el peso, y otros factores evidentes para un experto en la técnica médica. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar según lo determinen los expertos en la técnica médica. Además de los factores descritos en el presente documento y anteriormente relacionados con la utilización de la homeoproteína para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con daño en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, la duración y frecuencia adecuadas de administración de la homeoproteína también pueden determinarse o ajustarse mediante factores, tales como la condición del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del principio activo y el procedimiento de administración. Las dosis óptimas de la homeoproteína, en general, pueden determinarse utilizando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima puede depender de la masa corporal, el peso o el volumen sanguíneo del individuo. Habitualmente es preferente la utilización de la dosis mínima que sea suficiente para proporcionar una terapia eficaz. El diseño y la ejecución de estudios preclínicos y clínicos para una homeoproteína (incluido el tiempo de administración para el beneficio profiláctico) descritos en el presente documento están dentro de la capacidad de un experto en la técnica pertinente. Cuando se administran dos o más homeoproteínas, la dosis óptima de cada homeoproteína puede ser diferente, tal como menor, que cuando se administra cualquier agente solo como terapia de agente único. Habitualmente, dicha homeoproteína puede utilizarse en concentraciones que varían de 0,001 a 100 μM , o, de manera más preferente, de 0,005 a 100 μM , de manera ventajosa, de 0,005 a 10 μM , y, de manera particularmente ventajosa, de 0,001 a 0,10 μM . Una cantidad de homeoproteína que se puede administrar por día puede ser, por ejemplo, entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg (por ejemplo, entre 0,1 y 1 mg/kg, entre 1 y 10 mg/kg, entre 10 y 50 mg/kg, entre 50 y 100 mg/kg de peso corporal). En otras realizaciones, la cantidad de una homeoproteína que se puede administrar por día es entre 0,01 mg/kg y 1.000 mg/kg, entre 100 y 500 mg/kg o entre 500 y 1.000 mg/kg de peso corporal. Para la inyección intracerebral, la homeoproteína se puede administrar a una dosis comprendida entre 10 pmol y 100 pmol, por ejemplo, a 25 pmol, especialmente para Engrailed, tal como se describe en Rekaik et al., (2015, Cell Reports).

La dosis óptima (por día o por ciclo de tratamiento) puede ser diferente para la enfermedad o trastorno relacionado con el daño en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad que se va a tratar y también puede variar con la vía de administración y/o el régimen terapéutico.

La composición farmacéutica está formulada para su administración mediante diversas vías, entre las que se incluyen, pero sin limitarse a las mismas, oral, parenteral y local. Los portadores aceptables farmacéuticamente son los que se utilizan de manera convencional.

Una composición farmacéutica puede administrarse a un individuo que la necesite mediante cualquiera de diversas vías conocidas por un experto en la materia. A modo de ejemplo no limitativo, la composición puede administrarse por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, mediante infusión (por ejemplo, una infusión en bolo), subcutánea, enteral, rectal, intranasal, mediante inhalación, bucal, sublingual, intramuscular, transdérmica, intradérmica, tópica, intraocular, vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal, o cualquier combinación de las mismas. En determinadas realizaciones particulares, la administración de una dosis, tal como se ha descrito anteriormente, se realiza por vía intravenosa, intraperitoneal, directamente en el tejido u órgano diana, o por vía subcutánea. En

determinadas realizaciones, un procedimiento de administración incluye stents recubiertos o permeados con fármaco para los que el fármaco es la homeoproteína o el ácido nucleico que lo codifica.

5 Para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, la homeoproteína puede administrarse de manera local, en particular mediante inyección o infusión en el área cerebral diana. También puede administrarse utilizando un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo, una minibomba osmótica conectada a una cánula implantada en el cerebro.

10 Según una realización preferente de la presente invención, la homeoproteína se administra directamente en la región SNpc. En una realización particularmente preferente, se administra una única inyección de Engrailed a un individuo que lo necesite.

Además, la administración de la homeoproteína puede combinarse con una terapia no farmacológica.

15 Además de las disposiciones anteriores, la descripción también ilustra otras disposiciones, que surgirán a partir de la descripción, con referencia a las figuras en las que:

Figura 1. Expresión alterada de daño en el ADN y marcas de heterocromatina en ratones *En1 +/-*

- 20 (A) Los genes expresados diferencialmente en las neuronas TH+ en la SNpc de *En1 +/-* que pertenecen a los grupos de daño en el ADN, remodelación de la cromatina y apoptosis se clasifican por valores p.
 (B) Las neuronas TH+ en la SNpc de ratones wt muestran un anillo único de tinción para γ -H2AX; las neuronas TH+ de *En1 +/-* muestran focos de γ -H2AX adicionales dispersos en el núcleo. Barra de escala, 10 μ m.
 (C) El porcentaje de neuronas TH+ con > 2 focos de γ -H2AX en la SNpc aumenta del 2 % en ratones wt al 16 % en ratones *En1 +/-* de 8 semanas de vida (n = 3; prueba t de Student). La tinción para γ -H2AX en neuronas TH+ en el VTA de ratones *En1 +/-* y wt es similar. Se contaron entre 110 y 162 neuronas en cada condición.
 (D) La tinción perinucleolar y perinuclear para H3K27me3 está disminuida en las neuronas mDA en la SNpc de *En1 +/-*. Barra de escala, 10 μ m.
 (E) La tinción perinucleolar para H3K27me3 se cuantifica midiendo la intensidad de fluorescencia (izquierda) a lo largo de las líneas de puntos. El porcentaje de células con tinción densa disminuye (derecha) en ratones *En1 +/-* (n = 3; prueba t de Student; se contaron 129 y 159 neuronas en ratones wt y *En1 +/-*, respectivamente).
 (F) La tinción perinuclear para H3K27me3 en las neuronas TH+ de *En1 +/-* se reduce, tal como lo demuestra la disminución de las intensidades de fluorescencia de la lámina nuclear/nucleoplasma (n = 3; prueba t de Student; se contaron 30 y 30 neuronas en condiciones simuladas y con 6-OHDA).
 (G) Cuantificación de la superficie de las regiones densas de DAPI. La distribución de frecuencias indica un desplazamiento hacia áreas más pequeñas densas de DAPI en ratones *En1 +/-* (n = 162-211; prueba de Kolmogorov-Smirnov; se analizaron 3 ratones wt y *En1 +/-*). Véase también la **figura S1** y la **tabla S1**.

40 **Figura 2.** Daño en el ADN y alteración de la cromatina en neuronas TH+ de la SNpc después de la inyección de 6-OHDA. (A,B) La inyección de 6-OHDA en la SNpc de ratones wt provoca 6 horas más tarde la aparición de focos de γ -H2AX en aproximadamente el 25 % de las neuronas TH+ (n = 3-6; prueba t de Student). Los ratones *En1 +/-* son más sensibles, con el 50 % de neuronas mostrando múltiples focos de γ -H2AX (n = 3-6; prueba t de Student; 130, se contaron 210 y 146 neuronas para cada condición, respectivamente). Barra de escala, 10 μ m. La inyección de 6-OHDA provoca la pérdida de aproximadamente el 30 % y el 60 % de las neuronas TH+ en ratones wt y *En1 +/-*, respectivamente (n = 3; prueba t de Student). El costado contralateral no inyectado se toma como referencia. En cada condición, se contaron entre 1.534 y 2.034 neuronas.

- 50 (C) Secciones del mesencéfalo teñidas para γ -H2AX, H3k27me3 y TH y analizadas mediante microscopía confocal. La tinción perinucleolar y perinuclear para H3K27me3 disminuye después de la inyección de 6-OHDA. Los ratones se analizaron 6 horas después de la inyección. Barra de escala, 10 μ m.
 (D) El porcentaje de neuronas TH+ que muestran una tinción perinucleolar y perinuclear densa para H3K27me3 cuantificada como en las **figuras 1E,F** disminuye drásticamente (izquierda) en ratones inyectados con 6-OHDA (n = 3; prueba t de Student; se contaron 148 y 91 neuronas en condiciones simuladas y con 6-OHDA, respectivamente). La tinción perinuclear para H3K27me3 en neuronas TH+ también disminuye después de la inyección de 6-OHDA (derecha) (n = 3; prueba t de Student; se contaron 40 y 47 neuronas en condiciones simuladas y con 6-OHDA, respectivamente).
 (E) Secciones del mesencéfalo teñidas para γ -H2AX, nucleolina y TH y analizadas mediante microscopía confocal. La localización nucleolar de la nucleolina en ratones inyectados con placebo se pierde 6 horas después de la inyección de 6-OHDA. NCL, nucleolina. Barra de escala, 10 μ m.
 (F) El porcentaje de neuronas TH+ con nucleolina nucleolar disminuye de manera significativa después de la inyección de 6-OHDA (n = 3; prueba t de Student; se contaron 161 y 97 neuronas en condiciones simuladas y con 6-OHDA, respectivamente). NCL, nucleolina.
 (G) El pre-ARNr 45S analizado mediante qRT-PCR se regula positivamente después de la inyección de 6-OHDA en núcleos purificados de la SNpc (n = 3; prueba t de Student).
 (H) Se analizaron secciones del mesencéfalo de (animales de 1 año de vida) teñidas para nucleolina y TH

mediante microscopía confocal. La nucleolina presenta una localización nucleolar en neuronas TH+ de wt, mientras que el 40 % de las neuronas TH+ en ratones *En1+/-* presentan un patrón de tinción difuso (flechas). Barra de escala, 50 μ m. Las imágenes de mayor aumento de áreas cuadradas punteadas se muestran en los paneles más a la derecha. Barra de escala, 10 μ m. El porcentaje de neuronas TH+ con nucleolina nucleolar disminuye de manera significativa en ratones *En1+/-* (n = 3; prueba t de Student; se contaron 99 y 87 neuronas en ratones wt y *En1+/-*, respectivamente). NCL, nucleolina. Véase también la **figura S2**.

Figura 3. Engrailed rescata las células TH+ de la muerte celular inducida por 6-OHDA

(A) A los ratones inyectados con 6-OHDA en la SNpc se les volvió a inyectar 30 minutos después con placebo o En2 y se analizaron a las 24 horas. En comparación con el placebo, la inyección de En2 previene la pérdida de células TH inducida por 6-OHDA en la SNpc ipsilateral. Barra de escala, 500 μ m.
 (B) Efecto protector de En2 evaluado mediante la proporción del recuento de células TH+ en la SNpc ipsilateral frente a contralateral 6 horas, 24 horas y 7 días después de la inyección (n = 3-5; prueba t de Student). El número de neuronas contadas varió entre 1.670 y 2.275 por condición.
 (C) El rescate de neuronas TH+ por parte de En2 en ratones inyectados con 6-OHDA se acompaña de una desaparición de ciclina A a las 24 horas. Barra de escala, 100 μ m.
 (D) La inmunotinción para H3K27me3 muestra una recuperación progresiva después de la inyección de En2. La recuperación de la nucleolina nucleolar es casi completa a las 24 horas. El porcentaje de neuronas TH+ con focos de γ -H2AX vuelve a la normalidad entre 24 horas y 7 días después de la inyección. Para cada análisis, n = 3. ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunetts (frente a la simulación). El número de neuronas contadas varió entre 102 y 150 para cada condición.
 (E) Expresión de genes seleccionados relacionados con la apoptosis y el ciclo celular en la SNpc de ratones con 6-OHDA/placebo y 6-OHDA/En2 analizados 6 horas después de las inyecciones (n = 5; prueba t de Student).
 (F) *Otx2* protege a las neuronas TH+ contra la muerte celular inducida por 6-OHDA. *Otx2* se inyectó 30 minutos después de la inyección de 6-OHDA y los ratones se analizaron 24 horas después. El efecto protector se evaluó como para las inyecciones de En2 (n = 3; prueba t de Student). El número de neuronas contadas varió entre 1.268 y 1.495 para cada condición. Véase también la **figura S3**.

Figura 4. El análisis de secuenciación de ARN revela la actividad antiapoptótica de Engrailed

(A,B) Los genes expresados diferencialmente en la SNpc de 6-OHDA frente a 6-OHDA/En2 relacionados con el daño en el ADN, la remodelación de la cromatina, la apoptosis y el ciclo celular se clasifican mediante valores p.
 (C) La expresión de genes seleccionados en la SNpc de 6-OHDA y 6-OHDA/En2 se confirma mediante qRT-PCR (n = 5; prueba t de Student).
 (D) Panel izquierdo: Se midieron las transcripciones de *Gadd45b* y *Pml* mediante qRT-PCR en la SNpc de 6-OHDA y 6-OHDA/En2 a las 6 horas (inyección con cicloheximida, CHX; n = 5; prueba t de Student). Panel derecho: Transcripciones de *Gadd45b* en la SNpc de ratones wt y *En1+/-* de 8 semanas de vida (n = 4; prueba t de Student).
 (E) Secciones del mesencéfalo de placebo, 6-OHDA/placebo y 6-OHDA/En2 teñidas para p-JNK y TH y analizadas mediante microscopía confocal. Barra de escala, 50 μ m. Las imágenes de mayor aumento de cuadrados punteados se muestran en los paneles más a la derecha. Barra de escala, 10 μ m.
 (F) En2 disminuye de manera significativa el porcentaje de neuronas TH+ de la SNpc con tinción para p-JNK (n = 3; ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de Tukey; el número de neuronas analizadas varió entre 227 y 351 para cada condición). Véase también la **figura S4**.

Figura S1 (relacionada con la figura 1). Expresión de genes alterados en neuronas mDA de ratones *En1+/-*

(A) La SNpc de ratones wt y *En1+/-* se microdisecionó con láser para el análisis de secuenciación de ARN. Se indican el número total de lecturas y los genes expresados diferencialmente (p < 0,05). La expresión reducida de *En1* en la SNpc *En1+/-* se confirmó mediante secuenciación de ARN.
 (B) El análisis de datos de secuenciación de ARN (Pathway Studio) revela un enriquecimiento significativo (p < 0,005) en los subgrupos de genes de Ontology implicados en el daño en el ADN y la remodelación de la cromatina entre los miembros de camada wt y *En1+/-*. El análisis utilizando Cell Process Pathways también mostró una expresión diferencial de genes relacionados con la apoptosis.
 (C) Análisis de datos de secuenciación de ARN de experimentos de ganancia de función de Engrailed mediante Pathway Studio. Se indican los subgrupos de genes enriquecidos (p < 0,01) (n = 5).
 (D) Los factores de transcripción expresados diferencialmente en el análisis de secuenciación de ARN mediante Pathway Studio de la SNpc de wt y *En1+/-* se clasifican mediante el valor p.
 (E) La expresión alterada de una selección de genes relacionados con el daño en el ADN, la remodelación de la cromatina y la apoptosis se confirma mediante qRT-PCR utilizando ARN de la SNpc de ratones wt y *En1+/-* de 6

semanas de vida (n = 3-6; prueba t de Student).

5 (F) El porcentaje de neuronas TH+ con >2 focos de γ -H2AX en la SNpc aumenta del 5 % en ratones wt al 17 % en ratones *En1+/-* de 24 semanas de vida (n = 3; prueba t de Student; se contaron 107 y 94 neuronas en las condiciones de wt y *En1+/-*, respectivamente).

(G) Las transcripciones de LINE-1 en el SNpc de ratones *En1+/-* analizadas mediante qRT-PCR aumentan en comparación con wt (n = 5; prueba t de Student).

10 (H) Se detectan neuronas TH+ positivas a la caspasa-3 activada en la SNpc de ratones *En1+/-* (de 8 semanas de vida). Barra de escala, 50 μ m.

Figura S2 (relacionada con la figura 2). La muerte de células TH y cambios en la cromatina en ratones inyectados con 6-OHDA

15 (A) El análisis de transferencia Western muestra una disminución del 50 % en los niveles de proteína TH a las 6 horas en la SNpc ipsilateral inyectada con 6-OHDA (n = 3).

20 (B) Los niveles de ARNm para TH y *En1* disminuyen (a las 6 horas) en un 70 y un 50 %, respectivamente, en la SNpc inyectada con 6-OHDA (n = 6; prueba t de Student).

(C) Se detecta caspasa-3 activada a las 6 horas en neuronas TH+ del costado inyectado con 6-OHDA, pero no en el costado contralateral. Barra de escala, 100 μ m.

25 (D) La triple inmunotinción de secciones del mesencéfalo para γ -H2AX, H3K9me3 y TH muestra que la colocalización de H3K9me3 con DAPI en condiciones simuladas se pierde en ratones inyectados con 6-OHDA. De manera similar, la colocalización de MeCP2 con DAPI en neuronas TH+ de ratones inyectados con placebo se pierde en ratones inyectados con 6-OHDA. Barra de escala, 10 μ m.

30 (E) El porcentaje de neuronas TH+ con marcas densas de H3K9me3 o MeCP2 disminuye de manera significativa en los ratones inyectados con 6-OHDA (n = 3; prueba t de Student). El número de neuronas contadas fue 161 (placebo) y 97 (6-OHDA) para H3K9me3 y 150 (placebo) y 128 (6-OHDA) para MecP2.

35 (F) Pérdida de tinción perinuclear de la lámina B2 en neuronas TH+ en la SNpc de ratones inyectados con 6-OHDA. Barra de escala, 20 μ m.

40 (G) Cuantificación superficial de regiones densas de DAPI en neuronas TH+ en ratones inyectados con placebo o 6-OHDA. En comparación con los controles con inyección de placebo, la distribución de las frecuencias relativas indica un desplazamiento hacia áreas más pequeñas densas de DAPI en neuronas TH+ de ratones inyectados con 6-OHDA (n = 137-177; prueba de Kolmogorov-Smirnov; 3 ratones por condición).

(H) Los ARNm de *p53* y *p21* se cuantificaron mediante qRT-PCR utilizando ARN total de la SNpc de ratones inyectados con 6-OHDA o placebo (n = 6; prueba t de Student).

45 (I) Expresión superior de elementos de repetición en la SNpc inyectada con 6-OHDA. Los niveles de transcripciones de LINE-1 analizadas mediante qRT-PCR utilizando ARN total de la SNpc aumentan en ratones inyectados con 6-OHDA. El nivel de ARN de LINE-1 también se analizó utilizando ARN de núcleos purificados de la SNpc (n = 3-5; prueba t de Student).

50 **Figura S3 (relacionada con las figuras 2-3).** Actividad de transcripción de *Engrailed* implicada en la protección de neuronas TH

55 (A) Se infundió a los ratones de forma unilateral placebo o EnHD-VP64 en la SNpc y se analizaron a los 7 días. La inmunotinción de secciones del mesencéfalo para detectar TH muestra que la infusión de EnHD-VP64 (pero no el placebo) provoca la pérdida de células TH en la SNpc ipsilateral. Barra de escala, 500 μ m.

60 (B) La pérdida de células TH inducida por EnHD-VP64 se evaluó comparando la proporción de recuentos de células TH+ en la SNpc ipsilateral frente contralateral a los 7 días posteriores a la infusión (n = 6; prueba t de Student). El número de neuronas contadas varió entre 1.902 y 2.118 por condición.

(C) La cuantificación de la tinción para γ -H2AX muestra que el porcentaje de neuronas TH+ con >2 focos de γ -H2AX en la SNpc aumenta después de la infusión de EnHD-VP64 (n = 3; prueba t de Student; se contaron 138 y 129 neuronas en condiciones simuladas y con EnHD-VP64, respectivamente).

65 (D) El análisis de datos de la secuenciación de ARN también revela genes expresados diferencialmente en

subgrupos de Pathway Studio Ontology relacionados con la organización y biogénesis nucleolar en la SNpc de ratones *En1*^{+/-} ($p < 0,1$).

5 (E) El nivel de pre-ARNr 45S en la SNpc de ratones wt y *En1*^{+/-} (animales de 8 semanas de vida) se analizó mediante qRT-PCR ($n = 4$; prueba t de Student).

(F) Engrailed promueve la supervivencia de las neuronas TH⁺ en el modelo con 6-OHDA. El efecto de supervivencia de Engrailed no se observó si Engrailed se inyectó 24 horas después de la inyección de 6-OHDA (cuando se pierde la mayoría de las neuronas TH⁺) y se evaluó la recuperación 6 horas después ($n = 3$).

10 **Figura S4 (relacionada con la figura 4).** Detección de marcadores del ciclo celular en neuronas TH⁺ después del estrés oxidativo agudo *in vivo* y protección mediada por Engrailed contra DSB inducidas por H₂O₂ *in vitro*

15 (A) Detección de marcadores del ciclo celular PCNA y pH3 en neuronas TH⁺ en el costado inyectado con 6-OHDA. Barra de escala, 20 μ m.

(B) La inmunotinción de secciones del mesencéfalo revela neuronas TH⁺ que expresan ciclina A solo en el costado ipsilateral de los ratones inyectados con 6-OHDA. Los ratones fueron analizados 6 horas después de la inyección. Barra de escala, 100 μ m.

(C) Detección de caspasa-3 activada en neuronas TH⁺ con tinción positiva para pH 3. Barra de escala, 50 μ m.

(D) Se cuantificó el porcentaje de neuronas TH⁺ que expresan ciclina A después de la inyección de 6-OHDA (izquierda, $n = 3$; prueba t de Student) y se confirmó mediante análisis de transferencia Western (derecha, $n = 4$; prueba t de Student).

30 (E) El tratamiento con Engrailed protege a las neuronas del mesencéfalo contra las DSB inducidas por H₂O₂. Se trataron cultivos primarios de neuronas mesencefálicas de embriones de ratón E14.5 con H₂O₂ a 5 μ M después de una incubación de 24 horas con NaCl o En1 (15 nM). Las células se fijaron 1 hora después del tratamiento con H₂O₂, se tiñeron para γ -H2AX y se cuantificó el número de focos ($n = 68-137$; ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey). La protección mediada por En2 contra las DSB inducidas por H₂O₂ utilizando cultivos de neuronas del mesencéfalo se evaluó mediante el ensayo cometa realizado según las instrucciones del kit Trevigen CometAssay y se analizó con el complemento OpenComet, barra de escala, 100 μ m. Se cuantificó el número de neuronas con una cola de cometa ($n = 39-46$; ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

(F) Genes expresados diferencialmente en la SNpc de ratones inyectados con En2 en comparación con ratones inyectados con placebo. Los genes relacionados con el daño en el ADN, la remodelación de la cromatina y la apoptosis se clasifican según los valores p.

40 **Figura 5 : En1/GBX2/LHX9**

5.1, Respuesta a la dosis para Engrailed; 5.2, Respuesta a la dosis para Gbx2; 5.3, Respuesta a la dosis para Lhx9.

45 **EJEMPLOS**

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales

50 Los ratones fueron tratados según las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio (US National Institute of Health) y la Directiva Europea 86/609 (Consejo de la CEE para la protección de los animales en la investigación experimental y otros usos científicos). Se mantuvieron ratones Swiss OF1 wt (Janvier) y *En1*^{+/-} (Hanks et al., 1995 Science 269, 679-682) en instalaciones convencionales para animales. Los grupos experimentales estaban compuestos por ratones de 6 a 9 semanas de vida.

55 **Tratamientos *in vivo***

60 Para las inyecciones de 6-OHDA, se colocaron ratones en un instrumento estereotáxico y se perforó un orificio en el cráneo a 3,3 mm caudal y 1 mm lateral al bregma. Se bajó la aguja 4 mm desde la superficie del cráneo y se realizaron inyecciones de 6-OHDA (2 μ l; 0,8 μ g/ μ l Sigma) o simuladas (NaCl al 0,9 %) durante 4 minutos. Este procedimiento dirige la homeoproteína al tejido SNpc. Para los experimentos de rescate con Engrailed, se inyectó una solución (2 μ l) de En2 recombinante bacteriana (300 ng; 4 μ M) y ácido colomínico (3 μ g) (Sonnier et al., 2007 J Neurosci 27, 1063-1071) o vehículo (NaCl al 0,9 %) 30 minutos después de la inyección de 6-OHDA utilizando las mismas coordenadas. Cuando se indicó, se añadió cicloheximida (0,1 μ g/ μ l, sigma). Para la inyección de proteína Otx2, se utilizó una solución de 2 μ l que contenía 300 ng de la proteína. Los ratones fueron sacrificados en los

momentos indicados para el análisis. Los tejidos SNpc para el análisis mediante qRT-PCR y transferencia Western se obtuvieron realizando punciones de 1 mm a partir de cortes coronales congelados de 2 mm de grosor.

Para EnHD-VP64, se infundió a los ratones durante 7 días una minibomba osmótica (Alzet 1002, Charles River Laboratories) conectada a una cánula de 4 mm de largo colocada en las mismas coordenadas estereotóxicas que las anteriores. La bomba se llenó con 100 μ l que contenían En-VP64 (400 nM, NaCl al 0,9 % o el volumen equivalente de un extracto bacteriano que contuviera plásmido vacío) y ácido colomínico (1,5 μ g/ μ l).

Cuantificación de imágenes

Las imágenes se analizaron con ImageJ. Para la inmunofluorescencia, todas las cuantificaciones se realizaron utilizando un aumento de 60X y planos focales sucesivos de 0,7 μ m de grosor. Para el análisis del patrón nucleolar de H3K27me3, se creó un gráfico de las intensidades de los píxeles a lo largo de una línea posicionada a través del nucléolo. La proporción perinuclear/nuclear de la intensidad de fluorescencia de H3K27me3 se determinó midiendo la densidad de píxeles en la periferia del núcleo y en el nucleoplasma. Las regiones densas de DAPI en ratones inyectados con placebo y 6-OHDA se cuantificaron midiendo las áreas de superficie de DAPI individuales en cada célula TH+ y representándolas como histogramas de distribución de frecuencia relativa.

Análisis estadístico

La significación estadística se determinó utilizando pruebas apropiadas tal como se ha indicado. Los datos se expresan como media \pm SEM. *p < 0,5, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 en todos los experimentos.

Análisis mediante secuenciación de ARN

Se aislaron neuronas mDA en la SNpc de ratones wt y *En1*^{+/-} marcadas utilizando el protocolo de tinción rápida de TH (Chung et al., 2005, Hum Mol Genet 14, 1709-1725) mediante microdissección por captura láser (LMD7000, Leica). Se agruparon muestras de 4 animales por grupo y se extrajo el ARN total utilizando el microkit All Prep DNA/RNA (Qiagen), seguido de DNasa I utilizando el protocolo RNeasy MinElute Cleanup para el tratamiento con DNasa I en columna. La construcción de bibliotecas de ADNc (Ovation RNA-seq System V2) y la secuenciación de ARN Illumina se realizaron mediante la plataforma Ecole Normale Supérieure Genomic (París). Los valores p de los genes expresados diferencialmente entre las muestras de wt y *En1*^{+/-} se calcularon utilizando el paquete DESeq (Anders et al., 2010, Genome Biol 11, R106). Los recuentos de lecturas normalizadas se inyectaron en el algoritmo Gene Set Enrichment Analysis (Pathway Studio, Elsevier) para analizar el enriquecimiento estadístico. Las colecciones Pathway Studio Ontology y Cell Process Pathways se seleccionaron como categorías de conjuntos de genes para el análisis. También se realizó un análisis de la secuenciación de ARN utilizando ARN extraído de neuronas mDA microdisseccionadas mediante captura láser después de la infusión de *Engrailed* (Álvarez-Fischer et al., 2011, Nat Neurosci 14, 1260-1266) en la SNpc de ratones wt y de punciones de tejido de SNpc recogidas 6 horas después de la inyección de 6-OHDA/placebo y 6-OHDA/*En2*.

qRT-PCR

El ARN total de los tejidos SNpc se extrajo utilizando el kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen), seguido de digestión con DNasa I (Thermo). El ARN (200 ng) se transcribió utilizando el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). La qRT-PCR se realizó utilizando SYBR-Green (Roche Applied Science) y los valores se normalizaron a *Gapdh* y/o *Hprt*. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento ddCt. En algunos experimentos, el ARN se aisló de manera específica de los núcleos de SNpc (kit de fraccionamiento de proteínas subcelulares, Thermo).

Tabla de procedimientos suplementarios: Lista de cebadores utilizados para el análisis de qRT-PCR

(se refiere a procedimientos experimentales)

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
<i>Casp9</i>	TGGTCCTGGTACATCGAGA SEQ. ID NO. 5	AGCATTGGCAACCCTGAGAA SEQ. ID NO.6
<i>CcnA1</i>	GGGCCTGCTAGGCTGT SEQ. ID NO. 7	GTTCTCTGTGGGGGATCCTG SEQ. ID NO. 8
<i>CcnA2</i>	CTCGCTGCATCAGGAAGACC SEQ. ID NO. 9	TAAGAGGAGCAACCCGTCG SEQ. ID NO: 10
<i>Cdk5</i>	GCCAGACTATAAGCCCTACCC SEQ. ID NO. 11	GCTGCACAGGGTTACTTTC SEQ. ID NO. 12
<i>En1</i>	CCGGTGGTCAAGACTGACTC SEQ. ID NO. 13	CTGGTGCGTGACCAGAG SEQ. ID NO. 14
<i>En2</i>	CCTTCTTCAGGTCCCAGGTC SEQ. ID NO. 15	AACTCAGCCTTGAGCCTCTG SEQ. ID NO. 16
<i>Fen1</i>	ATTCCTCTCGCCGCCATT SEQ. ID NO. 17	GAGGCATCGATGGCCACTTT SEQ. ID NO. 18
<i>Gadd45b</i>	TCTCTAGAGGAACGCTGAGACC SEQ. ID NO: 19	GTAGGGTAGCCTTTGAGGGATT SEQ. ID NO: 20
<i>Hdac7</i>	CCCACCTGTCAGACCCAAGT SEQ. ID NO: 21	AGTCATAGACCAGCCCTGTAGCA SEQ. ID NO: 22

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
5'UTR de LINE-1	CTGGGAACTGCCAAAGCAAC SEQ ID NO: 23	CCTCCGTTTACCTTTTCGCCA SEQ ID NO: 24
ORF2 de LINE-1	ATTCACAATGGGACCATGA SEQ ID NO: 25	GTAAAGATCCTTCCCAATCTGTTG SEQ ID NO: 26
<i>Nfkb2</i>	GGTGAAAAAAGGGGAAAG SEQ ID NO: 27	AGGAGAAAAAGCCGAG SEQ ID NO: 28
<i>p21 (Cdkn1α)</i>	GGCCCGGAACATCTCAGG SEQ ID NO: 29	AAATCTGTCAGGCTGGTCTGC SEQ ID NO: 30
<i>p53</i>	GGCGTAAACGCTTCGAGATG SEQ ID NO: 31	CTTCAGGTAGCTGGAGGTGAGC SEQ ID NO: 32
<i>Parp3</i>	GACCCAGCTTGAAGAGTCC SEQ ID NO: 33	CTGCCATCCAGTTGAGTT SEQ ID NO: 34
<i>Phf1</i>	CTATCCGGATGTTTCGCCTCC SEQ ID NO: 35	GAGGTGACCTATCTGGGGGT SEQ ID NO: 36
<i>Pml</i>	ATAGCAGCAGTGAGTCCAGC SEQ ID NO: 37	GCTGGCTAATTTTCTGGTTTCA SEQ ID NO: 38
<i>Polk</i>	CACAGCACTGCAGGAAAGG SEQ ID NO: 39	CCTGTCTGGGTGTGTCGATT SEQ ID NO: 40
<i>pre-ARNr 45S</i>	CGTGTAAAGACATTCCTATCTCG SEQ ID NO: 41	GCCCGCTGGCAGAACGAGAAG SEQ ID NO: 42
<i>Rad1</i>	TACTGCTTAGTGCCAGCCT SEQ ID NO: 43	AGGCATTTGCTTGCACACAC SEQ ID NO: 44
<i>Th</i>	GTACTGGACAGTCTCACACCA SEQ ID NO: 45	GGTGGTACCCTATGCATTTAGC SEQ ID NO: 46
<i>Uaca</i>	AGAGGTCAAGAAGGGCAAGC SEQ ID NO: 47	TGCCACTCAACGCTCTTTCT SEQ ID NO: 48
<i>Xpa</i>	GCGTGGCCAGTGAAAAGCA SEQ ID NO: 49	CGCATTCTTACAGATGGTGT SEQ ID NO: 50

Inmunotinción

Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4 % en PBS, los cerebros se fijaron posteriormente durante 1 hora y se crioprotegieron en sacarosa al 15 %. Los tejidos incluidos en Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek) se congelaron con isopentano antes del almacenamiento a -80 °C. Los cerebros se cortaron a nivel de la SNpc en secciones de 18 µm de grosor. Para la inmunofluorescencia, las secciones se permeabilizaron en Triton X-100 al 1 % en PBS durante 20 minutos y se incubaron a 100 °C durante 20 minutos en tampón de citrato (ácido cítrico 10 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 6,0). Después de bloquear durante 1 hora (suero de cabra normal al 10 %, Triton X-100 al 0,05 % en PBS), los tejidos se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo (anti-γ-H2AX de ratón, 1:200, Millipore; anti-TH de pollo, 1:500, Abeam; anti-caspasa3 activada de conejo, 1:200, Abeam; anti-nucleolina de conejo, 1:200, Sigma; anti-fibrilarina de conejo, 1:200, Cell Signaling; anti-H3k27me3 de conejo, 1:200, Millipore; anti-H3k9me3 de conejo, 1:200, Abeam; un generoso obsequio de Edith Heard; anti-lamina B2 de conejo, 1:100, Santa Cruz; anti-Mecp2 de conejo, 1:300, Abeam; anti-PCNA de conejo, 1:200, Cell Signaling; anti-ciclina A de conejo, 1:200, Santa Cruz; anti-pH3 de ratón, 1:100, Cell Signaling; anti-p-JNK de ratón, 1:200, Santa Cruz). Las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados (Alexa Fluor anti-pollo 488, anti-pollo 647, anti-ratón 488, anti-ratón 546 y anti-conejo 546, Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones marcadas se observaron en imágenes mediante microscopía confocal (SP5, Leica). Para la inmunohistoquímica de TH, las secciones se permeabilizaron en Triton X-100 al 1 % y se incubaron durante la noche a 4 °C con suero de cabra normal al 10 % en PBS que contenía un anticuerpo policlonal de conejo contra TH (1:1000; Pel-Freez Biologicals). Las secciones se trataron con un anticuerpo secundario biotinilado y se incubaron con un complejo de peroxidasa de rábano picante biotinilada con avidina (ABC system, Vectastain). La peroxidasa se reveló utilizando el kit de sustrato para peroxidasa (HRP) DAB (Vectastain) y se obtuvieron imágenes con un microscopio Nokon Eclipse i90.

RESULTADOS

Ejemplo 1: Expresión del gen de neuronas mDA en la SNpc de ratones *En1*^{+/-}

Se realizó un análisis de secuenciación de ARN en la SNpc microdisecionada en ratones wt y *En1*^{+/-}. Se obtuvieron lecturas comparables en ratones wt y *En1*^{+/-} con 989 genes expresados diferencialmente ($p < 0,05$) (**figura S1A**). El análisis se realizó en animales de 6 semanas de vida cuando todas las neuronas aún estaban presentes en los ratones *En1*^{+/-}. Pathway Studio Ontology (software Gene Set Enrichment Analysis, Pathway Studio) indica que los tres grupos más representados y significativos son la reparación del ADN ($p = 0,002$), la remodelación de la cromatina ($p = 0,004$) y los factores de transcripción ($p = 0,007$); el análisis mediante Cell Process Pathways también reveló genes diferenciales de regulación de la apoptosis ($p = 0,01$) (**figura S1B**). Los genes dentro de estas ontologías y vías se clasificaron mediante valores p crecientes; la **figura 1A** destaca aquellos con diferencias significativas en los números de lectura.

Los genes de factores de transcripción representan el grupo más abundante (**figura S1B**); la **figura S1D** clasifica por valores p aquellos con expresión modificada en ratones *En1*^{+/-}. La infusión de *En2* en la SNpc de ratones wt también modifica los genes de factores de transcripción, pero mucho menos los genes de respuesta al daño en el ADN y los que modifican la cromatina (**figura S1C**) que, por lo tanto, se investigaron posteriormente en el contexto de este estudio. La RT-PCR cuantitativa (**figura S1E**) confirmó que los ratones *En1*^{+/-} de 6 semanas de vida muestran una expresión alterada de diversos genes relacionados con el daño en el ADN, la remodelación de la

cromatina y la apoptosis.

Ejemplo 2: Roturas de cadenas de ADN y marcas de cromatina modificada en neuronas mDA *En1*^{+/-}

5 Se examinaron las neuronas mDA en la SNpc de ratones *En1*^{+/-} (entre 6 y 8 semanas de vida) en busca de signos de daño en el ADN siguiendo el marcador de rotura de cadena de ADN (DSBs) γ -H2AX (Lobrich et al., 2010 Cell Cycle 9, 662-669). Esto reveló la presencia de múltiples focos de γ -H2AX en aproximadamente el 16 % de las neuronas TH⁺ en la SNpc (**figuras 1B, C**). Cabe destacar que las DSB no necesariamente conducen a una muerte celular rápida, tal como lo demuestra la ausencia de muerte significativa, en el mutante *En1*^{+/-}, entre las 24 y 48
10 semanas, aunque el 16 % de las células tienen múltiples focos de γ -H2AX a las 24 semanas (**figura S1F**). En ratones wt, aproximadamente el 98 % de las neuronas mDA muestran un solo anillo de γ -H2AX alrededor del nucléolo (**figura 1B**), también presente en neuronas de todo el cerebro. En consonancia con la menor sensibilidad de las neuronas mDA del VTA a la pérdida de un alelo *En1*, la tinción para γ -H2AX fue similar en el VTA de ratones wt y *En1*^{+/-} (**figura 1C**).

15 Los ratones *En1*^{+/-} también presentan signos de alteración de la cromatina. Tal como se muestra en las **figuras 1D-F**, el patrón de tinción perinucleolar y perinuclear para H3K27me3 (histona H3 trimetilada en K27) cambia en una fracción significativa de neuronas TH⁺ *En1*^{+/-}. La distribución del tamaño de las regiones densas de DAPI de la heterocromatina (Guenatri et al., 2004 J Cell Biol 166, 493-505) también muestra una reducción en el porcentaje de manchas grandes en el ratón *En1*^{+/-} (**figura 1G**). Los cambios en la heterocromatina suelen estar asociados con cambios en la expresión de elementos nucleares interdispersos largos (LINEs, *Long Interdispersed Nuclear Elements*), por lo que la expresión de LINE aumenta en la SNpc de mutantes *En1*^{+/-} (**figura S1G**). La inducción de genes de apoptosis (**figura 1A**) se confirma por la tinción conjunta de TH/caspasa-3 activada en la SNpc de ratones *En1*^{+/-}, nunca observada en miembros de camada de wt (**figura S1H**).

25

Ejemplo 3: Mayor sensibilidad de las neuronas mDA *En1*^{+/-} al estrés oxidativo agudo

Se aplicó un estrés oxidativo agudo a neuronas mDA inyectando 6-OHDA (un fármaco productor de superóxido capturado específicamente por las neuronas mDA) directamente en la SNpc. Esto indujo, en 6 horas, la pérdida del 35 % de las neuronas TH⁺ y la formación de múltiples focos anormales de γ -H2AX en aproximadamente el 26 % de las restantes (**figuras 2A, B**), solo en la SNpc ipsilateral. La pérdida neuronal fue acompañada por una reducción en la proteína TH y el ARNm (también ARNm de *En1*) (**figuras S2A, B**) y la presencia de numerosas neuronas mDA positivas de caspasa-3 activada (**figura S2C**). La inyección de 6-OHDA en ratones *En1*^{+/-} condujo a un mayor porcentaje de neuronas TH⁺ con focos de γ -H2AX en el costado inyectado con 6-OHDA (51 %) y a un aumento paralelo en la pérdida de neuronas TH⁺ (60 %) (**figuras 2A, B**). La infusión de EnHD-VP64 de hecho conduce a la muerte de células mDA (**figuras S3A,B**) y a un aumento en el número de focos de γ -H2AX (**figuras S3C**).

35

Ejemplo 4: El estrés oxidativo induce cambios en las marcas de heterocromatina.

40 Las marcas de heterocromatina también se modifican 6 horas después de la inyección de 6-OHDA en ratones wt. La tinción densa perinucleolar y perinuclear para H3K27me3 en neuronas TH⁺ de ratones inyectados con placebo se transforma en tinción nucleoplásmica difusa en ratones inyectados con 6-OHDA (**figura 2C**). Este cambio se cuantificó en el nucléolo midiendo la intensidad de fluorescencia perinucleolar a lo largo de un diámetro (**figura 2D**, izquierda). De manera similar, la proporción de intensidades de fluorescencia de H3K27me3 entre la lámina nuclear periférica y el estroma nuclear disminuyó de 1,4 a 1,0 (**figura 2D**, derecha). La inyección aguda de 6-OHDA también alteró la tinción para H3K9me3 (histona H3 trimetilada en K9) y MeCP2 (**figura S2D,E**), con la pérdida de la tinción nítida de la lámina B2 (**figura S2F**) y un cambio en la distribución del tamaño de los puntos densos de DAPI (**figura S2G**). MeCP2 se une a los CpG metilados y los cambios en su tinción podrían reflejar la oxidación de la guanina.

45

50 El estrés nucleolar, sugerido por la pérdida perinucleolar de γ -H2AX después de 6-OHDA (**figura 2A**), se verifica por la caída del 70 % (placebo) al 30 % (6-OHDA) de células mDA con tinción densa de nucleolina (**figuras 2E, F**). Este cambio estuvo acompañado de una fuerte regulación positiva del ARN pre-45S ribosómico (**figura 2G**) que indica daño nucleolar. En comparación, la tinción de nucleolina, normal en neuronas TH⁺ *En1*^{+/-} a las 6 semanas, muestra signos de alteración al año (**figura 2H**). Sin embargo, la expresión de genes involucrados en la organización del nucléolo (secuenciación de ARN) y el análisis qRT-PCR del pre-ARNr 45S sugieren un cambio en la fisiología del nucléolo en ratones *En1*^{+/-} de 6-8 semanas de vida (**figuras S3D,E**).

55

Ejemplo 5: Engrailed disminuye el número de DSB inducidas por H₂O₂

60 Para verificar si Engrailed es capaz de regular el daño en el ADN inducido por estrés oxidativo, se inyectó unilateralmente 6-OHDA a ratones wt y se les volvió a inyectar 30 minutos después con vehículo (placebo) o En2. Los análisis se realizaron a las 6 horas, 24 horas o 7 días después de las inyecciones. La pérdida drástica a las 24 horas de células TH⁺ en la SNpc de ratones inyectados con 6-OHDA/placebo se reduce ampliamente en ratones inyectados con 6-OHDA/En2 (**figura 3A**). La protección todavía es visible a los 7 días con un 40 % y un 20 % de neuronas supervivientes en ratones inyectados con En2 y en ratones con placebo, respectivamente (**figura 3B**). La

65

inyección de En2 24 horas (en lugar de 30 minutos) después de 6-OHDA y analizada 6 horas más tarde no mostró recuperación, lo que demuestra que la tinción de TH corresponde a la supervivencia real y no a la reexpresión de TH (**figura S3F**).

5 La apoptosis inducida por 6-OHDA se acompaña de la expresión de marcadores del ciclo celular (**figuras S4A-D**). Por consiguiente, la expresión de ciclina A detectada en células TH+ tratadas con En2 6 horas después de las inyecciones casi había desaparecido a las 24 horas (**figura 3C**). El rescate neuronal por En2 se asocia con la reaparición de patrones de tinción normales para H3K27me3, nucleolina y γ -H2AX (**figura 4D**). El porcentaje de células TH+ con tinción perinucleolar para H3K27me3 "de tipo salvaje" aumentó del 20 % al 37 % a las 6 horas y alcanzó el 60 % y el 80 % a las 24 horas y a los 7 días, respectivamente. El patrón de nucleolina de tipo salvaje tardó más en reaparecer, ya que la recuperación se observó solo a las 24 horas con pocos cambios entre las 24 horas y una semana. Finalmente, la disminución en el número de focos de γ -H2AX fue más lenta con una recuperación completa solo a los 7 días.

15 El rescate se correlacionó con un aumento significativo en la expresión del ARNm de TH y una disminución en la del pre-ARNr 45S ya 6 horas después de la inyección de En2 (**figura 3E**). La expresión de genes seleccionados relacionados con el ciclo celular y la apoptosis, regulada positivamente en el ratón *En1+/-* o después de la inyección de 6-OHDA, se reprimió en la SNpc de ratones con 6-OHDA/En2 (**figura 3E**). Los análisis se realizaron a las 6 horas cuando los animales inyectados con placebo y En2 todavía tenían cantidades similares de neuronas mDA (**figura 3B**).

20 Las neuronas del mesencéfalo E14.5 que expresan Engrailed, pero de las cuales solo el 1-2 % son dopaminérgicas, fueron expuestas a H₂O₂ con o sin En2. La **figura S4E** ilustra que En2 disminuye el número de DSB inducidas por H₂O₂ en paralelo con una disminución en la formación de colas de cometa que indican daño en el ADN.

25

Ejemplo 6: Engrailed activa vías de supervivencia a corto y largo plazo

30 La protección por En2 requiere su inyección antes de las 24 horas (**figura S3F**). Para identificar genes en esta vía de supervivencia temprana, se secuenció el ARN de SNpc de ratones con 6-OHDA/placebo o 6-OHDA/En2 (6 horas) y se analizaron genes en las vías de remodelación de cromatina, daño en el ADN, apoptosis y ciclo celular según Pathways Studio. Las **figuras 4A,B** clasifican por orden de importancia los genes con mayores diferencias en números de lecturas y la **figura 4C** proporciona confirmación por qRT-PCR de una expresión aumentada de los principales genes representativos en las 4 vías analizadas. Los genes en la vía de la apoptosis están más representados que en el ratón *En1+/-* (**figura 1**). Esto no se debe a la inyección de En2 per se (**figura S4F**), lo que sugiere que la rápida regulación positiva de las vías antiapoptóticas por En2 tiene lugar de manera específica después del estrés oxidativo agudo.

40 En paralelo con la disminución de la expresión de *Gadd45b* en ratones *En1+/-* de 8 semanas de vida, la adición de cicloheximida en los experimentos de rescate demuestra que *Gadd45b*, a diferencia de *Pml* para el control, no requiere la traducción de una proteína intermedia y, por lo tanto, es una diana directa de Engrailed, (**figura 4D**). La alta inducción de *Gadd45b/g* y *NF-kB* sugirió un papel para la señalización de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), una vía implicada en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Parkinson (EP) (Coffey, 2014, Nat Rev Neurosci 15, 285-299). Las **figuras 4E,F** confirman que el fuerte aumento en la tinción de p-JNK 6 horas después de 6-OHDA es antagonizado por En2 (**figura 4F**).

45

Ejemplo 7: Engrailed, así como otras dos homeoproteínas, Gbx2 y Lhx9, disminuyen el número de DSB inducidas por H₂O₂

50 Dada la alta conservación estructural y funcional de las homeoproteínas, los inventores de la presente invención esperaban que otras homeoproteínas tuvieran efectos similares a los de Engrailed. Por lo tanto, han comparado el efecto sobre el daño en el ADN inducido por H₂O₂ de otras dos homeoproteínas, Gbx2 (Lin et al., 1996, Genomics, 3, 335-342) y Lhx9 (Rétaux et al., 1999, J. of Neuroscience, 19(2), 783-793) en comparación con Engrailed.

55 Las células del mesencéfalo E14.5 se disociaron con tripsina y se cultivaron durante 6 días en medio neurobasal suplementado con glutamina, aspartato, glutamato y mezcla de antibióticos/antimicóticos en cubreobjetos de vidrio con poli-D-lisina/laminina. A continuación, las células se trataron con la homeoproteína a la concentración indicada durante 24 horas y, a continuación, se expusieron durante 1 hora con 100 μ M de H₂O₂ y se fijaron en paraformaldehído al 4 %. Las roturas de ADN se visualizaron con inmunofluorescencia de γ H2AX. Cada punto de datos en los gráficos representa el número de focos medianos a grandes en el núcleo de una célula. 5-10 células por cubreobjetos y había 4 cubreobjetos por condición. No se incluyeron células sin focos.

60

Las diferencias entre los grupos se evaluaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn.

7.1. Dosis-respuesta para Engrailed 1 (figura 5.1)

El tratamiento con 100 μ M de H₂O₂ aumentó de manera significativa el número de focos de 1,9 a 8,3/célula ($p < 0,01$). El pretratamiento con En1 redujo el número de focos de forma dependiente de la dosis. 1 ng/ml (0,25 nM) redujo parcialmente, pero de manera significativa ($p < 0,01$), el número de focos causados por H₂O₂. 5 ng/ml (1,25 nM) y 20 ng/ml (0,5 nM) redujeron el número de focos aún más ($p < 0,01$), pero fueron todavía superiores que la condición de control tratada con vehículo ($p < 0,01$). 100 ng/ml (2,5 nM) fue indistinguible de las células tratadas con control y, por lo tanto, evitó por completo las roturas de ADN causadas por H₂O₂.

7.2. Dosis-respuesta para Gbx2 (figura 5.2)

El tratamiento con H₂O₂ duplicó de manera significativa el número de focos de γ 2HAX en comparación con el control tratado con vehículo ($p < 0,01$). 1 ng/ml (0,027 nM) redujo parcialmente, pero de manera significativa, el número de focos ($p < 0,01$). 20 ng/ml (0,54 nM) redujo algo más el número de focos y 100 ng/ml (2,68 nM) bloquearon los efectos del H₂O₂.

7.3. Respuesta a la dosis para Lhx9 (figura 5. 3). El tratamiento con H₂O₂ duplicó de manera significativa el número de focos de γ 2HAX en comparación con el control tratado con vehículo ($p < 0,01$). 5 ng/ml (0,022 nM) redujeron de manera significativa el número de focos y esta reducción fue aún mayor, pero no completa, a 20 ng/ml (0,54 nM). 100 ng/ml (2,68 nM) bloquearon completamente los efectos del H₂O₂.

Conclusión

Las homeoproteínas Engrailed se expresan en neuronas dopaminérgicas adultas de la sustancia negra. En ratones heterocigóticos de Engrailed1, estas neuronas comienzan a morir a las 6 semanas, son más sensibles al estrés oxidativo y desarrollan progresivamente rasgos similares a los observados después de un estrés oxidativo agudo y fuerte infligido a neuronas de tipo salvaje. Estos cambios incluyen roturas de cadenas de ADN y la modificación (intensidad y distribución) de diversas marcas de heterocromatina nuclear y nucleolar. Engrailed1 y Engrailed2 son proteínas transductoras bioquímicamente equivalentes que se utilizaron previamente para antagonizar la muerte de neuronas dopaminérgicas en ratones heterocigóticos de Engrailed1 y en modelos de ratón de la enfermedad de Parkinson.

Por consiguiente, se demuestra que, después de un estrés oxidativo agudo, una única inyección de Engrailed2 restaura todas las marcas de heterocromatina nuclear y nucleolar, disminuye el número de roturas de la cadena de ADN y protege a las neuronas dopaminérgicas contra la apoptosis. Estos resultados respaldan el hecho de que Engrailed no solo es capaz de prevenir el daño de las neuronas dopaminérgicas presentes en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, sino también de rescatar a estas neuronas cuando resultan dañadas por el estrés oxidativo.

Los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) son tóxicos, en particular a nivel del ADN, donde inducen directamente la DDR. En consecuencia, las neuronas con una actividad metabólica elevada, tales como las neuronas mDA de SNpc, que producen cantidades elevadas de ATP y ROS, corren el riesgo de degeneración. Las vías de remodelación de la cromatina y la DDR están interconectadas, ya que el daño en el ADN induce cambios en la cromatina, que son necesarios en sí mismos para dar acceso a la maquinaria de reparación del ADN. Este estudio sitúa a los genes de Engrailed como reguladores clave del daño en el ADN y los cambios en la cromatina que acompañan a las formas crónicas y agudas de estrés oxidativo en las neuronas mDA.

El modelo crónico En^{+/-} de estrés oxidativo en el que las neuronas mDA muestran una tasa de muerte progresiva, pero más rápida, que en ratones WT demuestra que, de manera similar a la dosis de Otx2 en la retina adulta, la dosis de Engrailed es importante en la SNpc adulta. De hecho, dado que En1 y En2 son bioquímicamente equivalentes, la pérdida de solo un alelo de cada cuatro es suficiente para acelerar la muerte celular. En el contexto del envejecimiento y las enfermedades neurológicas, esto sugiere que las neuronas mDA en el ratón En1^{+/-} envejecen más rápido y son más sensibles a la 6-OHDA, una toxina utilizada en modelos animales de EP.

La EP, incluso en sus formas familiares, se manifiesta bastante tarde en la vida, lo que subraya un riesgo asociado con la edad. Incluso si Engrailed no es un gen de la EP, sus propiedades anti-envejecimiento podrían explicar la asociación de los polimorfismos de EN1 y el riesgo de desarrollar EP. En este contexto, cabe destacar que varios fenotipos observados en los ratones En1^{+/-} o en el modelo agudo de 6-OHDA recuerdan las observaciones realizadas en pacientes o modelos de EP. Por ejemplo, la pérdida de MeCP2 en las neuronas mDA de la SNpc compromete la vía dopaminérgica nigroestriatal; las vías de JNK y ciclina están implicadas en la EP y se informó de la difusión de nucleolina en pacientes con EP.

En un estudio previo, se demostró que Engrailed protege a las neuronas mDA en tres modelos de ratón de EP (Alvarez-Fischer *et al.*, 2011). El estudio fue muy diferente en el sentido de que se inyectó 6-OHDA en el cuerpo estriado y no directamente en la SNpc, un procedimiento agudo y severo que evita los efectos secundarios a largo plazo. De manera más importante, en el estudio previo, Engrailed se infundió en la SNpc 3 semanas antes de la

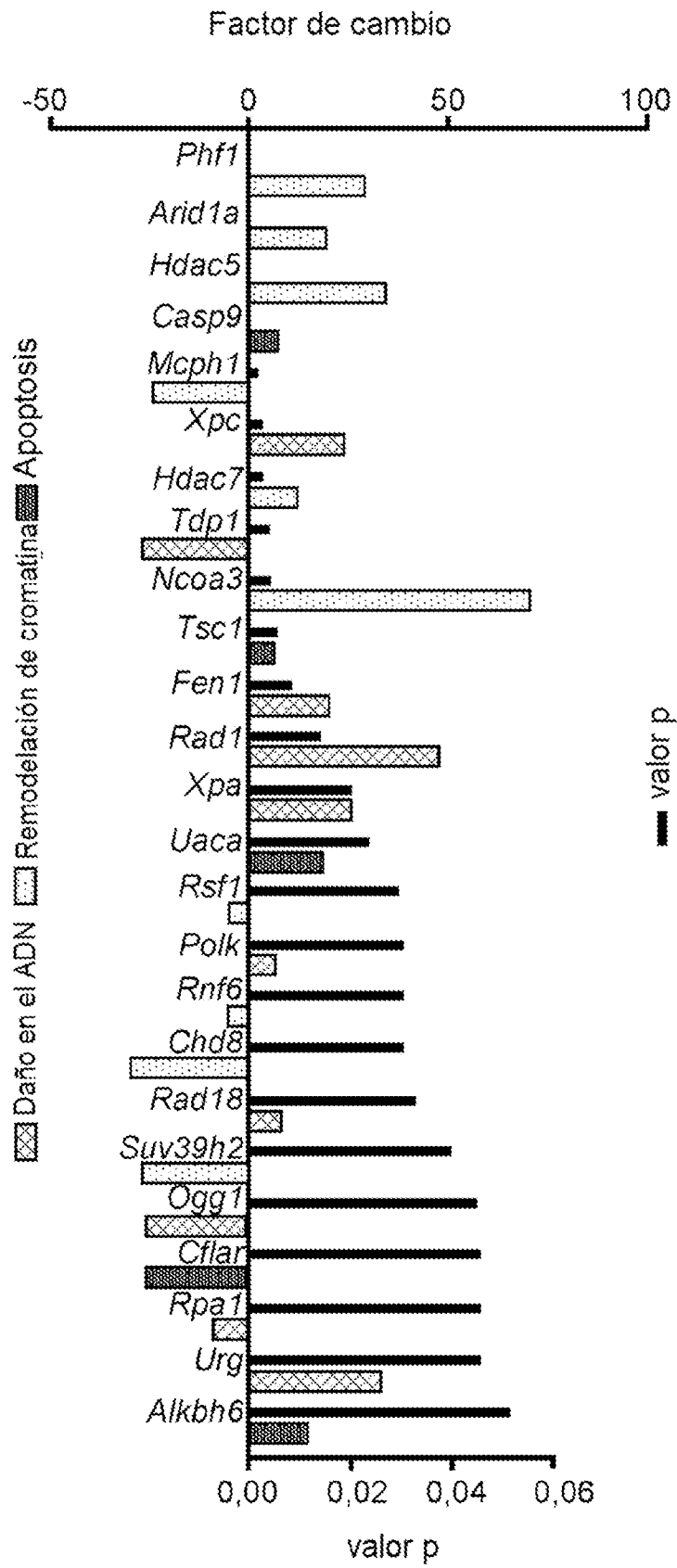
5 lesión estriatal y no se inyectó 30 minutos después de la inyección de 6-OHDA. Finalmente, el presente estudio, al contrario de los anteriores, establece un papel de Engrailed como regulador transcripcional y epigenético y no solo a nivel de la traducción de proteínas, incluso si los dos modos de acción pueden concurrir para salvar las células. Esta actividad transcripcional y epigenética es muy importante, ya que sugiere que Engrailed puede tener un efecto duradero en la supervivencia de las neuronas mDA. Además, el presente estudio, al contrario del anterior, muestra que Engrailed puede ser útil para rescatar a los dopaminérgicos, no sólo para prevenir su lesión inducida por estrés oxidativo.

10 Por lo tanto, se puede proponer un mecanismo basado en efectos a corto y largo plazo. Entre los efectos a corto plazo se incluyen la traducción de ARNm que codifican proteínas mitocondriales (Alvarez-Fischer et al., 2011; Stettler et al., 2012) y, en particular, pero no solo, la transcripción de genes antiapoptóticos (este estudio) y la represión de la apoptosis como ya se ha propuesto (Alberi et al., 2004; Beltran et al., 2014), con un predominio, aparentemente, de las vías de GADD45b/g, NF-kB y JNK. Se propone que los efectos a largo plazo se relacionen con mecanismos transcripcionales y epigenéticos que permiten tanto la reestructuración de la cromatina como la
15 reparación del ADN, dos vías altamente interconectadas basadas en la regulación de los genes destacados en el estudio de secuenciación de ARN inicial que compara el transcriptoma de SNpc de WT y En1+/-.

20 En conclusión, los efectos protectores de Engrailed en modelos de EP (Alvarez-Fischer et al., 2011), junto con los datos actuales, dan crédito a la idea de utilizar Engrailed como una proteína terapéutica que actúa tanto a nivel de traducción de ARNm como de transcripción génica directa o indirecta.

REIVINDICACIONES

1. Proteína Engrailed para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis lateral amiotrófica.
- 5 2. Composición que comprende la proteína Engrailed para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis lateral amiotrófica.
- 10 3. Composición para utilización, según la reivindicación 2, en la que la proteína Engrailed se administra por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, por infusión, subcutánea, enteral, rectal, intranasal, por inhalación, bucal, sublingual, intramuscular, transdérmica, intradérmica, tópica, intraocular, vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal, o cualquier combinación de las mismas.
- 15 4. Composición para su utilización, según la reivindicación 2 o 3, en la que la proteína Engrailed se administra una sola vez.
- 5 5. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la proteína Engrailed se administra directamente en la región de la sustancia negra pars compacta.
- 20 6. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que dicha composición comprende otro fármaco farmacéutico seleccionado entre el grupo de factor de crecimiento, azúcar complejo y sirtuina.
7. Composición para su utilización, según la reivindicación 6, en la que dicho azúcar complejo es ácido polisiálico.
- 25 8. Composición para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que la proteína Engrailed protege a las células del daño en el ADN y/o la remodelación de la cromatina.



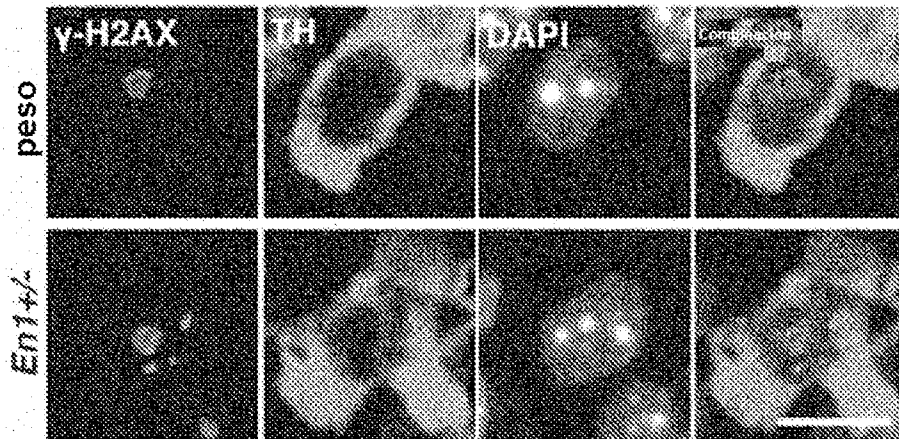


Fig. 1B

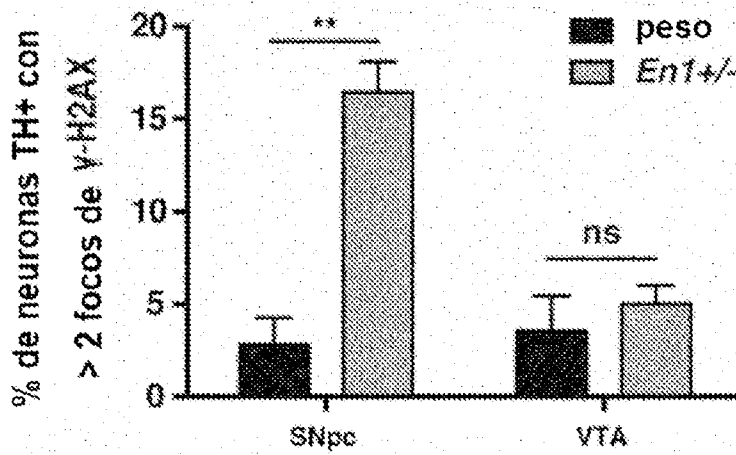


Fig. 1C

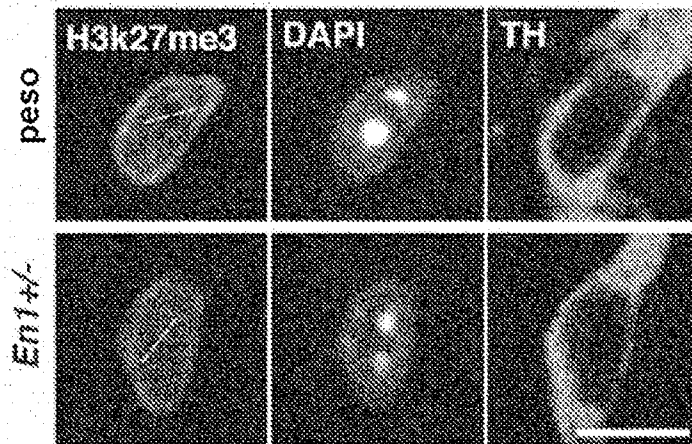


Fig. 1D

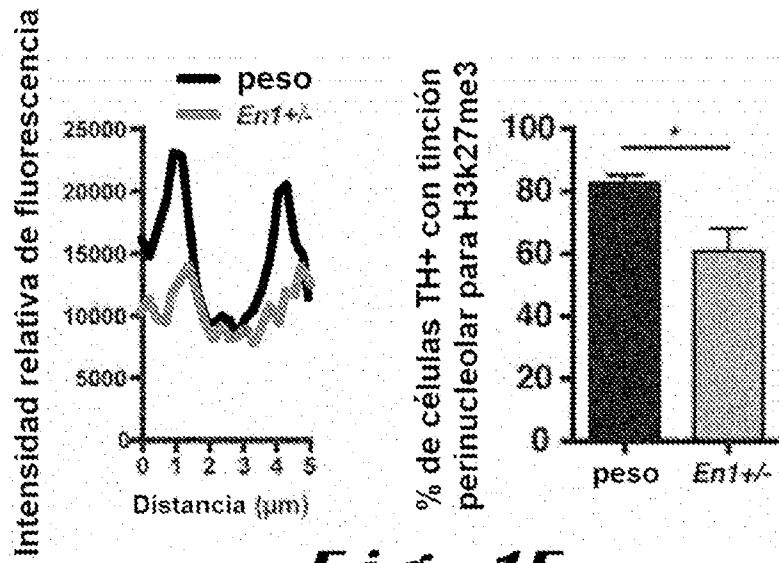


Fig. 1E

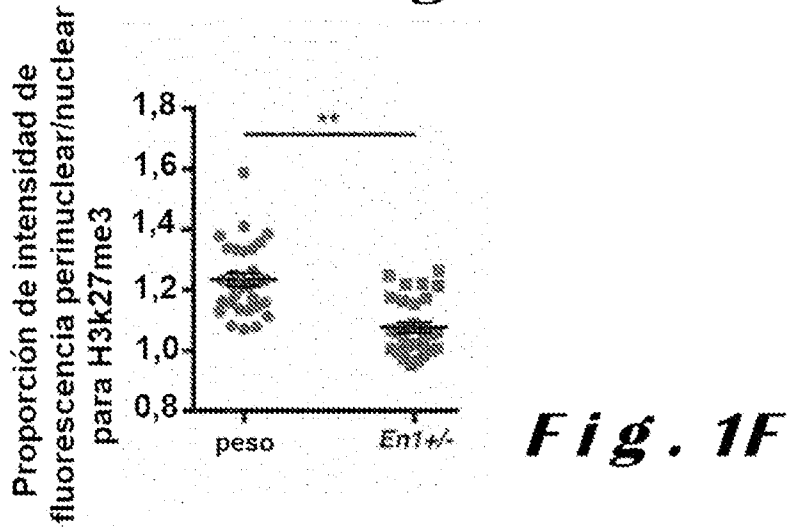


Fig. 1F

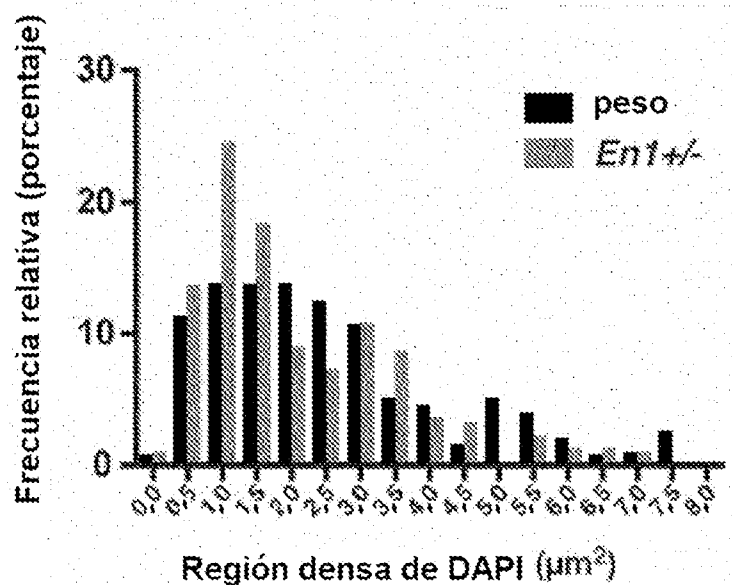


Fig. 1G

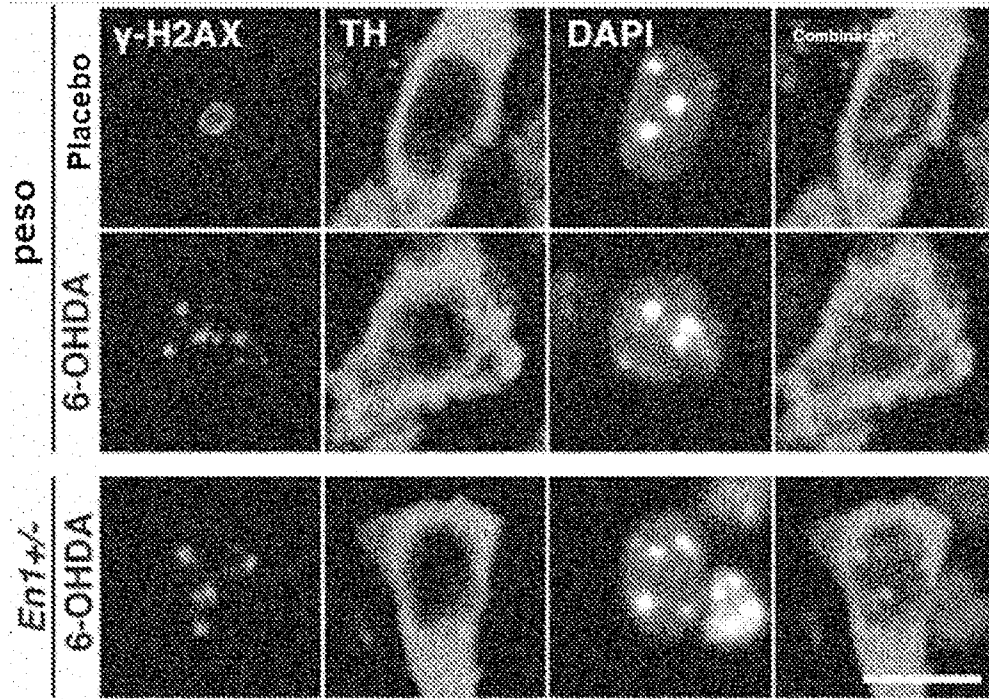


Fig. 2A

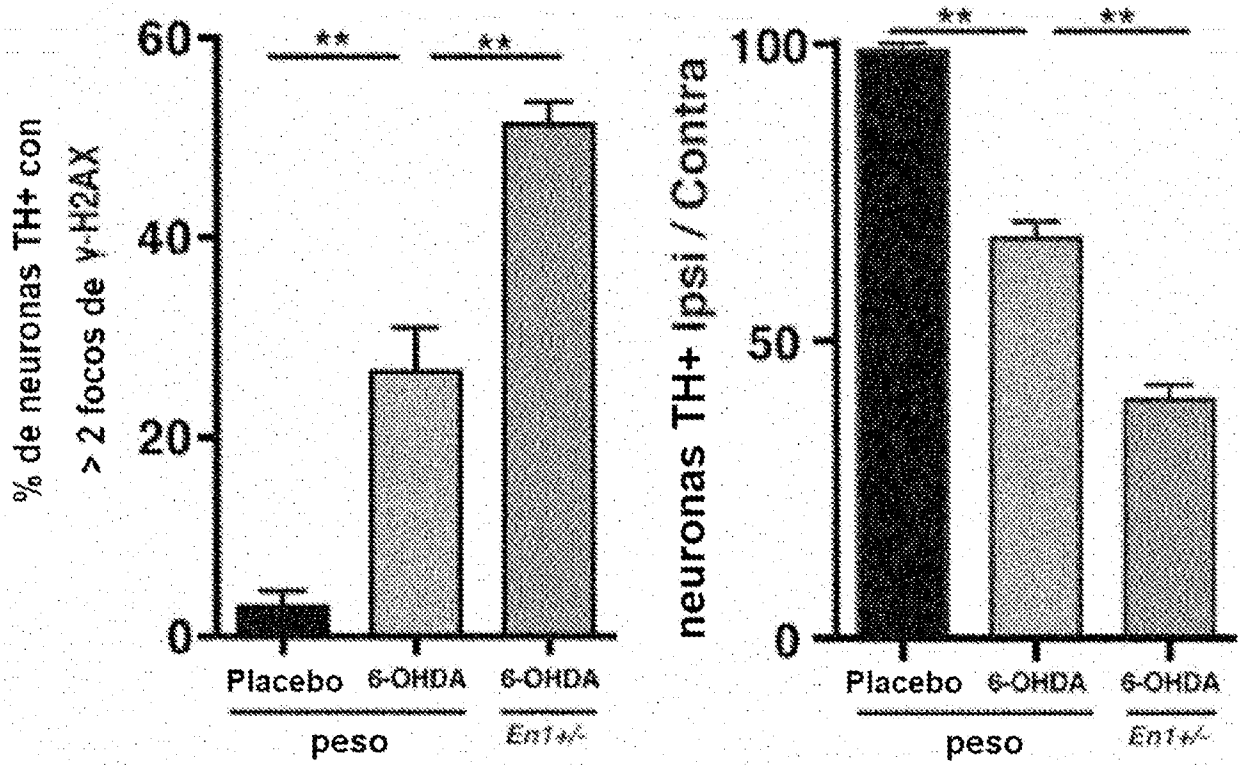


Fig. 2B

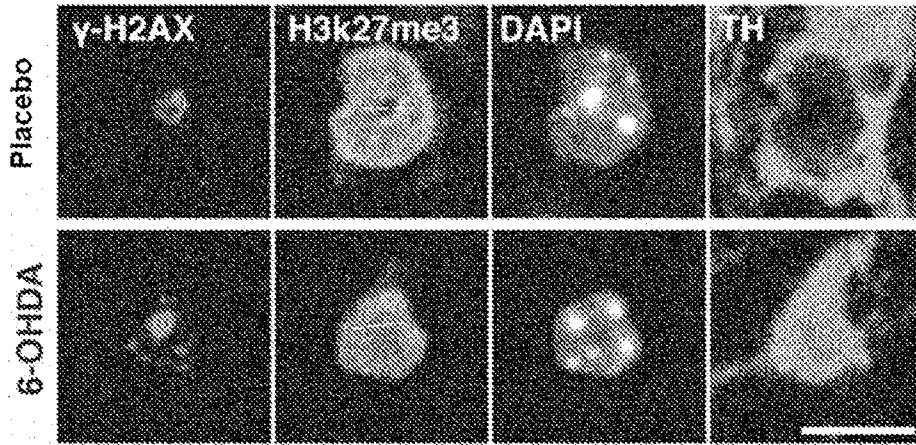


Fig. 2C

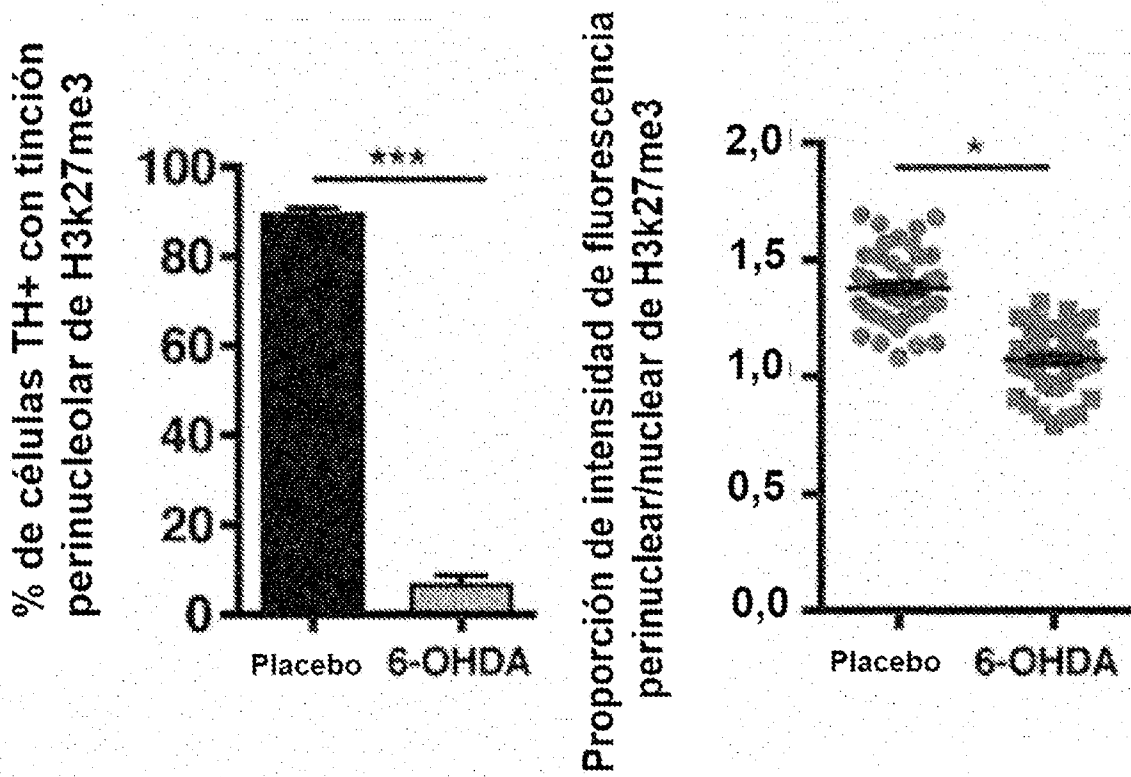


Fig. 2D

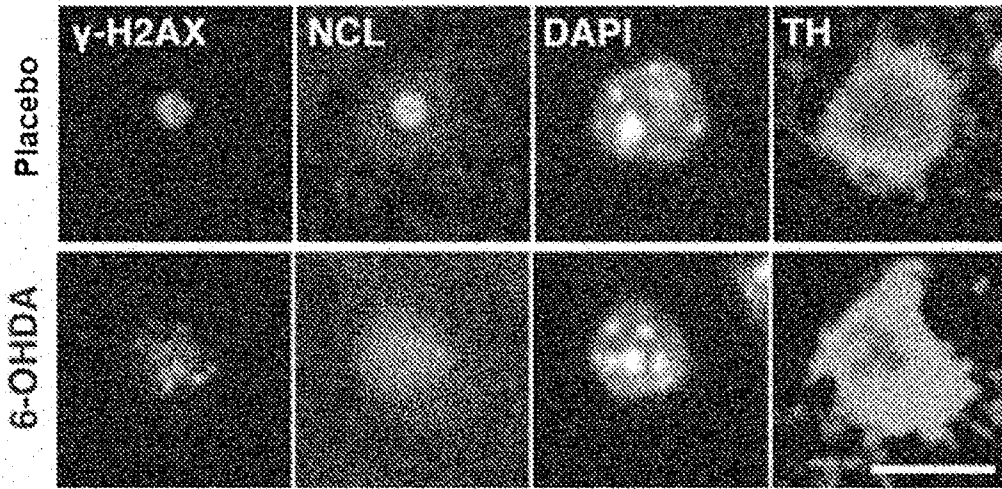


Fig. 2E

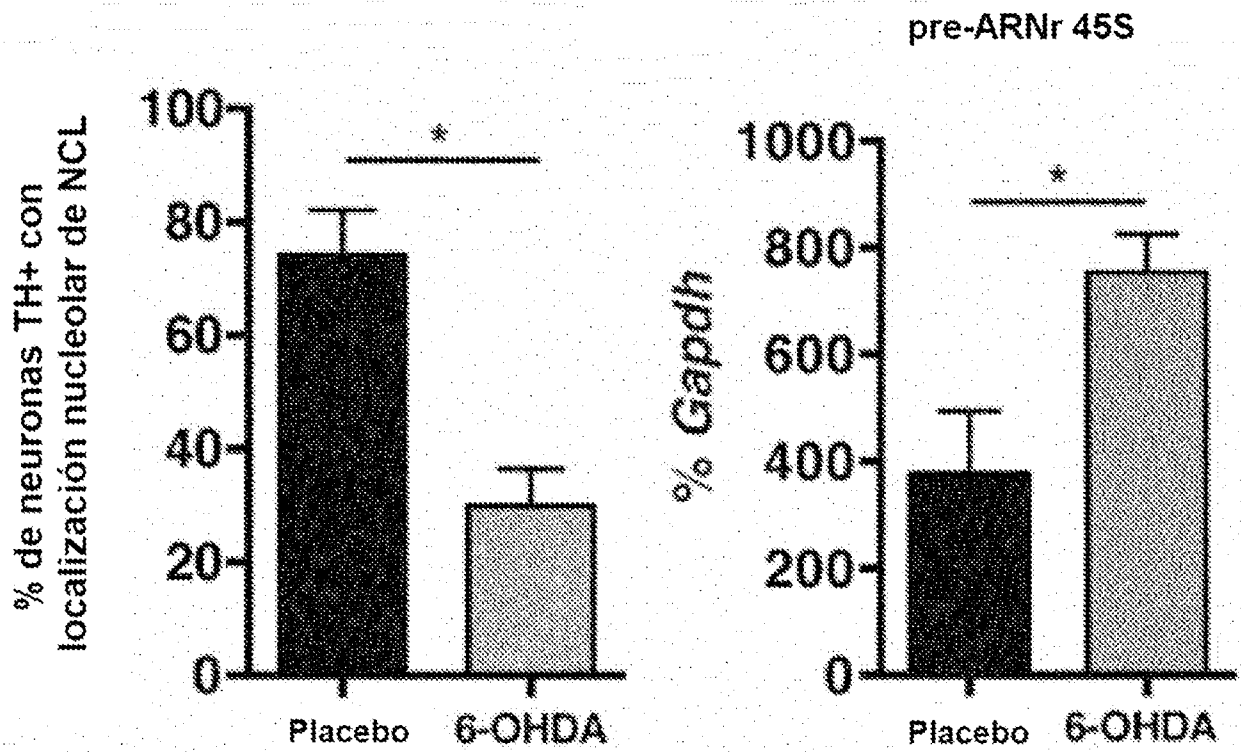


Fig. 2F

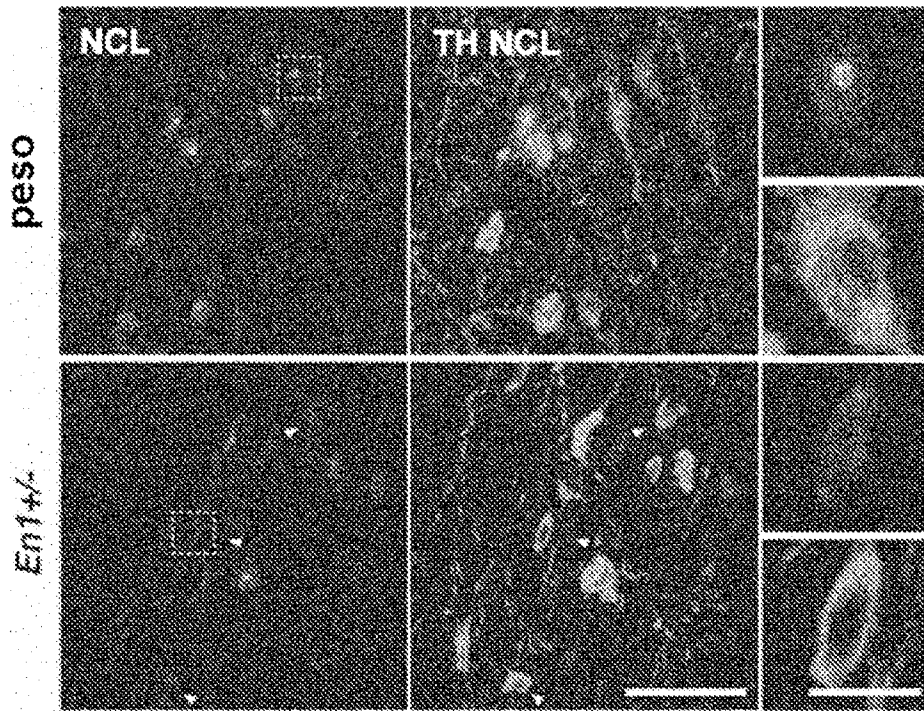


Fig. 2H

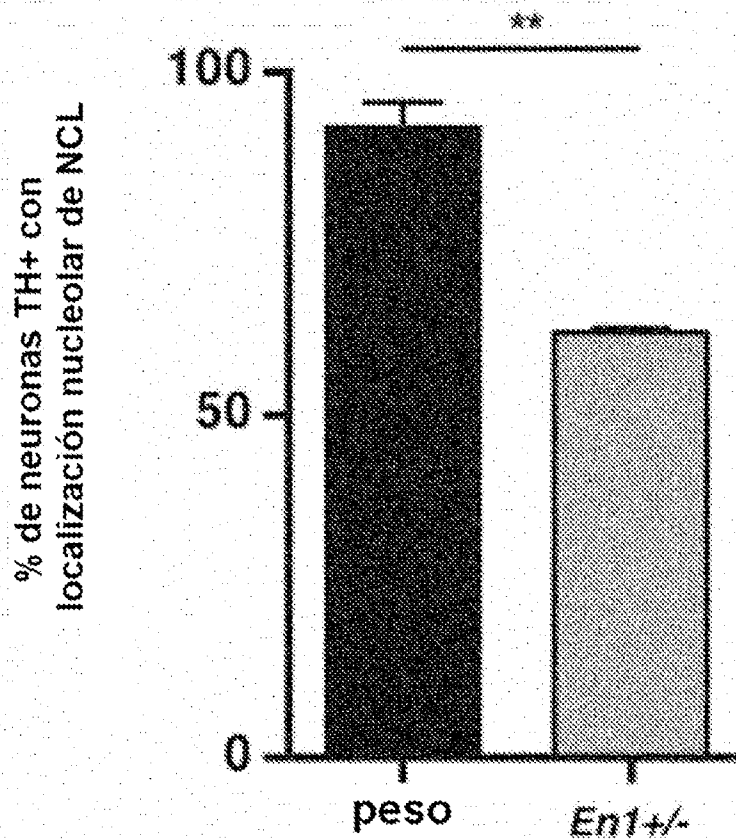


Fig. 2H

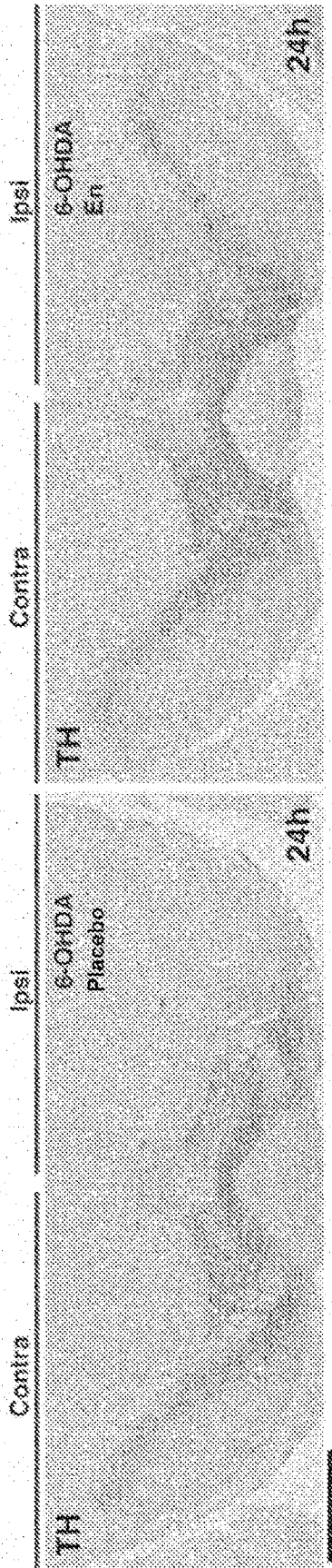


Fig. 3A

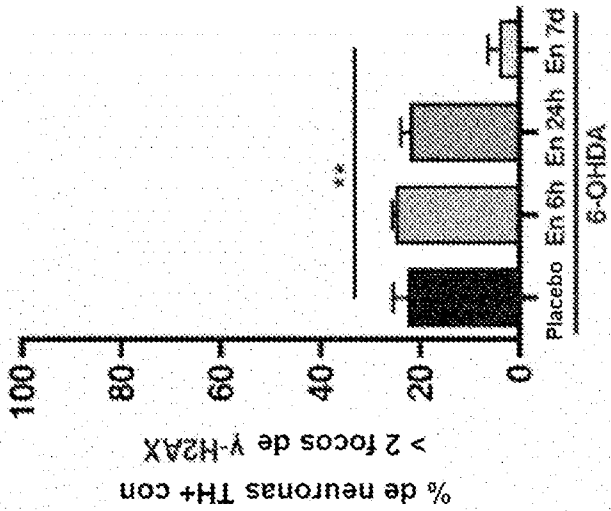
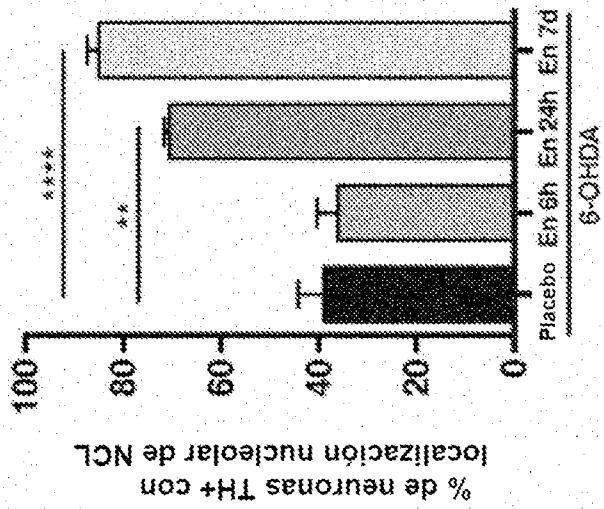
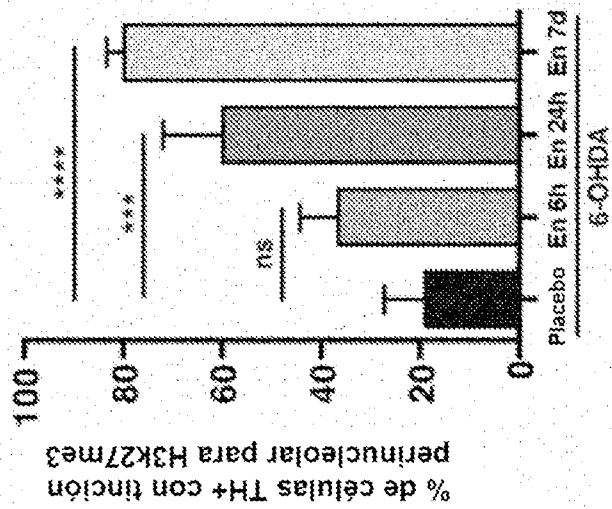


Fig. 3D

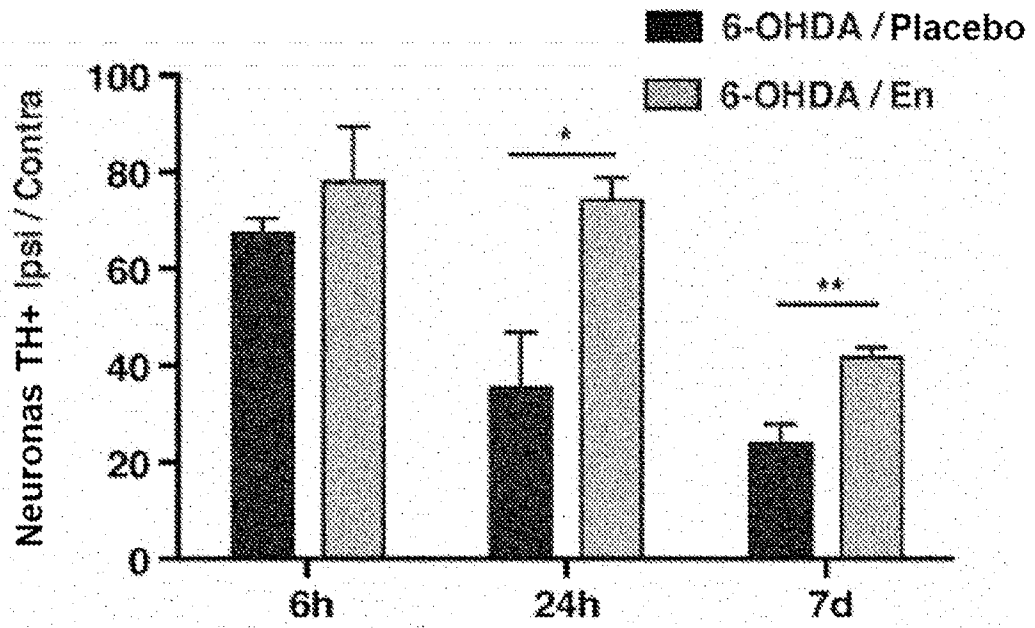


Fig. 3B

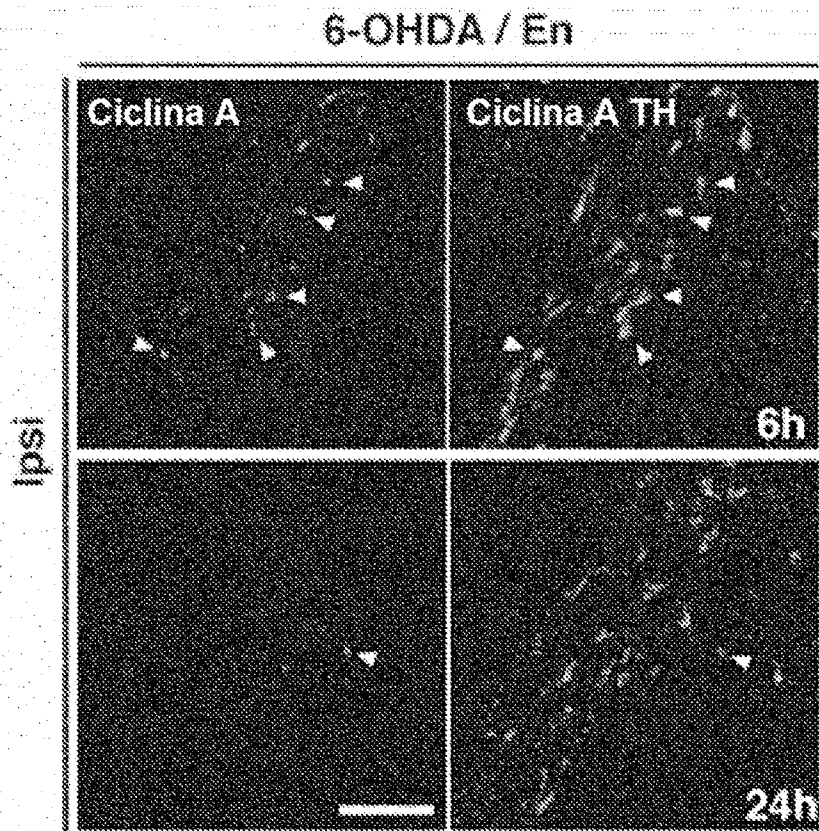
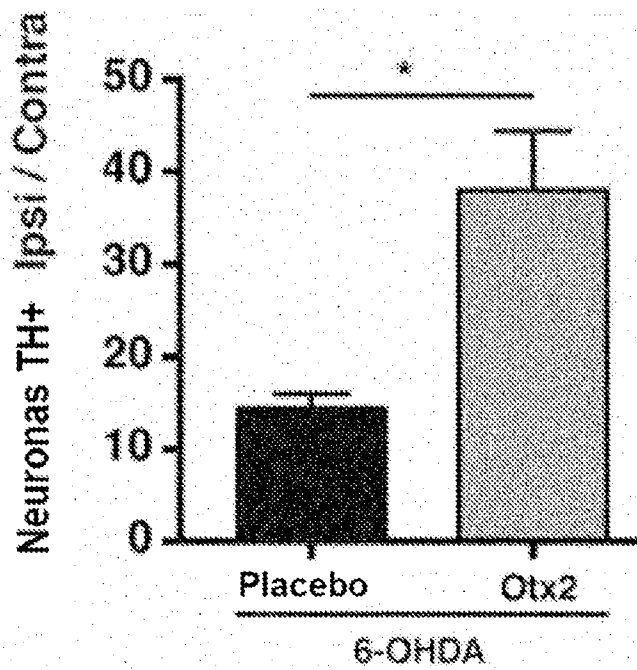
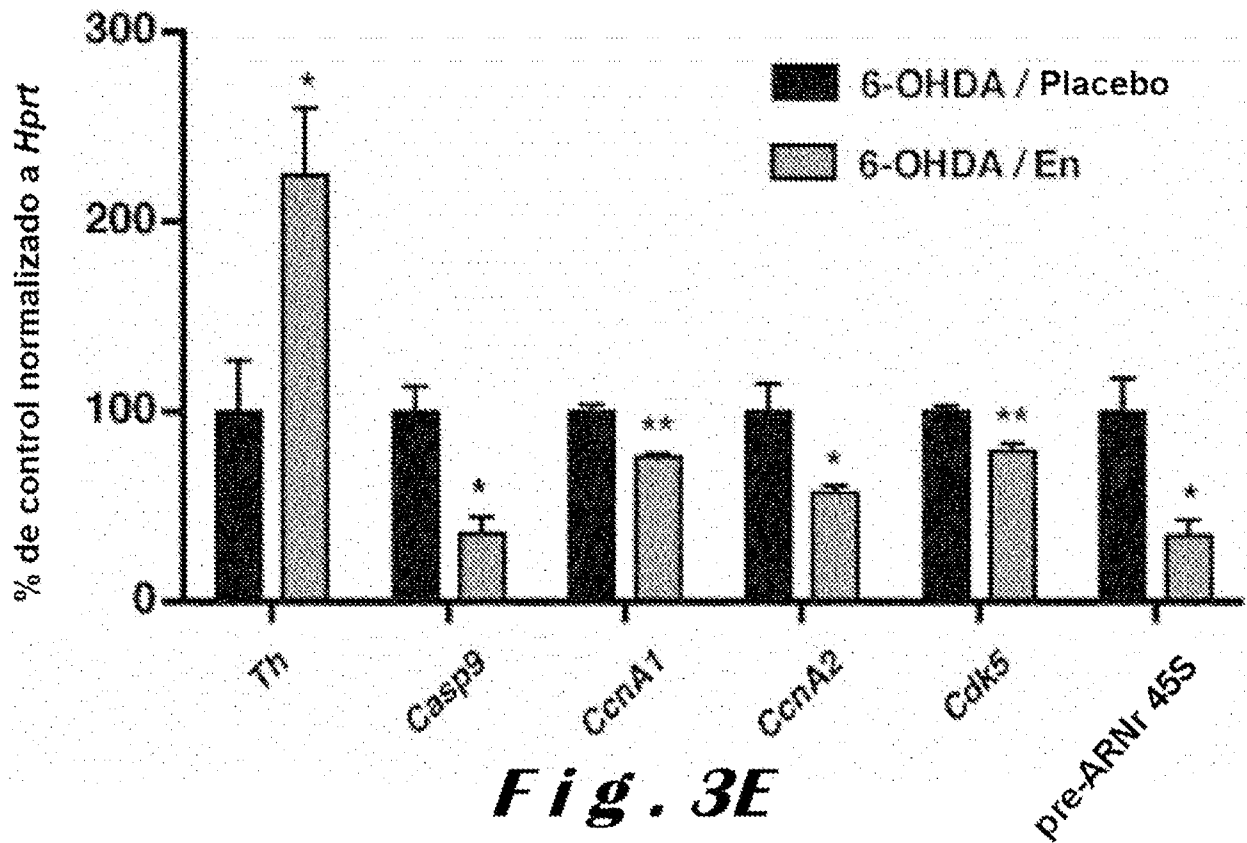


Fig. 3C



Factor de cambio (6-OHDA/En frente a 6-OHDA)

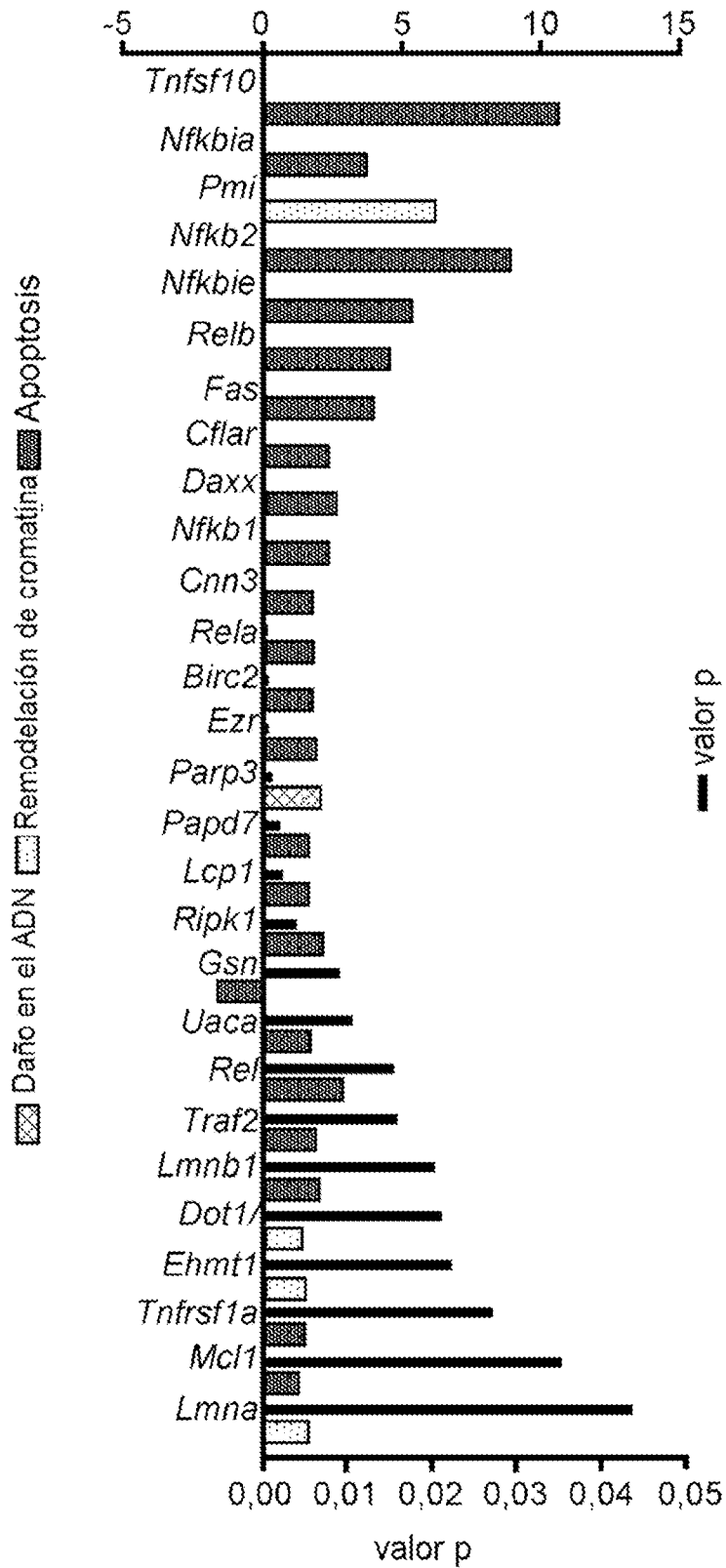


Fig. 4A

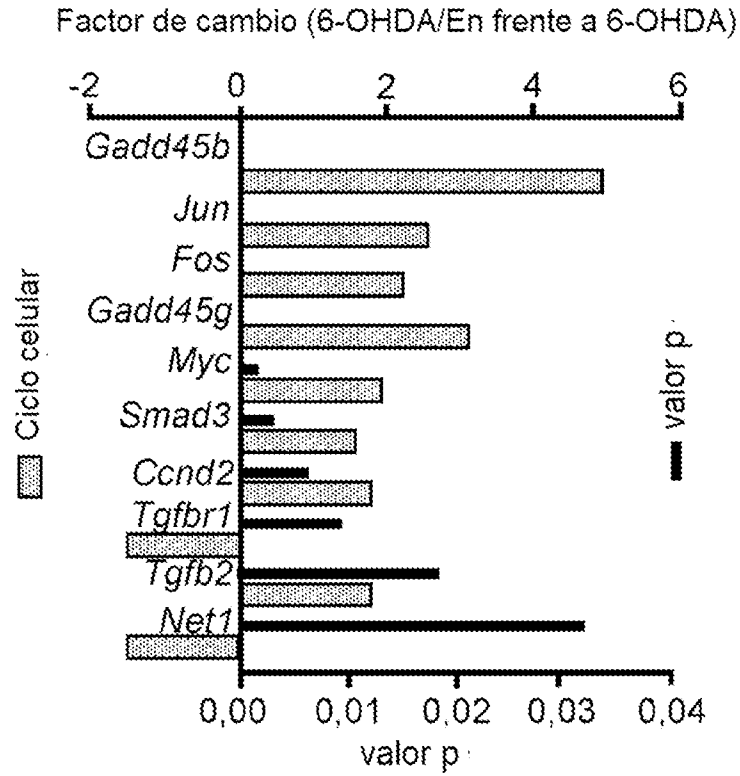


Fig. 4B

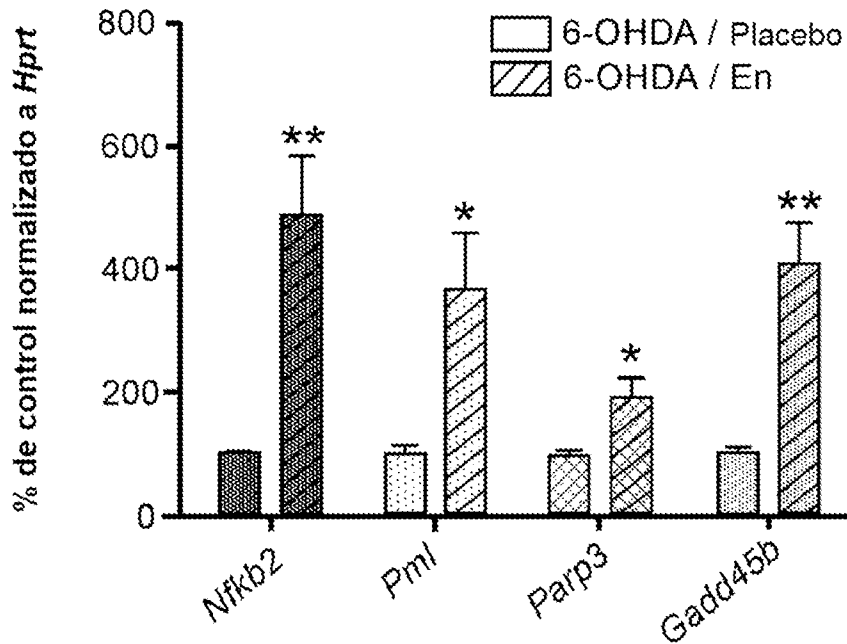


Fig. 4C

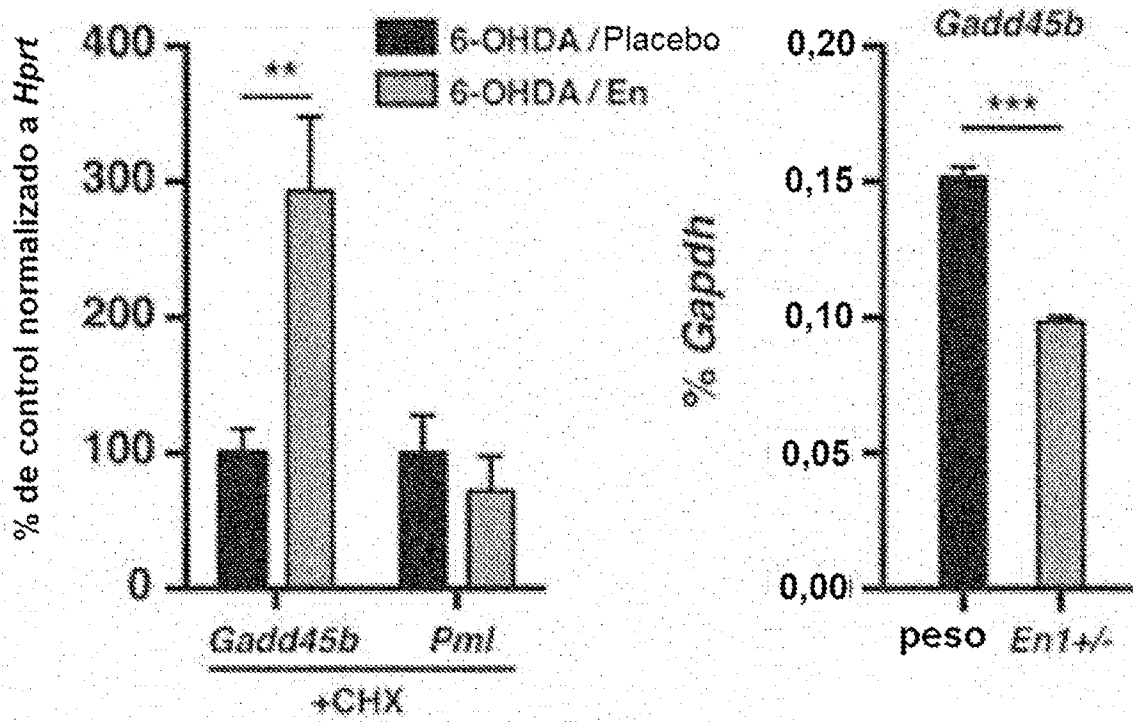


Fig. 4D

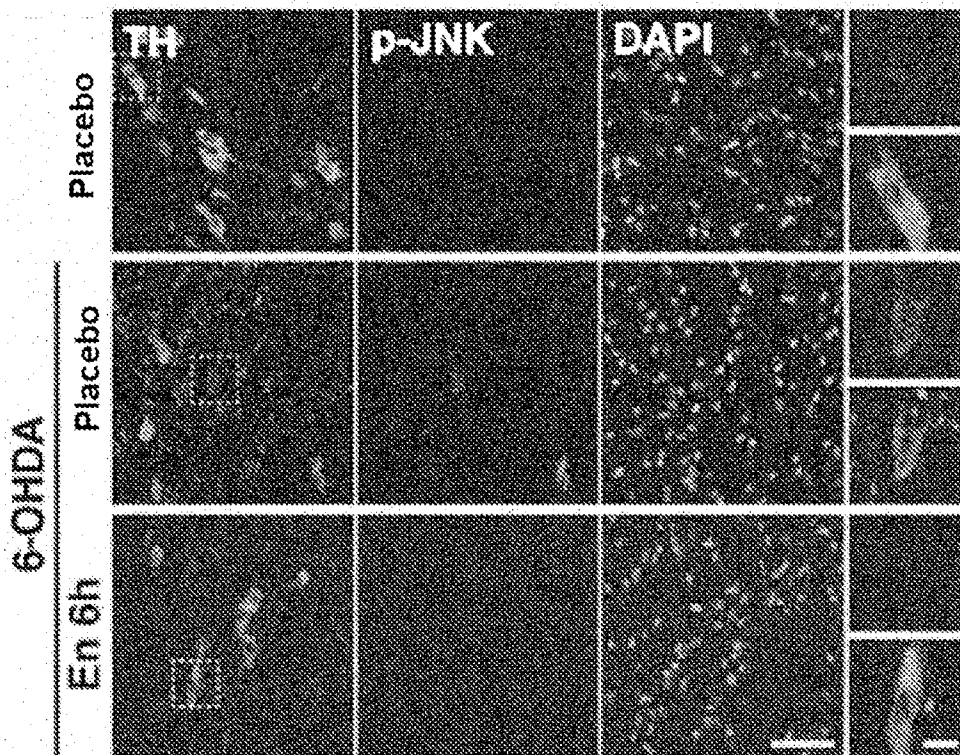


Fig. 4E

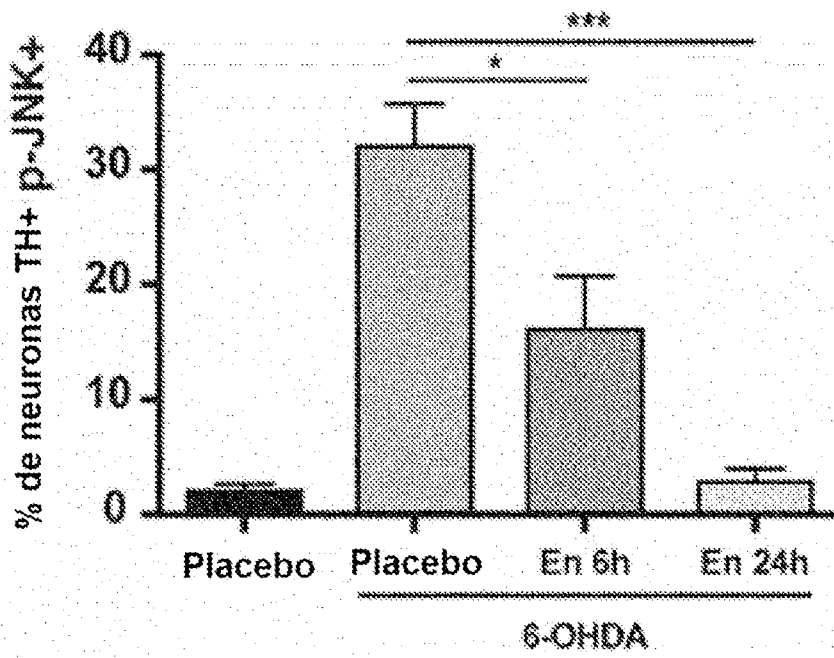


Fig. 4F

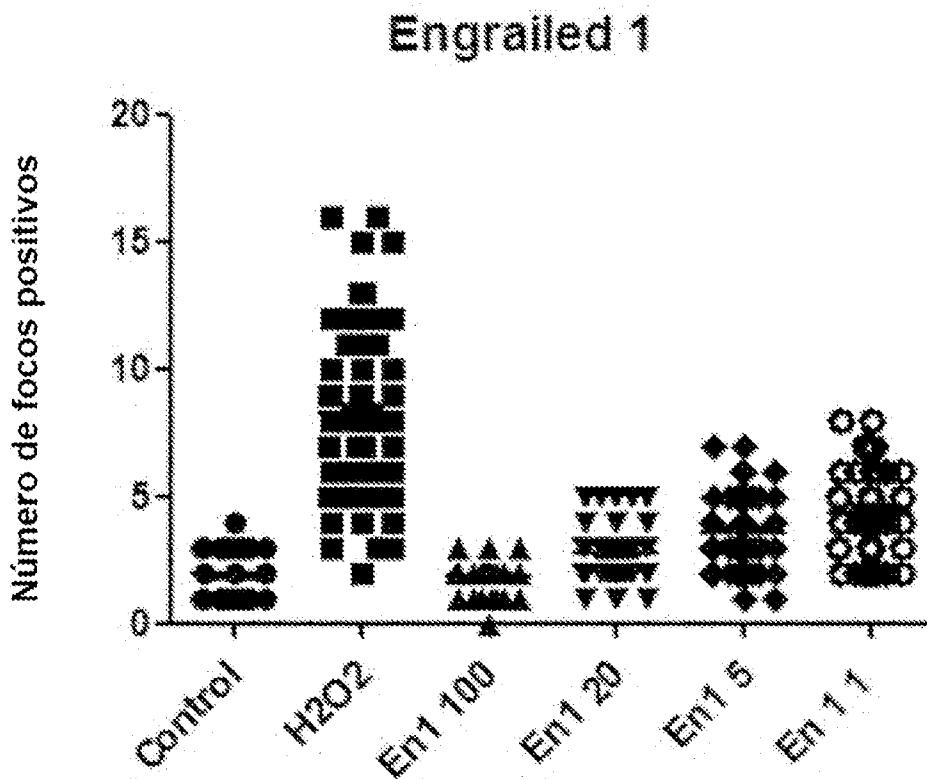
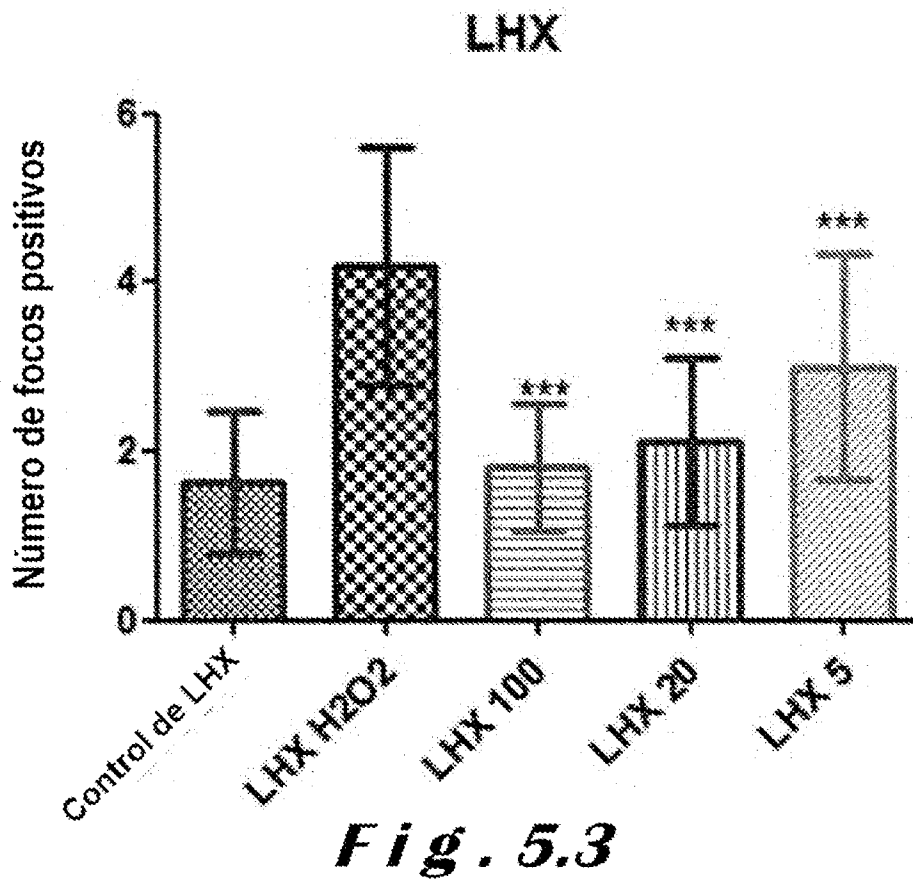
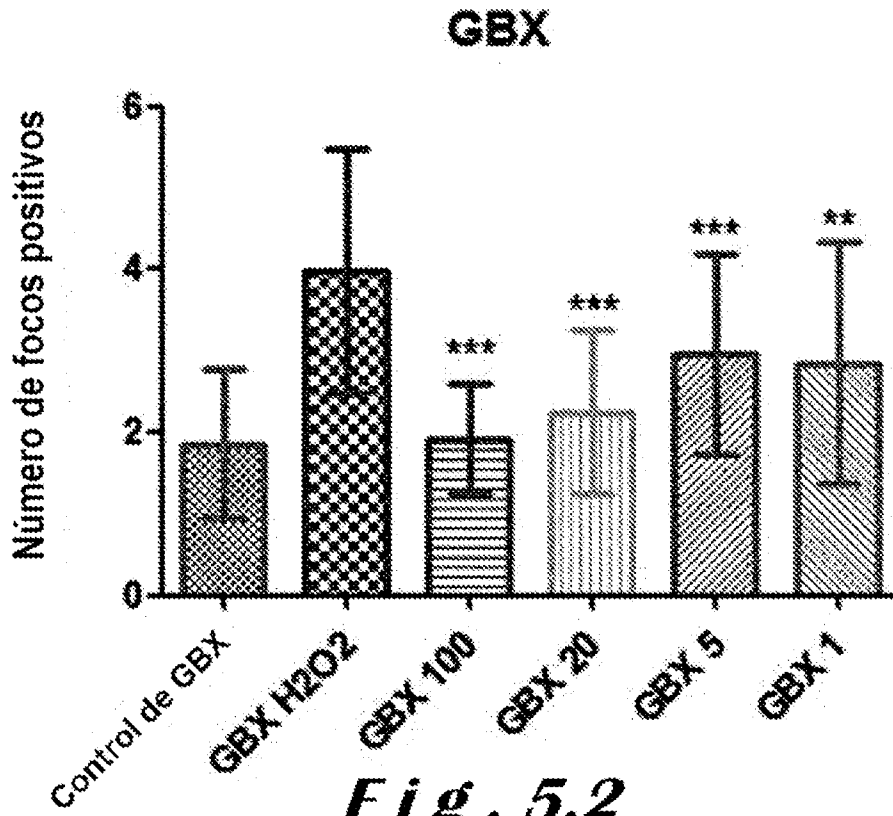


Fig. 5.1





Secuenciación de ARN	Lecturas (en millones)
wt	43
<i>En1</i> ^{+/-}	55.9

Genes expresados diferencialmente	
Regulado positivo en <i>En1</i> ^{+/-}	588
Regulado negativo en <i>En1</i> ^{+/-}	401

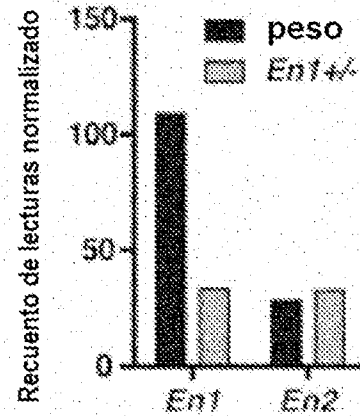


Fig. S1A

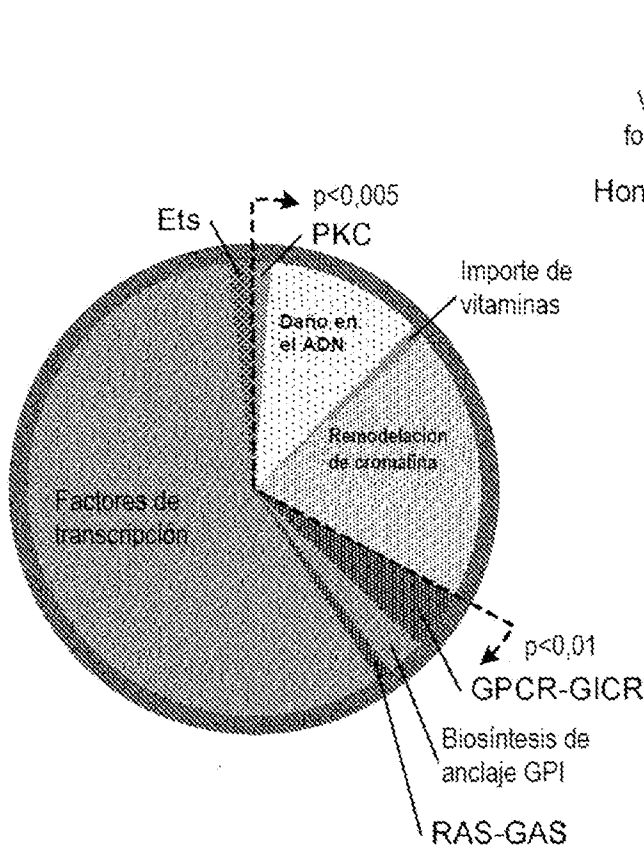


Fig. S1B

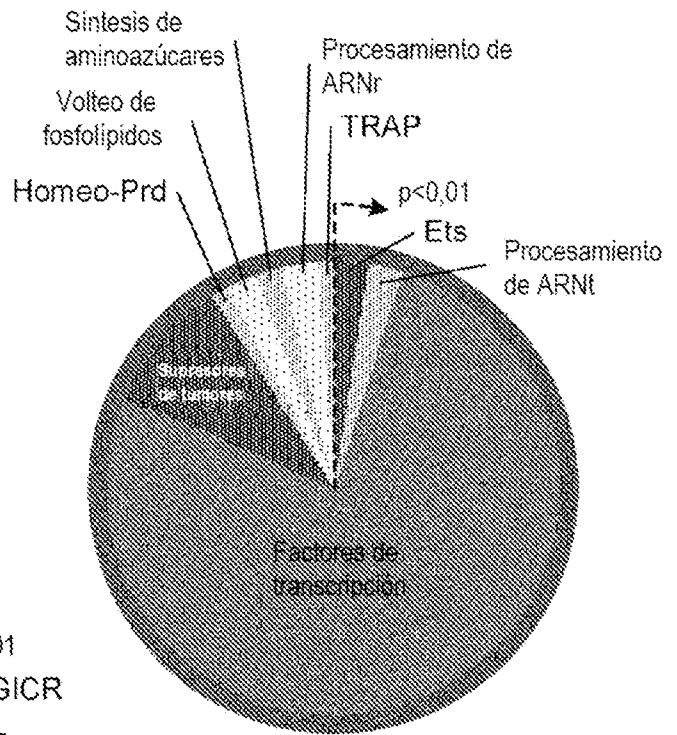


Fig. S1C

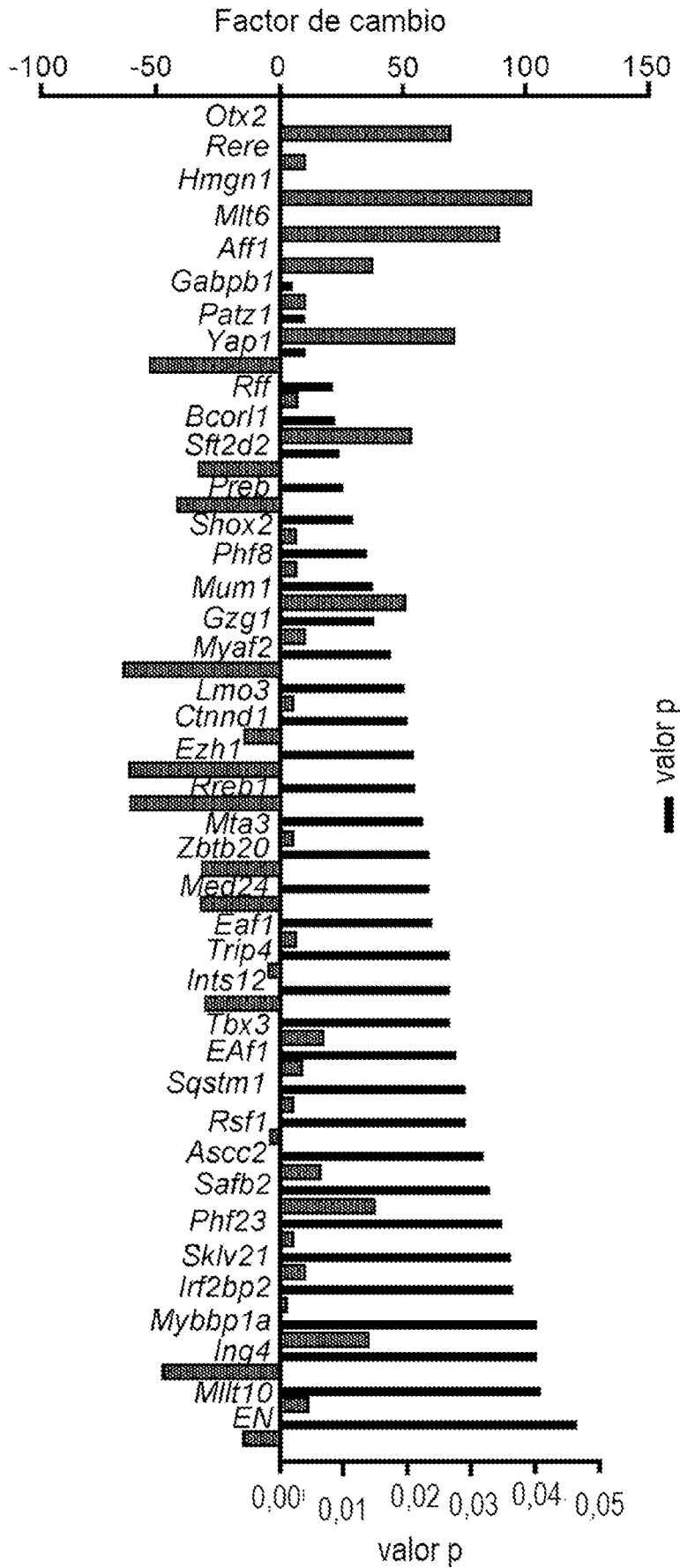


Fig. S1D

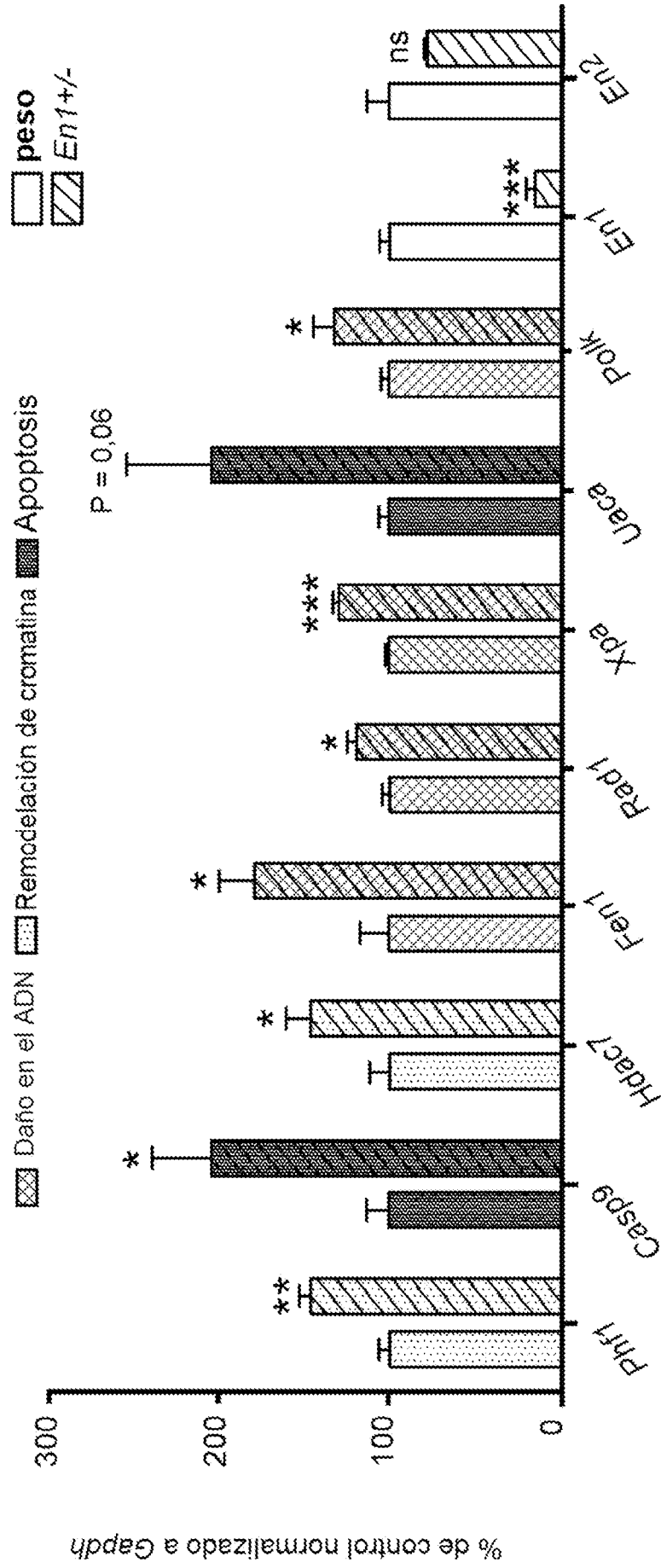
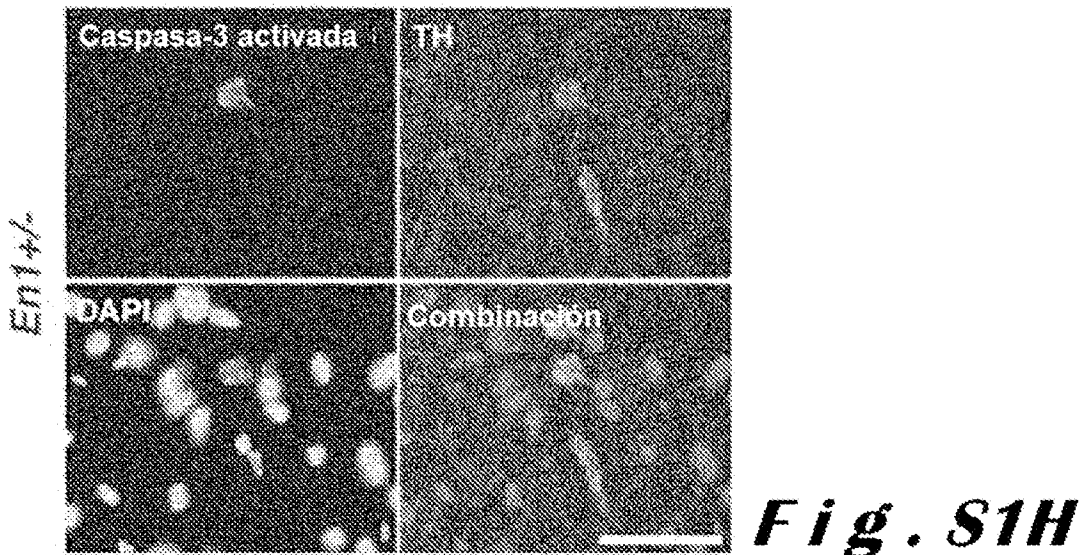
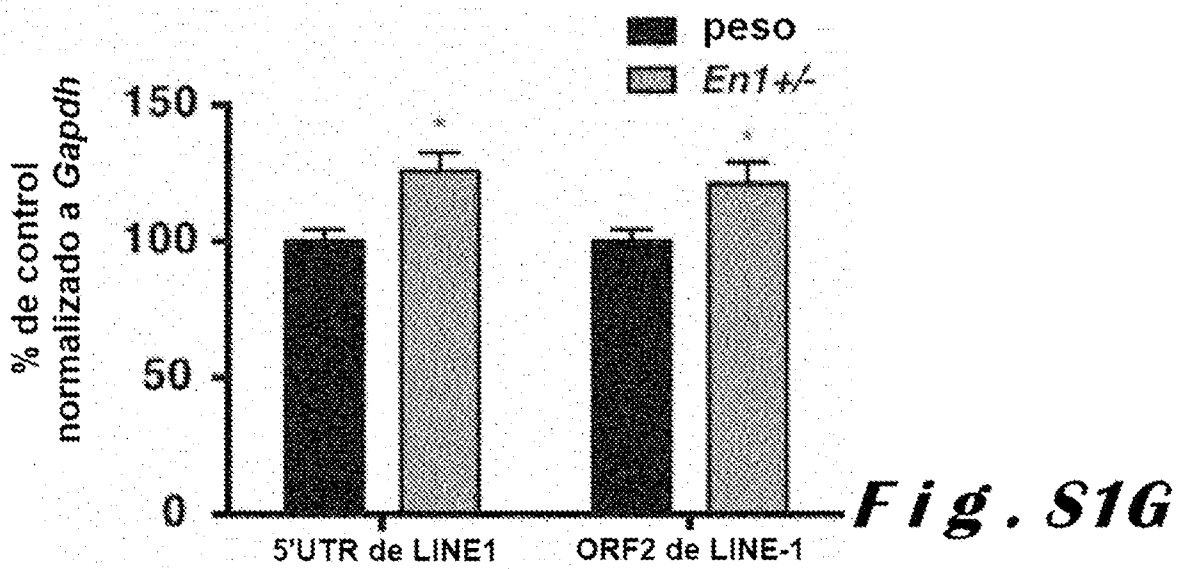
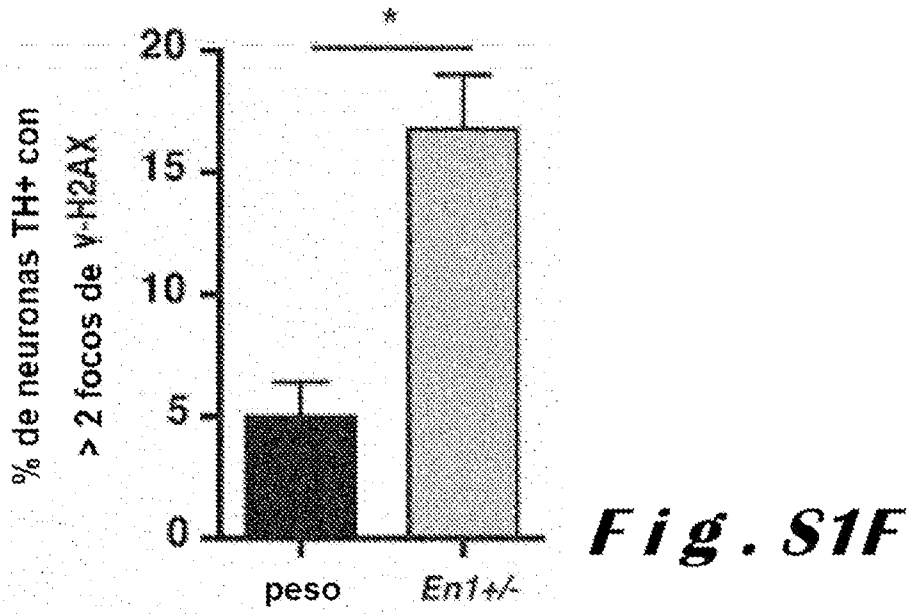


Fig. S1E



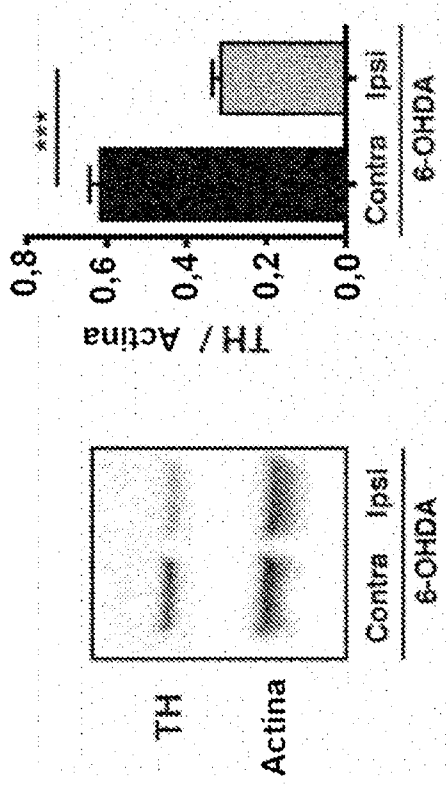


Fig. S2A

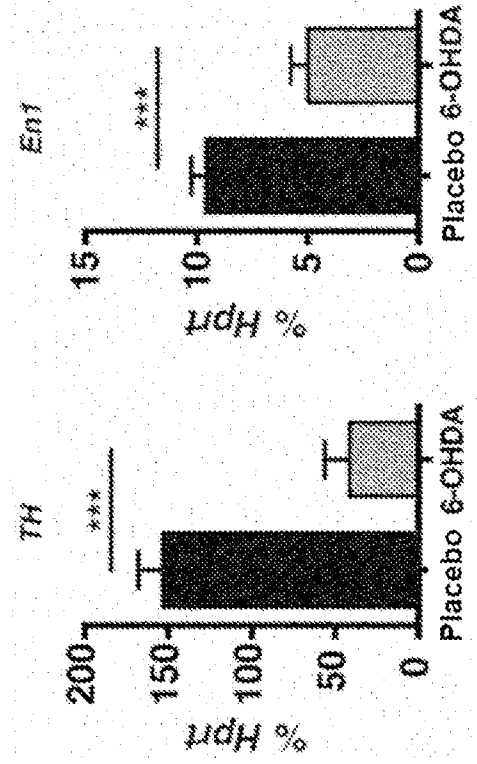


Fig. S2B

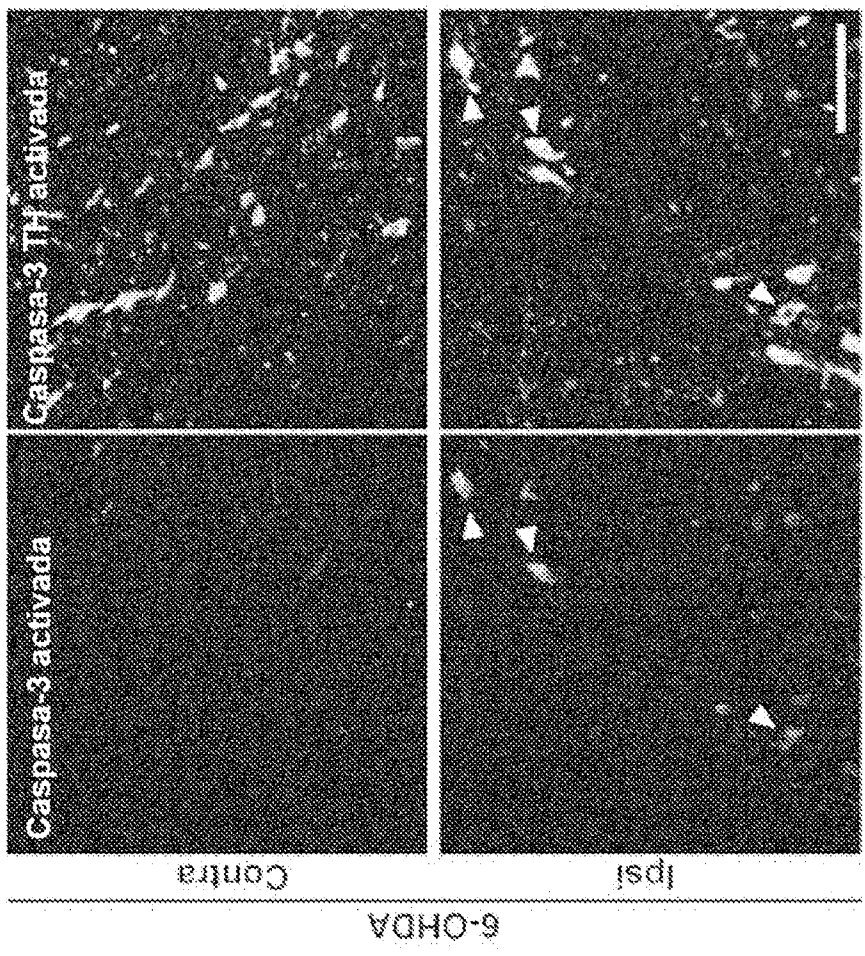


Fig. S2C

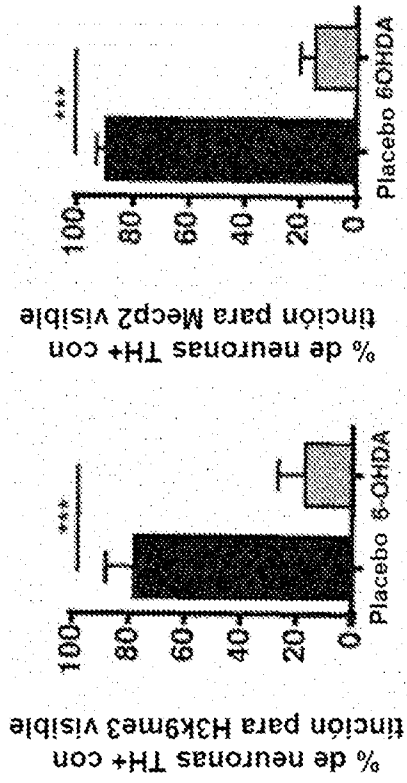


Fig. S2E

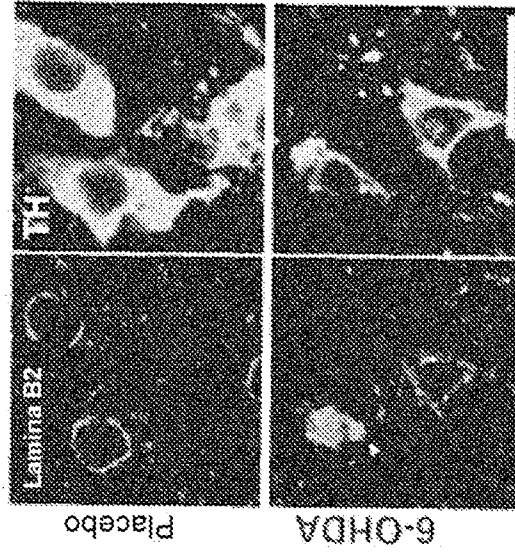


Fig. S2F

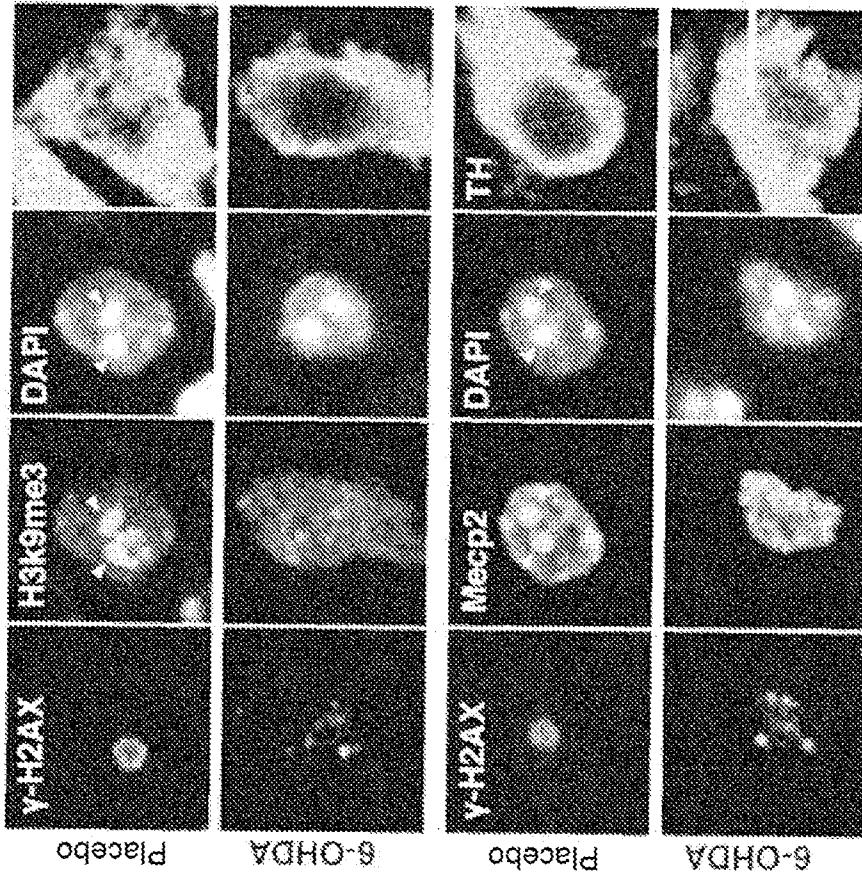


Fig. S2D

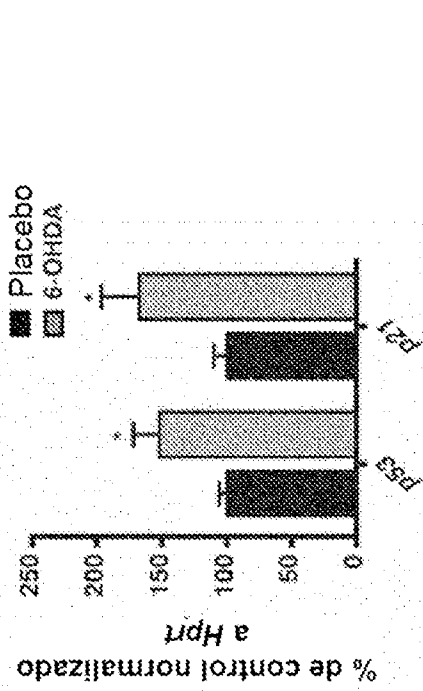


Fig. S2H

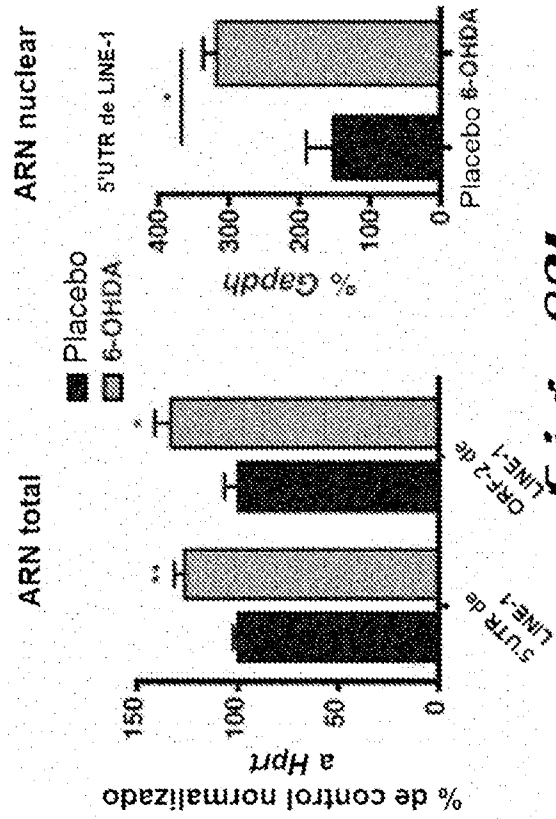


Fig. S2I

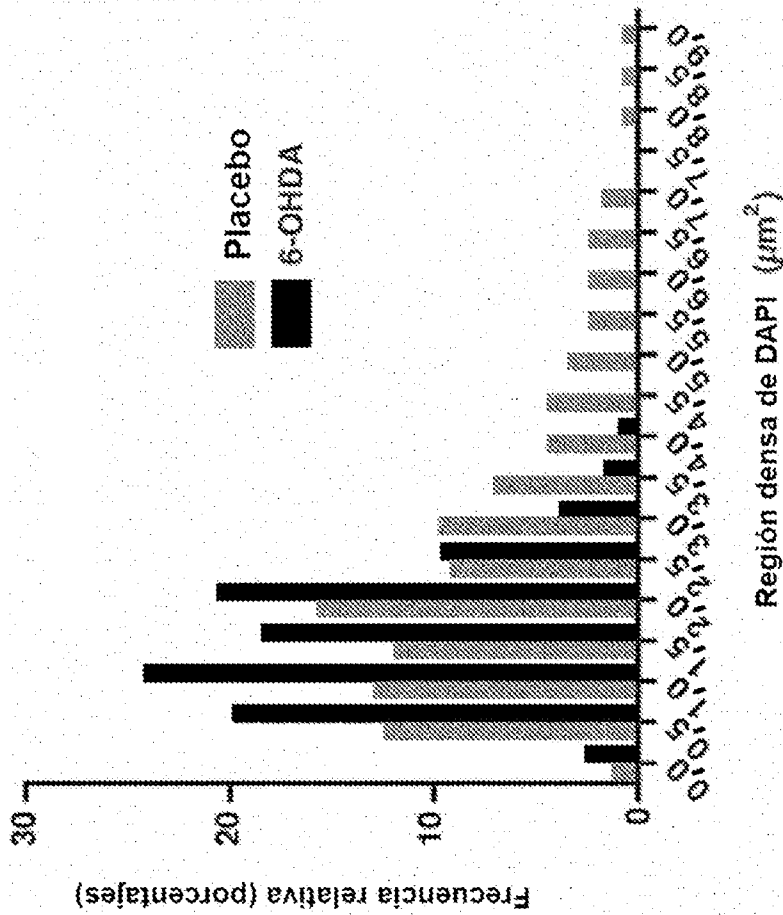


Fig. S2G

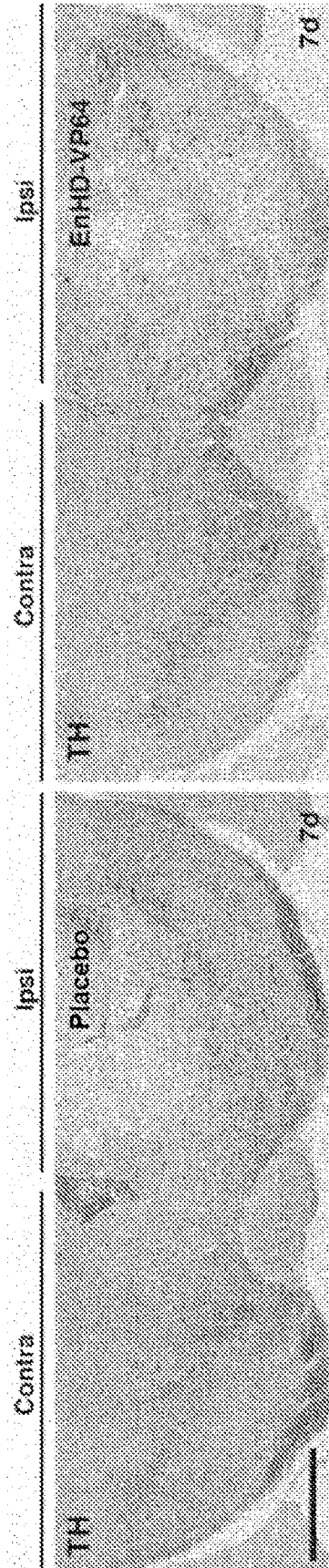


Fig. S3A

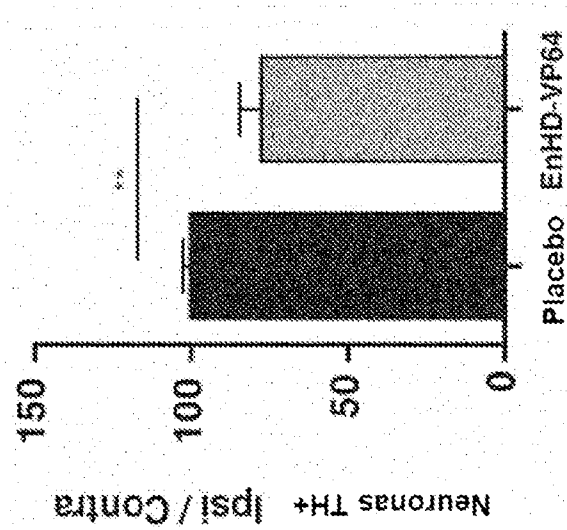


Fig. S3B

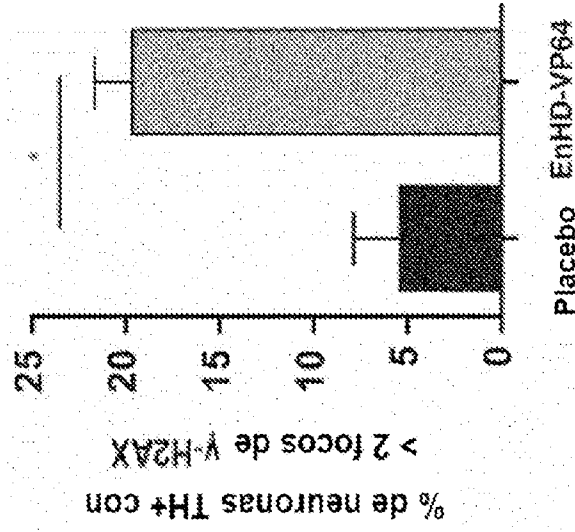


Fig. S3C

Organización y biogénesis del núcleo

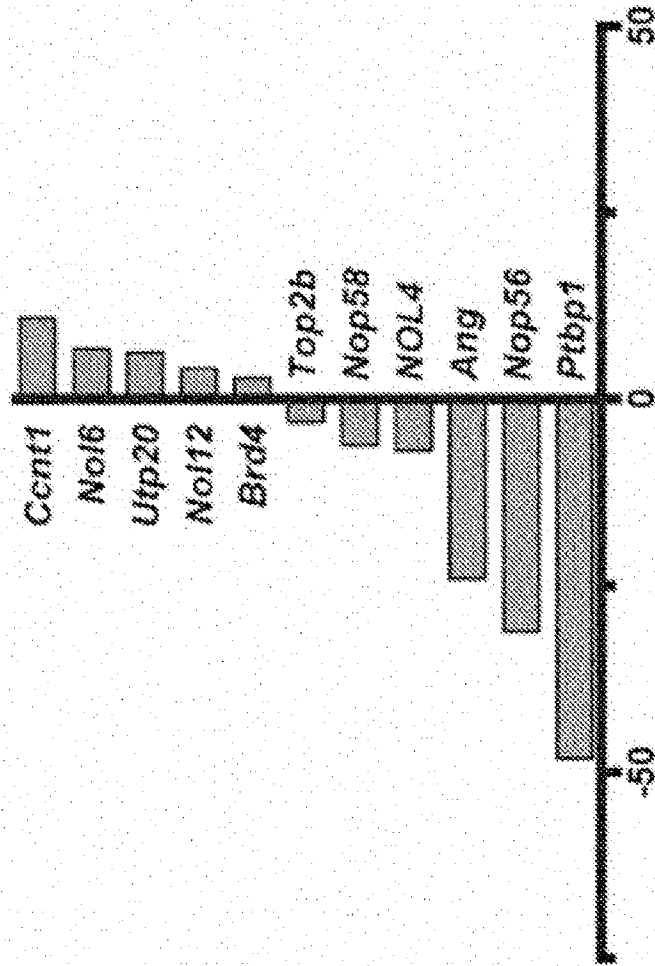


Fig. S3D

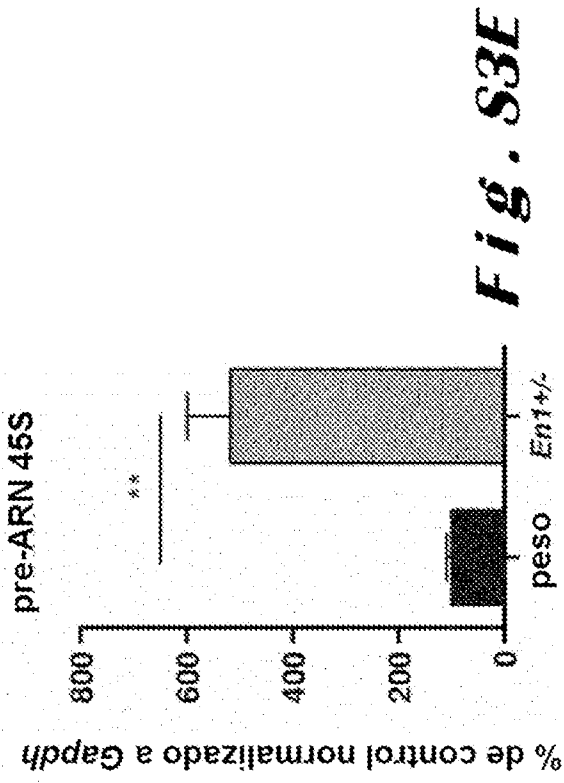


Fig. S3E

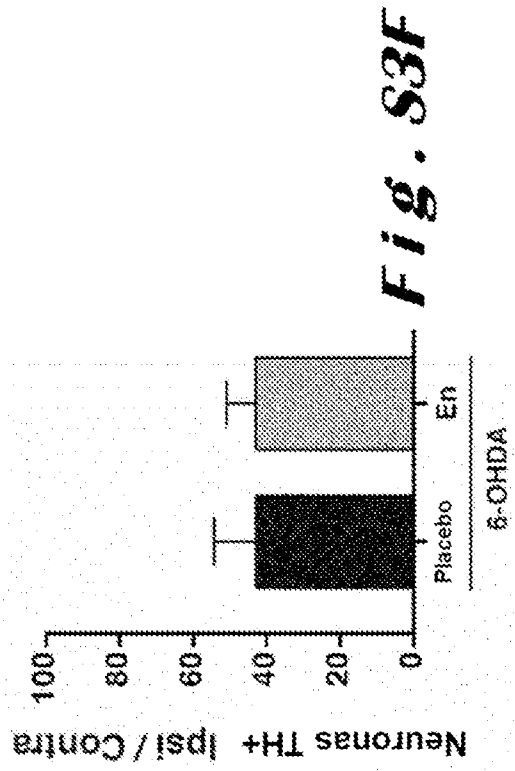


Fig. S3F

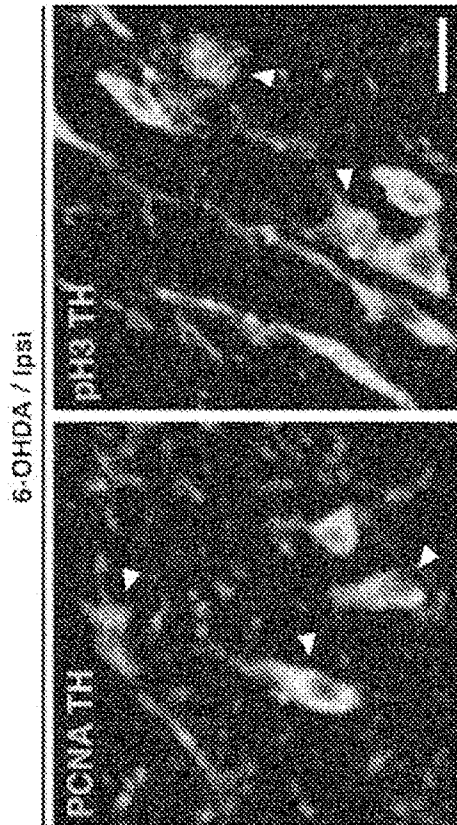


Fig. S4A

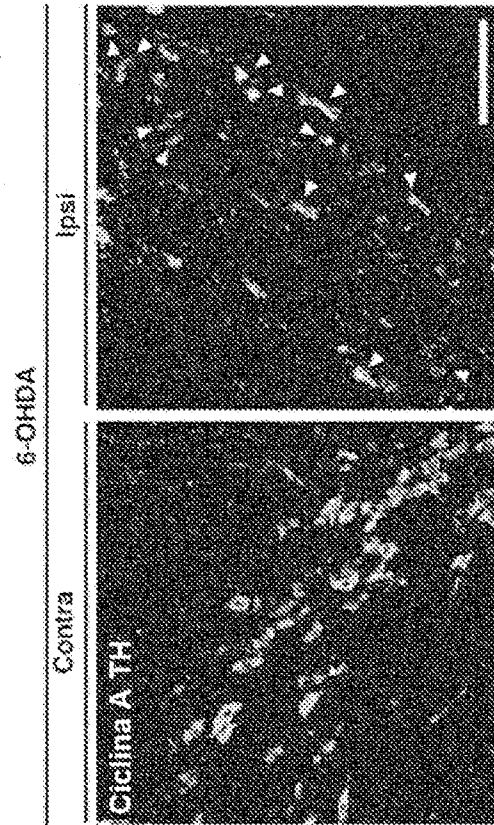


Fig. S4B

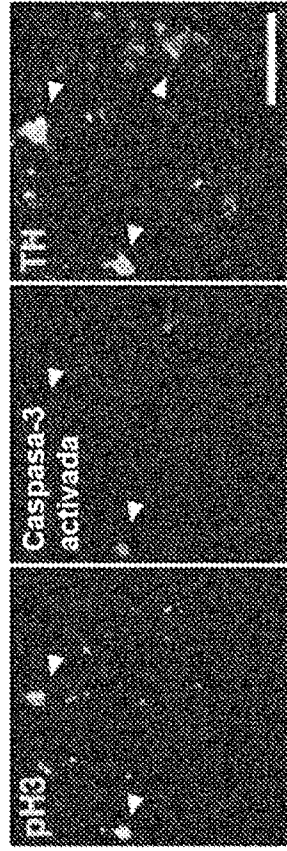


Fig. S4C

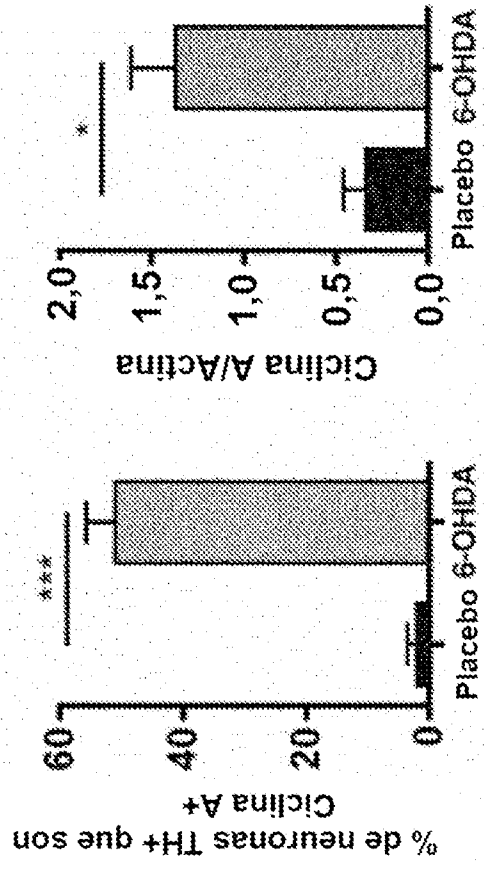


Fig. S4D

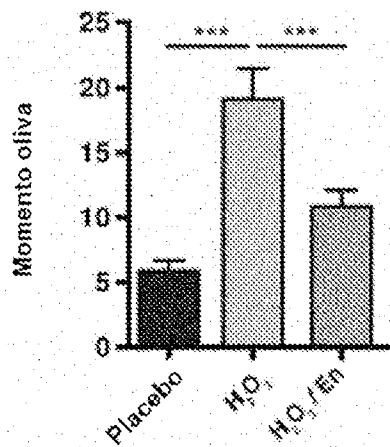
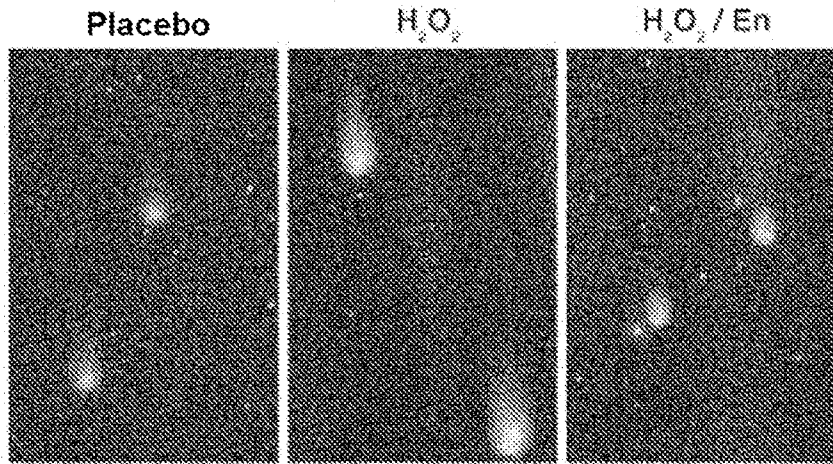
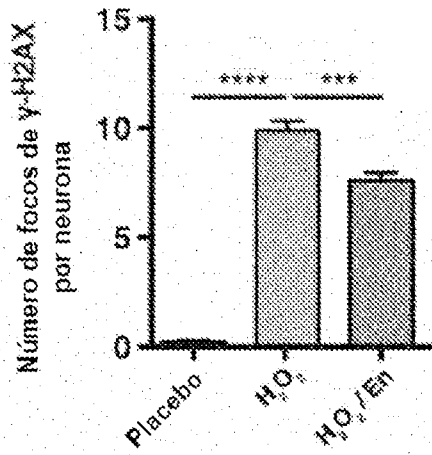
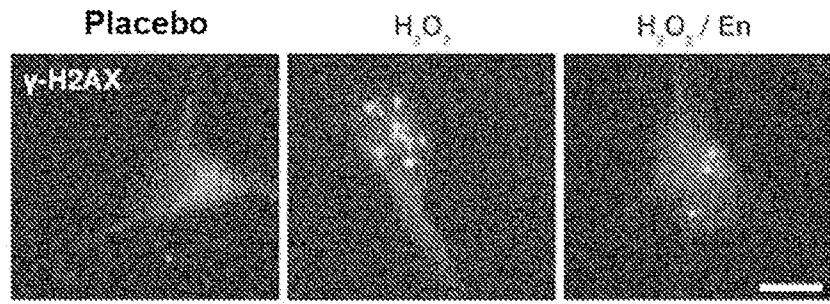


Fig. S4E

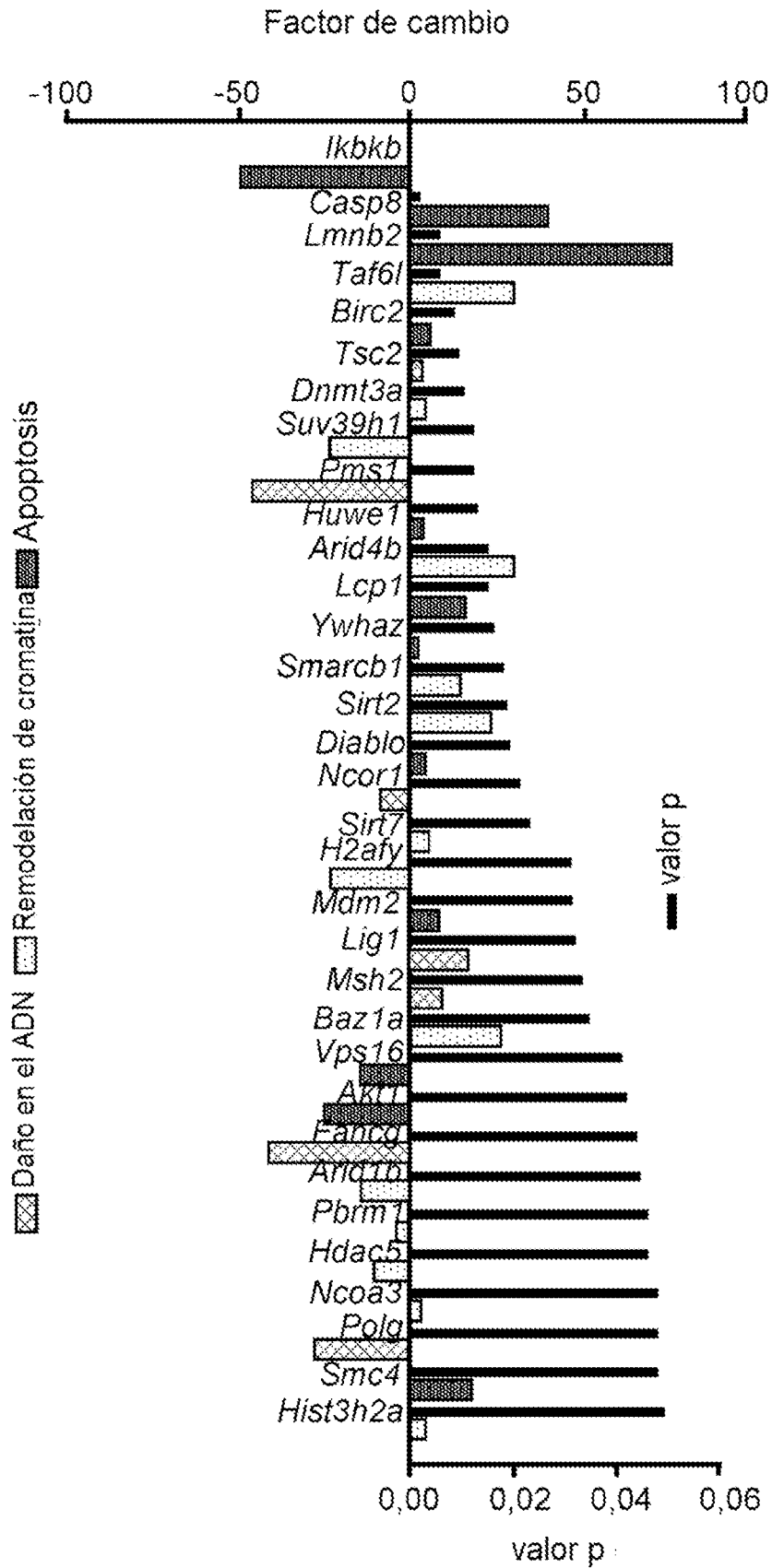


Fig. S4F