

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 028**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61P 25/14** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2011 PCT/US2011/063997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12078906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2011 E 11847833 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2705151**

54 Título: **Reducción selectiva de la actividad perjudicial de genes que contienen repeticiones de trinucleótidos prolongadas**

30 Prioridad:

**10.12.2010 TW 099143336**

**18.05.2011 US 201113110494**

**01.08.2011 US 201161513970 P**

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

**19.06.2018**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND  
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)  
Office of the General Counsel, Building 170, 3rd  
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386  
Stanford, CA 94305-2038, US y  
NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHENG, TZU-HAO;  
LIU, CHIA-RUNG;  
WANG, TZU-HAN y  
COHEN, STANLEY N.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 673 028 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

Reducción selectiva de la actividad perjudicial de genes que contienen repeticiones de trinucleótidos prolongadas

**Antecedentes**

5 Las enfermedades de poliglutamina (PoliQ) son una clase de enfermedades que consisten en nueve trastornos genéticamente diferentes. Incluyen la enfermedad de Huntington (EH), atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA), SBMA y ataxia espinocerebelosa 1, 2, 3, 6, 7 y 17 (SCA1/2/3/6/7/17). Debido a que estas enfermedades están provocadas por la expansión de repeticiones de CAG traducidas que codifican glutaminas, también se conocen como enfermedades de repeticiones de CAG.

10 Una característica fisiológica común compartida por estas enfermedades genéticamente diferentes es que se descubre que todos los pacientes que padecen las enfermedades tienen depósitos proteicos en el cerebro. Aunque en cada una de estas enfermedades el depósito proteico está asociado a una proteína diferente, todas las proteínas contienen un tramo expandido de glutaminas. Hasta la fecha, este tramo expandido de secuencia de poliQ en las proteínas relacionadas con las enfermedades es la única mutación genética conocida implicada en todas las enfermedades de poliQ.

15 Existen enfermedades de repeticiones de trinucleótidos adicionales en las que la expansión de la repetición está localizada dentro de regiones del gen que no codifican una proteína. Los ejemplos de tales repeticiones incluyen repeticiones de trinucleótidos CAG o CTG. El ARN codificado por los genes que contienen tales repeticiones puede formar focos que localizan o regulan de manera incorrecta proteínas de unión al ARN, lo que conduce a efectos perjudiciales.

20 De las enfermedades de poliQ, la EH es quizás la mejor conocida por el público general, debido a su efecto devastador sobre los pacientes. La enfermedad está asociada a una muerte selectiva de células neuronales que se da principalmente en la corteza y el cuerpo estriado. Es una enfermedad mortal y cruel que priva progresivamente a los pacientes de movimiento, conocimiento, y personalidad, y genera un significativo daño económico y emocional a los pacientes y sus familias. La frecuencia de EH es especialmente prevalente en personas de procedencia europea occidental (alrededor de 1 de 20.000). Por desgracia, en la actualidad no existe una cura para esta terrible enfermedad.

25 En la actualidad, los tratamientos disponibles para EH se limitan principalmente a tratar los síntomas macroscópicos. Por ejemplo, uno de los compuestos más recientes aprobados por la FDA, tetrabenazina, es un fármaco para reducir los movimientos hiperkinéticos en los pacientes de EH. La tetrabenazina es un inhibidor del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) que estimula la degradación temprana de neurotransmisores. Así, el fármaco trata simplemente el síntoma, no el origen de la enfermedad. Otros fármacos usados actualmente para tratar EH incluyen los neurolépticos y las benzodiacepinas. Ningún tratamiento conocido en la actualidad está intentando abordar la causa originaria de EH.

30 Como se mencionó anteriormente, la causa originaria de EH es la expansión anormal de repeticiones de CAG en un gen en las células del SNC, de manera específica el gen Htt, que codifica la proteína huntingtina (Htt). En una persona normal, existen alrededor de 8 - 25 repeticiones constitutivas de la secuencia de nucleótidos CAG en el gen Htt. En un paciente de EH, el número de repeticiones de CAG se expande hasta 36 o más. Debido a que este tipo de mutación es dominante, solamente es necesario que una persona herede una copia del gen mutado de huntingtina para que desarrolle EH.

35 Los estudios recientes con modelos celulares y animales han proporcionado pruebas de que los agregados formados por la Htt mutante desempeñan un papel crucial en la progresión de EH. Se ha observado que las proteínas Htt mutantes pueden dar lugar a fragmentos más cortos de partes de la expansión de poliQ cuando se someten a escisiones proteolíticas. Si existen demasiadas copias de glutamina en la Htt mutante, la naturaleza polar de la glutamina conducirá a interacciones indeseables con otras proteínas. En particular, las Htt mutantes con demasiadas copias de glutaminas formarán enlaces de hidrógeno entre sí y se agregarán, en vez de plegarse hasta formar proteínas funcionales. A lo largo del tiempo, los agregados proteicos acumulados dañarán las células neuronales, lo que conducirá a la muerte celular y a un déficit neurológico en el paciente. El efecto dañino de los agregados proteicos se ha corroborado mediante experimentos que muestran que los reactivos químicos capaces de inhibir la formación de agregados proteicos pueden aumentar la supervivencia de las células y mejorar la patología de EH en un modelo de ratón. Sin embargo, a pesar de tales pruebas, algunos científicos han argumentado que los agregados visibles representan una respuesta que las células usan para acumular proteínas tóxicas que contienen regiones de poliQ prolongadas.

40 En la técnica anterior se han descrito varias aproximaciones para abordar las enfermedades asociadas a genes que tienen dominios de repeticiones de trinucleótidos prolongadas. Sánchez *et al.* (NATURE, vol. 421, nº 6921, 23 de enero de 2003 (23-01-2003), páginas 373-379) describe la reducción selectiva de la actividad perjudicial en una célula de un gen que comprende un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes (huntingtina) mediante el uso de rojo Congo.

Los documentos WO2005/027980, US2008/176812, Difiglia *et al.* (PNAS, vol. 104, nº 43, 23 de octubre de 2007 (23-10-2007), páginas 17204-17209), y Wang *et al.* (NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 53, nº 3, 10 de agosto de 2005 (10-08-2005), páginas 241-249) describen un siARN que selecciona como objetivo la huntingtina mutante con una región de repeticiones de trinucleótidos expandidas para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

5 Furling *et al.* (GENE THERAPY, vol. 10, nº 9, 1 de mayo de 2003 (01-05-2003), páginas 795-802) muestra el restablecimiento de la función de DMPK mediante el uso de un vector que expresa un ARN inverso que selecciona como objetivo el dominio de repeticiones CTG/CUG prolongadas mutantes en DMPK.

Además, Apostol *et al.* (PNAS, vol. 100, nº 10, 13 de mayo de 2003 (13-05-2003), páginas 5950-5955) describe un método para analizar si un compuesto modula la actividad de una proteína codificada por un gen objetivo que comprende un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, mediante el uso de la formación de agregados proteicos en células PC12 de rata que expresan una proteína de fusión huntingtina variante-EGFP tras la inducción como indicador.

### Sumario

15 La presente invención proporciona un agente para el uso en la modificación de la progresión en un sujeto de una enfermedad que surge de un gen que contiene un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, en el que la administración al sujeto de una cantidad eficaz del agente reduce de manera selectiva una actividad transcripcional mediada por SPT4, para reducir de manera selectiva la actividad perjudicial del gen para modificar la progresión de la enfermedad en el sujeto. La invención incluye además un método para analizar si un compuesto de ensayo modula la actividad de una proteína codificada por un gen objetivo que comprende un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, y el método comprende:

20 cribar el compuesto con una célula que comprende un sistema productor de señales acoplado de forma operable a una proteína SPT4 para analizar si el compuesto modula de manera selectiva la actividad de la proteína SPT4 y modula la actividad de la proteína codificada por el gen objetivo.

25 Los métodos y las composiciones descritas en la presente memoria tienen utilidad en una diversidad de diferentes aplicaciones, que incluyen la prevención o el tratamiento de estados patológicos asociados a la presencia de genes que contienen repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, tales como la enfermedad de Huntington (EH).

### Breve descripción de las figuras

El archivo de esta patente contiene al menos un dibujo en color. La Oficina de Patentes y Marcas proporcionará copias de esta patente con dibujo(s) en color tras la solicitud y el pago de la tarifa necesaria.

30 Figura 1. La mutación de *SPT4* confiere una agregación disminuida de 97Q-Ade2

(A) Principio del ensayo del color de las colonias. La deficiencia de Ade2 conduce a la acumulación de AIR y confiere un cambio de color de blanco a rojo. (B) Diagrama de las construcciones de plásmidos que expresan Ade2, 25Q-Ade2, y 97Q-Ade2. Las proteínas de fusión contienen un epítipo FLAG N-terminal y se expresan bajo control del promotor *GAL1*. (C) Fenotipos del color de las colonias de células que expresan las construcciones indicadas. Tanto las células de tipo natural (W303-1A) como las isogénicas *hsp104Δ* poseen el alelo mutante *ade2-1*, y son rojas en medios con glucosa. (D) Resultados del ensayo de captura en filtro para detectar agregados de poliQ-Ade2. Los lisados se recogieron de las células como se muestra en (C) y se cargaron sobre una membrana de acetato de celulosa (CA), que capta solamente la proteína agregada. La retención de poliQ-Ade2 en la membrana se detecta mediante inmunotransferencia con el uso de un anticuerpo anti-FLAG. Se incluyó un ensayo de transferencia lineal mediante el uso de membranas de nitrocelulosa (NC) como control de carga. (E) Diagrama que muestra el sitio de inserción del módulo de transposón en el clon 23-44. (F) Fenotipos del color de las colonias de células que expresan 97Q-Ade2 en ausencia y presencia de Spt4. El plásmido 97Q-ADE2, junto con un vector vacío 415 o la construcción de expresión de Spt4 415-SPT4 se transformó en las células indicadas. *spt4Δ* y *hsp104Δ* derivaron de células de tipo natural (WT) mediante la delección de todo el marco de lectura abierto de los genes correspondientes. Las células se cultivaron en un medio con galactosa como única fuente de carbono. (G) Análisis de la agregación de 97Q-Ade2 en células mutantes *spt4*. Se cargaron extractos proteicos comparables de células como se describió en (F) sobre membranas de CA, y se inmunotransfirieron con un anticuerpo anti-FLAG. Se examinó la  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -Tub) mediante un ensayo de transferencia lineal (membrana de NC) y sirvió como control de carga. Véase también la Figura 8.

50 Figura 2. Spt4 regula de manera selectiva la expresión y la agregación de las proteínas que contienen repeticiones de poliQ expandidas

(A) Fenotipos del color de las colonias de células que expresan 97Q-Ade2 o 25Q-Ade2. (B) Análisis de la expresión y agregación de las proteínas 97Q- y 25Q-Ade2 celulares. Se sometió a inmunotransferencia a una membrana de NC de la transferencia lineal con un anticuerpo anti-FLAG para determinar los niveles de proteína poliQ-Ade2. La  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -Tub) sirvió como control de carga. La agregación de poliQ-Ade2 se estudió mediante un ensayo de captura en filtro (membrana de CA). (C) La expresión del mRNA que codifica 97Q- o 25Q-Ade2 se examinó mediante transferencia de Northern. Se detectaron los mARNs mediante una sonda que reconocía la secuencia

codificante de poliQ. Tras la normalización con *SCR1*, la abundancia del mRNA se ajustó como un 100% en las células WT que expresaban 97Q-ADE2. Como comparación, se muestra la abundancia relativa del mRNA en cada tipo de célula indicada. (D) Paneles superiores, análisis de la agregación de eGFP mediada por poliQ en células de tipo natural y *spt4Δ*. Las células que albergaban la construcción de plásmido 29Q- o 65Q-eGFP se examinaron mediante microscopía de fluorescencia tras la inducción génica a las 2, 4, y 8 hr. En cada momento, se examinaron 200 células y el aspecto de los focos se definió como indicador de la agregación de eGFP. Se define que las células que carecían de focos mostraban una "Tinción difusa". Panel inferior, el número de células que tenían agregados de 65Q-eGFP se ilustra en función del tiempo. Los datos son la media de cuatro experimentos independientes, y la barra representa la desviación estándar. (E) Se analizó la expresión de proteínas 97Q-Ade2 y 25Q-Ade2 en células *thp2Δ* mediante un ensayo de transferencia lineal (NC). También se empleó un ensayo de captura en filtro (CA). *THP2* codifica una subunidad del complejo THO. (F) Fenotipos del color de las colonias de células *thp2Δ* que expresaban 97- o 25Q-Ade2. Véanse también las Figuras 9, 10, y 11.

Figura 3. Las células mutantes *spt4* muestran una transcripción de ARN polimerasa II alterada en un tramo largo de repeticiones de CAG

En células de tipo natural y *spt4Δ*, se determinó la cantidad de ARN polimerasa II en un gen en transcripción que contenía 29 o 99 repeticiones de CAG mediante inmunoprecipitación de cromatina. Paneles inferiores, se examinó el fragmento de ADN precipitado en posición 5' de las repeticiones de CAG mediante el uso del grupo de cebadores A, mientras los grupos de cebadores B y C se usaron para detectar el ADN en posición 3' de las repeticiones de CAG. Se incluyó el grupo de cebadores D específico para el promotor *TRP1* como control. Panel superior, la región de ADN amplificada mediante cada grupo de cebadores de PCR se indica en el diagrama del plásmido.

Figura 4. La co-agregación de proteínas que contienen poliQ cortas se atenúa por la deficiencia de *spt4*

(A) Fenotipos del color de las colonias de células que expresaban las construcciones indicadas. Se co-introdujo 29Q-ADE2-HA junto con las construcciones de plásmidos como se describen en la Figura 10 en las células. (B) Se analizó la expresión y agregación de poliQ-Ade2 mediante transferencia lineal (NC) y ensayo de captura en filtro (CA), respectivamente. Se usó un anticuerpo anti-FLAG para analizar mediante sonda 29Q-Ade2-HA, 29Q-Ade2, y 99Q-Ade2, mientras el anticuerpo anti-HA detectó solamente 29Q-Ade2-HA. (C) La expresión de los transcritos que codificaban proteínas poliQ-Ade2 se examinó mediante transferencia de Northern. Las posiciones de 99Q-ADE2 y 29Q-ADE2-HA se indican mediante flechas.

Figura 5. Supt4h regula la expresión, agregación, y toxicidad de 81Q-eGFP en células neuronales estriatales

(A) Izquierda, se monitorizaron células estriatales ST14A murinas transfectadas con la construcción de plásmido 7Q-eGFP o 81Q-eGFP junto con siARN de control (NC si) o Supt4h (Supt4h si) mediante microscopía de fluorescencia. Derecha, se muestran las imágenes de contraste de fases. Panel inferior, porcentaje de células que muestran focos de 81Q-eGFP en estas condiciones. Los valores mostrados son la media  $\pm$  DE para tres experimentos independientes. (B) Los cambios en la expresión de Supt4h tras la inactivación mediante siARN se analizaron mediante transferencia de Western. Para asegurar una eficacia de transfección comparable entre las muestras, se co-transfectó pRC-CMV-MnSOD y se determinó su expresión de proteínas. (C) Se analizó la expresión y agregación de poliQ-eGFP mediante transferencia lineal (NC) y ensayo de captura en filtro (CA), respectivamente. (D) La viabilidad de células ST14A que expresaban 7Q-eGFP o 81Q-eGFP se midió con y sin inactivación mediante siARN de Supt4h. Tras la transfección con la poliQ-eGFP indicada y siARN, las células se cultivaron en medios de cultivo que contenían una cantidad mínima (0,5%) de suero y se mantuvieron a 39 °C para inducir la diferenciación de las células neuronales. El número de células viables que expresaban 7Q-eGFP en presencia de siARN de control se ajustó a 1, y se ilustra la viabilidad celular relativa de otras muestras (\*, \*\*  $P < 0,05$  mediante una prueba *t* de Student).

Figura 6. La expresión de *Htt* mutante se inhibe de manera selectiva mediante la inhibición de Supt4h

(A) Se examinó la abundancia de mRNA de *Htt* mediante RT-PCR tras la inactivación mediante siARN de Supt4h en células estriatales que poseían alelos de *huntingtina* de tipo natural ( $Hdh^{Q7/Q7}$ ) o mutantes ( $Hdh^{Q111/Q111}$ ) homocigotos. *U6*, que es transcrito por la ARN polimerasa III, sirve como control de carga. Se incluyó *Tuba1a* para determinar el efecto de Supt4h sobre la transcripción dependiente de pol II de genes constitutivos. Véase también la Figura 12. (B) Se analizaron los cambios en la expresión de mRNA mediante la inactivación con siARN de Supt4h mediante qRT-PCR en tiempo real. Cada mRNA se normalizó con *U6*, y la abundancia de los transcritos en las células transfectadas con siARN de control se ajustó a 1. (C) Análisis de la expresión de proteínas en las células en presencia o ausencia de transfección con siARN de Supt4h. Se inmunotransfirieron cantidades iguales de extractos de proteínas totales para Htt, Supt4h, Tbp, y  $\alpha$ -Tubulina. Tbp, la proteína de unión a la caja TATA, se incluyó como elemento representativo de los genes que contienen repeticiones de CAG cortas. (D) Se transfectaron células estriatales con alelos de *Htt* heterocigotos ( $Hdh^{Q7/Q111}$ ) con siARN de Supt4h y se analizó la expresión de proteínas como se describió en (C). Las posiciones de  $Htt^{Q7}$  y  $Htt^{Q111}$  se indican mediante flechas.

Figura 7. Modelo que representa el efecto y la consecuencia de la inhibición de Spt4 (Supt4h) sobre la expresión de genes que contienen CAG.

Quando la ARN polimerasa II se mueve a lo largo de un molde de ADN que contiene una repetición de CAG corta (indicada en rojo), la elongación del transcrito no se regula mediante Spt4. Sin embargo, la elongación de la transcripción se hace menos eficaz y requiere Spt4 cuando hay presente un tramo de CAG largo en el gen. En las células que carecen de una función normal de Spt4, solamente se ven afectados los genes que contienen tramos prolongados de repeticiones de CAG, y las proteínas de poliQ expandidas que codifican. Las proteínas que contienen repeticiones de poliQ expandidas (cuadrados) se agregan (rectángulos) de una manera dependiente de la concentración.

Figura 8. La deficiencia de *spt4* no interfiere con la expresión de la proteína Hsp104 o los priones de levadura [*PIN<sup>+</sup>*], relacionado con la Figura 1

- 10 (A) Un diagrama esquemático que muestra la relación entre Hsp104, el prion de levadura [*PIN<sup>+</sup>*] y la agregación de poliQ. En las células de levadura, la agregación de poliQ requiere el prion [*PIN<sup>+</sup>*]. Hsp104 puede facilitar la agregación de poliQ y es esencial para la persistencia de [*PIN<sup>+</sup>*], (B) Análisis del estado de [*PIN<sup>+</sup>*] mediante marcaje con RNQ1-GFP. La construcción de plásmido RNQ1-GFP se introdujo en las células y se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia. Las células con [*PIN<sup>+</sup>*] muestran focos GFP-positivos, mientras la señal de GFP se distribuye uniformemente en las células que carecen de [*PIN<sup>+</sup>*]. WT y *hsp104D* sirvieron como controles positivos y negativos para [*PIN<sup>+</sup>*], respectivamente. (C) Se examinaron los niveles de proteína Hsp104 en las células indicadas mediante inmunotransferencia con el uso del anticuerpo anti-Hsp104.

Figura 9. La transcripción génica disminuida de *97Q-Ade2*, que da como resultado una abundancia reducida de la proteína, previene la agregación de la proteína de poliQ, relacionado con la Figura 2

- 20 (A) Se cultivaron células WT, después de un precultivo con rafinosa, en medios con las concentraciones indicadas de glucosa más un 2% de galactosa para inducir la expresión génica de *97Q-ADE2* bajo control del promotor *GAL1*. Se observa una actividad del promotor progresivamente en declive a medida que se incrementan las concentraciones de glucosa (Biggar, S.R., y Crabtree, G.R. (2001). Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. EMBO J 20, 3167-76). Después de 12 hr de inducción, se recogieron las células y se analizaron los niveles de mRNA *97Q-ADE2* mediante transferencia de Northern con el uso de una sonda de poliQ. Los niveles de transcrito de *SCR1* sirvieron como control de carga. Se muestra la expresión de mRNA de *97Q-ADE2* en células *spt4D* como comparación. (B) Se determinó la expresión celular y la agregación de la proteína *97Q-Ade2* mediante transferencia lineal (NC) y ensayo de captura en filtro (CA), respectivamente. Se usó el anticuerpo contra el epítipo FLAG para detectar *97Q-Ade2*. (C) Fenotipos del color de las colonias de células que expresaban *97Q-ADE2* en medios de cultivo como se describió en (A). Las células WT (W303-1A) poseen el alelo mutante *ade2-1*, y se incluyó esta célula con un vector vacío o *ADE2* inducible mediante galactosa como control.

Figura 10. Spt4 es necesario de manera específica para la expresión de genes con un tramo largo de repeticiones de CAG, relacionado con la Figura 2

- 35 (A) Fenotipos del color de las colonias de células que expresaban *99Q-Ade2* o *29Q-Ade2*. En estas proteínas indicadoras, diferentes de *97Q-Ade2* y *25Q-Ade2*, los sucesivos residuos de glutamina están codificados por repeticiones de CAG solamente. (B) Se examinó la expresión y agregación de poliQ-Ade2 mediante el uso de transferencia lineal (NC) y ensayos de captura en filtro (CA), respectivamente. Se usó el anticuerpo anti-FLAG para detectar las proteínas indicadoras. (C) Se analizaron los niveles de mRNA que codificaban *99Q-Ade2* o *29Q-Ade2* en las células indicadas mediante transferencia de Northern con el uso de una sonda de poliQ. Tras la normalización con *SCR1*, se ajustó el nivel de mRNA de las células WT que expresaban *99Q-ADE2* como el 100%. Se muestran los niveles relativos de mRNA en otras células.

Figura 11. Un mutante *spt5* SF inhibe de manera específica la expresión de genes con repeticiones de CAG expandidas, relacionado con la Figura 2

- 45 (A) Fenotipos del color de las colonias de células que expresaban *99Q-Ade2* o *29Q-Ade2*. Las células *spt5* SF portan una mutación puntual *SPT5* S324F específica que inhibe la formación de un complejo Spt4/5 (Guo, M., Xu, F., Yamada, J., Egelhofer, T., Gao, Y., Hartzog, G.A., Teng, M., y Niu, L. (2008). Core structure of the yeast spt-4-spt5 complex: a conserved module for regulation of transcription elongation. Structure 16, 1649-1658). (B) Se examinó la expresión y agregación de poliQ-Ade2 mediante transferencia lineal (NC) y ensayos de captura en filtro (CA), respectivamente. (C) Se analizaron los niveles de mARNs que codificaban poliQ-Ade2 mediante transferencia de Northern con el uso de una sonda de poliQ. Tras la normalización con *SCR1*, se ajustaron los niveles de mRNA en las células WT que expresaban *99Q-ADE2* al 100%. Se indican los niveles relativos de mRNA en otras células. (D) y (E) Se analizó la expresión de la proteína Hsp104 y los priones de levadura [*PIN<sup>+</sup>*] en células *spt5* SF como se describió en la Figura 8.

Figura 12. Un tramo largo de repeticiones de CAG está asociado a una expresión reducida de *Htt* en fibroblastos derivados de un paciente de EH, relacionado con la Figura 6

- (A) Se examinó la expresión de proteína Htt de tipo natural y los alelos mutantes mediante inmunotransferencia de las células indicadas, que se obtuvieron del Coriell Institute. GM04795 es una línea celular de fibroblastos normales. (B) En GM09197, existe un polimorfismo en el que un trinucleótido gag está delecionado en el alelo mutante de *Htt*

(Zhang, Y., Engelman, J., y Friedlander, R.M. (2009). Allele-specific silencing of mutant Huntington's disease gene. *J Neurochem* 108,82-90.), como se mostró anteriormente. Se diseñaron los cebadores que abarcaban esta región (rojo) para distinguir la *Htt* de tipo natural de la mutante. Junto con un cebador (5'-cgaggatctcgtcttctgaag-3') que hibrida con el exón 60 de *Htt*, se usó un cebador de tipo natural (WT) para amplificar un fragmento de 305 pb mediante PCR con el uso de un plásmido W como molde. El cebador mutante (Mu) mostró una eficacia de amplificación comparable cuando se usó el plásmido M. Los plásmidos W y M contienen la secuencia desde el exón 57 hasta el exón 61 del mRNA de *Htt* de tipo natural y mutante de GM09197, respectivamente. (C) Se analizó la expresión de los alelos de *Htt* en GM09197 mediante RT-PCR con el uso de los cebadores descritos en (B).

### Descripción detallada

El primer aspecto de la invención se refiere a agentes que reducen de manera selectiva la actividad perjudicial de los genes que contienen repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes en una célula. La actividad perjudicial (p.ej., toxicidad y/o disfuncionalidad de los productos así codificados) de un gen que contiene repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes se reduce de manera selectiva disminuyendo de manera selectiva la actividad transcripcional mediada por SPT4. Un segundo aspecto de la invención se refiere además a los ensayos para identificar los agentes útiles en el primer aspecto de la invención. Los agentes tienen utilidad en la prevención o el tratamiento de estados patológicos asociados a la presencia de genes que contienen repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, tales como la enfermedad de Huntington (EH).

Antes de describir la presente invención con más detalle, se debe entender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que está abarcado en la invención cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados en la invención, sujetos a cualquier límite excluido de manera específica en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Ciertos intervalos se presentan en la presente memoria con valores numéricos que van precedidos por la expresión "alrededor de". La expresión "alrededor de" se usa en la presente memoria para proporcionar apoyo literal al número exacto al que precede, así como un número que es cercano a, o aproximadamente, el número al que precede la expresión. Al determinar si un número es cercano a, o aproximadamente, un número indicado de manera específica, el número indicado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporcione el equivalente sustancial del número indicado de manera específica.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente alguien de experiencia habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales ilustrativos representativos se describen a continuación.

La cita de cualquier publicación es por su descripción antes de la fecha de presentación, y no se debería considerar como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder a tal publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que puede ser necesario confirmar de modo independiente.

Se indica que, tal como se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto lo imponga claramente de otra manera. Se indica además que las reivindicaciones se pueden redactar de tal modo que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base previa para el uso de terminología exclusiva tal como "únicamente", "solamente" y similares con respecto a la lectura de los elementos reivindicados, o el uso de una limitación "negativa".

Como será evidente para los expertos en la técnica tras la lectura de esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes y características discretas que se pueden separar o combinar fácilmente con las características de cualquiera de las otras diversas realizaciones. Cualquier método enumerado se puede llevar a cabo en el orden de eventos enumerados, o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

MÉTODOS

Como se resumió anteriormente, la invención describe agentes que reducen de manera selectiva el impacto perjudicial de un gen que incluye una repetición de trinucleótidos prolongada. En otras palabras, las realizaciones de la invención incluyen un agente para reducir una actividad dañina o perjudicial de un gen que contiene repeticiones de trinucleótidos prolongadas en una célula. Como estos agentes reducen dicha actividad, dan como resultado la reducción de tal actividad en comparación con un control adecuado.

Por lo tanto, los agentes útiles en la invención dan como resultado la presencia de una actividad fisiológica deseable del gen objetivo, a pesar de la reducción selectiva de la actividad dañina del gen objetivo.

El impacto o actividad perjudicial del gen objetivo que se reduce en las realizaciones de la invención puede variar, en la que las actividades perjudiciales incluyen, pero sin limitación, la toxicidad (p.ej., como resultado de la agregación proteica), la pérdida de función, etc. Como tal, en ciertos casos los métodos dan como resultado una reducción de la toxicidad que es atribuible al gen objetivo, en los que la magnitud de la reducción de la toxicidad puede variar, y en ciertos casos es de 2 veces o más, tal como 5 veces o más, lo que incluye 10 veces o más, p.ej., en comparación con un control adecuado. Como se describe con más detalle más adelante, la toxicidad se puede reducir de varias maneras diferentes, que pueden depender del gen objetivo particular. En ciertos casos, p.ej., en los que el gen objetivo incluye una repetición de CAG prolongada que da como resultado la presencia de dominios de poliQ prolongados en un producto codificado por el gen objetivo, la reducción de la toxicidad puede ir acompañada por una reducción de la agregación de los productos codificados por el gen objetivo. En tales casos, la magnitud de la reducción de la agregación puede variar, y en algunos casos la magnitud de la reducción es de 2 veces o más, tal como 5 veces o más, lo que incluye 10 veces o más. La agregación proteica se puede ensayar mediante el uso de cualquier protocolo adecuado, lo que incluye, pero sin limitación, los protocolos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada N° 20110130305; cuya descripción y protocolos se incorporan en la presente memoria como referencia.

Como se mencionó anteriormente, el impacto o actividad perjudicial que se reduce mediante los métodos de la descripción puede ser la pérdida de la función de un producto codificado por el gen objetivo. En tales casos, la actividad de tipo natural o normal del producto codificado por el gen objetivo se altera al menos parcialmente, si no completamente, porque el gen objetivo incluye la repetición de trinucleótidos prolongada. En estos casos, la pérdida de la función se invierte al menos parcialmente, si no completamente, aumentando la función deseada del producto del gen objetivo. La función deseada del producto codificado se puede incrementar en una cantidad estadísticamente significativa en comparación con un control adecuado, en la que la magnitud del aumento de la actividad deseada puede ser 2 veces o más, tal como 5 veces o más, lo que incluye 10 veces o más.

El gen objetivo es un gen que incluye una repetición de trinucleótidos prolongada mutante. El término "gen", tal como se usa en la presente memoria, es una región o porción definida de un cromosoma que codifica o posibilita la producción de un producto, e incluye un promotor, intrones, exones y potenciadores. Una repetición de trinucleótidos prolongada mutante pretende significar un dominio (es decir, región) del gen que incluye múltiples repeticiones adyacentes de los mismos tres nucleótidos, en la que la longitud y la secuencia particular de la repetición de trinucleótidos prolongada mutante puede variar, y el dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes no está presente en las versiones normales del gen. El dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas puede estar presente en una región codificante o no codificante del gen objetivo. En las realizaciones, el dominio de repeticiones mutantes está presente en una región no codificante del gen objetivo, tal como la expansión de CTG localizada en la región sin traducir de 3' del gen de la proteína quinasa de la distrofia miotónica, que conduce a distrofia miotónica (DM). En ciertos casos, el dominio de repeticiones mutantes está presente en una región codificante del gen objetivo, de forma que en ciertos casos su presencia en el gen objetivo da como resultado un dominio o región correspondiente (p.ej., dominio de poliQ) en un producto codificado por el gen.

Las repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes pueden variar con respecto a la composición de nucleótidos y la longitud. Los trinucleótidos específicos de interés incluyen, pero sin limitación: CAG, CTG, y similares. En ciertos casos, el dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas es un dominio de repeticiones de CAG. La longitud particular del dominio de repeticiones de CAG puede variar con respecto al gen objetivo específico, con tal de que dé como resultado una actividad perjudicial, y en ciertos casos es de 25 repeticiones o más, tal como 30 repeticiones o más, lo que incluye 35 repeticiones o más. Los genes objetivo específicos, las enfermedades asociadas a ellos y la longitud específica de las secuencias repetitivas de las repeticiones de CAG prolongadas, incluyen (pero sin limitación) las proporcionados en la Tabla 1, a continuación.

TABLA 1

Enfermedad		Nombre del gen/producto proteico	Longitud de repeticiones patogénica
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	SCA1	SCA1/ataxina 1	40 ~ 82
Ataxia espinocerebelosa tipo 2	SCA2	SCA2/ataxina 2	32 ~ 200

Enfermedad		Nombre del gen/producto proteico	Longitud de repeticiones patogénica
Ataxia espinocerebelosa tipo 3	SCA3(MJD)	SCA3/ataxina 3	61 ~ 84
Ataxia espinocerebelosa tipo 7	SCA7	SCA7/ataxina 7	37 ~ 306
Ataxia espinocerebelosa tipo 17	SCA17	SCA17/TBP	47 ~ 63
Atrofia dentatorubropalidoluisiana	DRPLA	DRPLA/atrofina 1	49 ~ 88
Atrofia muscular espinobulbar	SBMA	AR/receptor de andrógenos	38 ~ 62
Enfermedad de Huntington	EH	Htt/huntingtina	40 ~ 121

5 Dependiendo de las realizaciones particulares que se ponen en práctica, se puede emplear una diversidad de diferentes tipos de agentes activos. En ciertos casos, el agente modula la actividad de la proteína tras la expresión, de forma que el agente es uno que cambia la actividad de la proteína codificada por el gen objetivo tras la expresión de la proteína a partir del gen objetivo. En estos casos, el agente es uno que puede actuar directamente con la proteína codificada por el gen objetivo. En estos casos, el agente puede ser uno que reduzca de manera selectiva la actividad perjudicial, p.ej. la agregación, de la proteína codificada, pero que conserve o aumente, al menos hasta un nivel detectable, la actividad beneficiosa de la proteína codificada. En ciertas realizaciones, tales agentes no son inhibidores de la agregación de la proteína, sino que en su lugar reducen de manera selectiva la actividad perjudicial de la proteína por medio de otro mecanismo, p.ej., reduciendo la cantidad de la proteína en la célula que está disponible para la agregación, reduciendo la producción de una proteína que es perjudicial para las células independientemente de su propensión a agregarse, previniendo el plegamiento incorrecto de la proteína codificada, etc.

15 En otros casos, el agente modula la expresión del ARN y/o la proteína a partir del gen, de forma que cambia de cierta manera la expresión del ARN o la proteína a partir del gen objetivo. En estos casos, el agente puede cambiar la expresión del ARN o la proteína de varias maneras diferentes, en el que los agentes de interés incluyen agentes moduladores selectivos de SPT4. Los agentes moduladores selectivos de SPT4 son agentes que cambian de manera selectiva la actividad de SPT4 en una célula, p.ej., disminuyen la actividad de SPT4 en una célula. En ciertos casos, la actividad de SPT4 objetivo que se modula, p.ej., que se disminuye, mediante el agente activo es una actividad de transcripción, y de manera específica una actividad que facilita la procesividad de la ARN polimerasa II en dominios de repeticiones de trinucleótidos largas, p.ej., dominios de repeticiones de CAG largas. La actividad de SPT4 objetivo que se modula mediante tales agentes es una actividad que surge de una proteína SPT4. La expresión proteína SPT4 se usa en la presente memoria para referirse colectivamente no solamente a las proteínas Spt4 de levaduras, sino también a los homólogos de mamífero de la misma, p.ej., SUPT4H humana; Supt4h murina, etc. Como tales, las proteínas SPT4 de interés cuya actividad se puede modular mediante los agentes moduladores selectivos de SPT4 incluyen, pero sin limitación: Spt4 de *S. cerevisiae*; SUPT4H humana y Supt4h murina.

30 Cuando el agente empleado es un agente modulador de SPT4, el agente modulador que se emplea puede ser cualquier agente que, tras la introducción en una célula, cambie la actividad de SPT4 de la célula, y de manera específica reduzca la actividad de la transcripción de SPT4 mediada por repeticiones de trinucleótidos prolongadas en el sujeto. El agente modulador de SPT4 puede modular la actividad de varias maneras diferentes, p.ej., reduciendo la expresión de una proteína SPT4, inhibiendo la unión de una proteína SPT4 a otra proteína, p.ej., una proteína que interacciona con SPT4 (p.ej., una proteína SPT5, tal como Spt5 o SUPT5H), etc. Los ejemplos de los diferentes tipos de agentes moduladores se revisan con más detalle más adelante.

35 En ciertas realizaciones, el agente es uno que reduce, lo que incluye inhibir, la expresión de una proteína SPT4 funcional. La inhibición de la expresión de la proteína SPT4 se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier medio adecuado, lo que incluye el uso de un agente que inhiba la expresión de la proteína SPT4, tal como, pero sin limitación: agentes de moléculas inversas, agentes de ARNi, agentes que interfieren con la unión de factores de transcripción a una secuencia promotora del gen SPT4, o la inactivación del gen SPT4, p.ej., por medio de técnicas recombinantes, etc.

40 Por ejemplo, se pueden usar moléculas inversas para inhibir la expresión de un gen SPT4 en la célula. El reactivo inverso puede ser oligodesoxinucleótidos (ODN) inversos, en particular ODN sintéticos que tienen modificaciones químicas respecto de los ácidos nucleicos nativos, o construcciones de ácido nucleico que expresan tales moléculas inversas en forma de ARN. La secuencia inversa es complementaria al mRNA de la proteína selectiva, e inhibe la expresión de la proteína selectiva. Las moléculas inversas inhiben la expresión génica por medio de diversos mecanismos, p.ej., reduciendo la cantidad de mRNA disponible para la traducción, por medio de la activación de la RNasa H, o mediante un impedimento estérico. Se puede administrar una o una combinación de moléculas inversas, en la que una combinación puede incluir múltiples secuencias diferentes.

- Las moléculas inversas se pueden producir mediante la expresión de toda o una parte de la secuencia génica objetivo en un vector adecuado, en la que el inicio transcripcional está orientado de forma que se produce una cadena inversa en forma de una molécula de ARN. De manera alternativa, la molécula inversa es un oligonucleótido sintético. Los oligonucleótidos inversos tendrán en general una longitud de al menos alrededor de 7, normalmente al menos alrededor de 12, más normalmente al menos alrededor de 20 nucleótidos, y no más de alrededor de 500, normalmente no más de alrededor de 50, más normalmente no más de alrededor de 35 nucleótidos, en los que la longitud se controla mediante la eficacia de la inhibición, la especificidad, lo que incluye la ausencia de reactividad cruzada, y similares. Se ha descubierto que los oligonucleótidos cortos, de una longitud de 7 a 8 bases, pueden ser inhibidores fuertes y selectivos de la expresión génica (véase Wagner *et al.* (1996), *Nature Biotechnol.* 14:840-844).
- 5 Se elige una región o regiones específicas de la secuencia de mRNA de la cadena directa endógena para complementarla mediante la secuencia inversa. La selección de una secuencia específica para el oligonucleótido puede usar un método empírico, en el que se ensayan varias secuencias candidatas para la inhibición de la expresión del gen objetivo en un modelo *in vitro* o animal. También se puede usar una combinación de secuencias, en la que se seleccionan varias regiones de la secuencia de mRNA para la complementación inversa.
- 10 Se pueden sintetizar químicamente oligonucleótidos inversos mediante métodos conocidos en la técnica (véase Wagner *et al.* (1993), anteriormente mencionado, y Milligan *et al.*, anteriormente mencionado). Los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente a partir de la estructura fosfodiéster nativa, para incrementar su estabilidad intracelular y afinidad de unión. Se han descrito varias de tales modificaciones en la bibliografía, que alteran la química del esqueleto, los carbohidratos o las bases heterocíclicas.
- 15 Entre los cambios útiles en la química del esqueleto están los fosforotioatos; fosforoditioatos, en los que los dos oxígenos que no participan en los puentes se sustituyen con azufre; fosforoamiditas; fosfotriésteres de alquilo y boranofosfatos. Los derivados de fosfato quirales incluyen 3'-O'-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH<sub>2</sub>-5'-O-fosfonato y 3'-NH-5'-O-fosforoamidato. Los ácidos peptidonucleicos sustituyen todo el esqueleto de fosfodiéster de ribosa con un enlace peptídico. También se usan modificaciones en los carbohidratos para aumentar la estabilidad y afinidad. Se puede usar el anómero  $\alpha$  de desoxirribosa, en el que la base está invertida con respecto al anómero  $\beta$  natural. El 2'-OH del carbohidrato de ribosa se puede alterar para formar carbohidratos de 2'-O-metilo o 2'-O-alilo, que proporcionan resistencia a la degradación sin comprometer la afinidad. La modificación de las bases heterocíclicas debe mantener un emparejamiento de bases adecuado. Algunas sustituciones útiles incluyen desoxiuridina por desoxitimidina; 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina. Se ha demostrado que 5-propinil-2'-desoxiuridina y 5-propinil-2'-desoxicitidina incrementan la afinidad y la actividad biológica cuando se sustituyen por desoxitimidina y desoxicitidina, respectivamente.
- 20 Como alternativa a los inhibidores de moléculas inversas, se pueden usar compuestos de ácidos nucleicos catalíticos, p.ej. ribozimas, conjugados inversos, etc. para inhibir la expresión génica. Las ribozimas se pueden sintetizar *in vitro* y administrarlas al paciente, o se pueden codificar en un vector de expresión, a partir del cual se sintetiza la ribozima en la célula seleccionada como objetivo (por ejemplo, véase la solicitud de patente internacional WO 9523225, y Beigelman *et al.* (1995), *Nucl. Acids Res.* 23:4434-42). Los ejemplos de oligonucleótidos con actividad catalítica se describen en el documento WO 9506764. Los conjugados de ODN inversos con un complejo metálico, p.ej. terpiridilCu(II), capaces de mediar en la hidrólisis del mRNA, se describen en Bashkin *et al.* (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 54:43-56.
- 25 Además, el nivel de transcripción de una proteína SPT4 se puede regular mediante silenciamiento génico con el uso de agentes de ARNi, p.ej., ARN bicatenario (Sharp (1999) *Genes and Development* 13: 139-141). El ARNi, tal como el ARN de interferencia bicatenario (dsARNi) o el ARN de interferencia pequeño (siARN), se ha documentado exhaustivamente en el nemátodo *C. elegans* (Fire, A., *et al.*, *Nature*, 391, 806-811, 1998), y se usa de manera rutinaria para "inactivar" genes en diversos sistemas. Los agentes de ARNi pueden ser dsARN o un molde transcripcional del ácido ribonucleico de interferencia que se puede usar para producir dsARN en una célula. En estas realizaciones, el molde transcripcional puede ser un ADN que codifica el ácido ribonucleico de interferencia. Los métodos y procedimientos asociados al ARNi también se describen en los documentos WO 03/010180 y WO 01/68836, los cuales se incorporan en la presente memoria como referencia. El dsARN se puede preparar según cualquiera de varios métodos que se conocen en la técnica, que incluyen métodos *in vitro* e *in vivo*, así como mediante aproximaciones de química sintética. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, los métodos descritos por Sadher *et al.* (*Biochem. Int.* 14:1015, 1987); por Bhattacharyya (*Nature* 343:484, 1990); y por Livache, *et al.* (patente de EE.UU. n° 5.795.715), cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. También se puede producir ARN monocatenario mediante el uso de una combinación de síntesis enzimática y orgánica, o mediante síntesis orgánica total. El uso de los métodos químicos sintéticos
- 30 posibilita que se introduzcan los nucleótidos modificados o los análogos de nucleótidos deseados en el dsARN. También se puede preparar dsARN *in vivo* según varios métodos establecidos (véase, p.ej., Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed.; *Transcription and Translation* (B.D. Hames, y S.J. Higgins, Eds., 1984); *DNA Cloning*, volúmenes I y II (D.N. Glover, Ed., 1985); y *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, Ed., 1984, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). Se pueden utilizar varias opciones para administrar los dsARN a una célula o población de células, tal como en un cultivo celular, tejido, órgano o embrión. Por ejemplo, se puede introducir ARN directamente de manera intracelular. En general se utilizan diversos métodos físicos en tales casos, tales como administración mediante microinyección (véase, p.ej., Zernicka-
- 35 40 45 50 55 60

Goetz, *et al.* (1997) *Development* 124:1133-1137; y Wianny, *et al.* (1998) *Chromosoma* 107: 430-439). Otras opciones para la administración celular incluyen la permeabilización de la membrana celular y la electroporación en presencia del dsARN, la transfección mediada por liposomas, o la transfección mediante el uso de productos químicos tales como fosfato de calcio. También se pueden utilizar varias técnicas de terapia génica establecidas para introducir el dsARN en una célula. Mediante la introducción de una construcción viral en una partícula viral, por ejemplo, se puede llevar a cabo la introducción eficaz de una construcción de expresión en la célula y la transcripción del ARN codificado por la construcción.

En otra realización, el gen de SPT4 se inactiva de forma que ya no expresa una proteína funcional. Inactivado significa que el gen, p.ej., la secuencia codificante y/o los elementos reguladores de la misma, se modifican genéticamente de forma que ya no expresa una proteína SPT4 funcional, p.ej., al menos con respecto a la actividad en la transcripción de SPT4 en una región de repeticiones de trinucleótidos prolongadas en un gen objetivo. La alteración o mutación puede tomar varias formas diferentes, p.ej., por medio de la delección de uno o más residuos de nucleótidos, por medio del intercambio de uno o más residuos de nucleótidos, y similares. Un medio para producir tales alteraciones en la secuencia codificante es mediante recombinación homóloga. Los métodos para generar modificaciones de genes seleccionados como objetivo por medio de recombinación homóloga se conocen en la técnica, e incluyen los descritos en: las patentes de EE.UU. N°s 6.074.853; 5.998.209; 5.998.144; 5.948.653; 5.925.544; 5.830.698; 5.780.296; 5.776.744; 5.721.367; 5.614.396; 5.612.205; cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia.

También tienen interés en ciertas realizaciones los mutantes negativos dominantes de las proteínas SPT4, en los que la expresión de tales mutantes en la célula da como resultado una modulación, p.ej., disminución, de la transcripción mediada por SPT4 de las repeticiones de trinucleótidos prolongadas en una célula. Los mutantes negativos dominantes de SPT4 son proteínas mutantes que exhiben actividad de SPT4 negativa dominante. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "actividad de SPT4 negativa dominante" o "actividad negativa dominante" se refiere a la inhibición, anulación, o disminución de ciertas actividades particulares de SPT4, y de manera específica a la transcripción mediada por SPT4 de las repeticiones de trinucleótidos prolongadas. Las mutaciones negativas dominantes se generan fácilmente para las proteínas correspondientes. Estas pueden actuar mediante varios mecanismos diferentes, que incluyen las mutaciones en un dominio de unión al sustrato; las mutaciones en un dominio catalítico; las mutaciones en un dominio de unión a una proteína (p.ej. dominios que forman multímeros, dominios efectores, o dominios de unión a proteínas activantes); las mutaciones en un dominio de localización celular, etc. Un polipéptido mutante puede interactuar con polipéptidos de tipo natural (producidos a partir del otro alelo) y formar un multímero no funcional. En ciertas realizaciones, el polipéptido mutante se producirá en exceso. Se producen mutaciones puntuales que tienen tal efecto. Además, la fusión de los diferentes polipéptidos de diversas longitudes en el extremo terminal de una proteína, o la delección de dominios específicos, puede producir mutantes negativos dominantes. Hay disponibles estrategias generales para producir mutantes negativos dominantes (véase, por ejemplo, Herskowitz (1987) *Nature* 329:219, y las referencias citadas anteriormente). Se usan tales técnicas para crear la pérdida de mutaciones funcionales, que son útiles para determinar la función de la proteína. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos que se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes y señales adecuadas de control transcripcional y traduccional para la expresión incrementada de un gen exógeno introducido en una célula. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. De manera alternativa, se puede sintetizar químicamente ARN capaz de codificar secuencias de productos génicos mediante el uso, por ejemplo, de sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford.

En otras realizaciones, el agente es un agente que modula, p.ej., inhibe, la actividad de SPT4 mediante la unión a SPT4 y/o la inhibición de la unión de SPT4 a una segunda proteína, p.ej., una proteína SPT5, tal como Spt5 o SUPT5H. Por ejemplo, son de interés las moléculas pequeñas que se unen a SPT4 e inhiben su actividad (p.ej., la unión a una proteína STP5). Los compuestos de interés de moléculas pequeñas sintéticas o naturales incluyen numerosas clases químicas, tales como moléculas orgánicas, p.ej., compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de alrededor de 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales para la interacción estructural con proteínas, en particular la formación de enlaces de hidrógeno, y en general incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden incluir estructuras carbocíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se hallan agentes candidatos entre las biomoléculas, lo que incluye péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de las mismas. Tales moléculas se pueden identificar, entre otras maneras, empleando los protocolos de cribado descritos más adelante.

Al usar los agentes según las realizaciones de la invención, se proporciona una cantidad eficaz del agente activo, p.ej. un agente modulador de SPT4, a la célula o células objetivo. En ciertos casos, la cantidad eficaz del agente modulador se proporciona a la célula poniendo en contacto la célula con el agente modulador. El contacto de la célula con el agente modulador se puede dar mediante el uso de cualquier protocolo adecuado. El protocolo puede proporcionar el contacto *in vitro* o *in vivo* del agente modulador con la célula objetivo, dependiendo de la localización de la célula objetivo. El contacto puede incluir o no la entrada del agente a la célula. Por ejemplo, cuando la célula objetivo es una célula aislada y el agente modulador es un agente que modula la expresión de SPT4, el agente

modulador se puede introducir directamente en la célula en condiciones de cultivo celular que permiten la viabilidad de la célula objetivo. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan necesariamente a: infección viral, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, electroporación, tecnología de pistola de partículas, precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa, administración de vectores virales, y similares. La elección del método depende en general del tipo de célula que se pone en contacto y de la naturaleza del agente modulador, y las circunstancias en las que la transformación tiene lugar (p.ej., *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*). Se puede hallar una discusión general de estos métodos en Ausubel, *et al*, Short Protocols in Molecular Biology, 3ª ed., Wiley & Sons, 1995.

De manera alternativa, cuando la célula o células objetivo son parte de un organismo multicelular, el agente modulador se puede administrar al organismo o sujeto de tal manera que el agente sea capaz de entrar en contacto con la(s) célula(s) objetivo, p.ej., por medio de un protocolo *in vivo* o *ex vivo*. "*In vivo*" significa que la construcción objetivo se administra al cuerpo vivo de un animal. "*Ex vivo*" significa que las células u órganos se modifican fuera del cuerpo. Tales células u órganos se devuelven en general a un cuerpo vivo.

En el uso, el/los agente(s) activo(s) se puede(n) administrar a las células seleccionadas como objetivo mediante el uso de cualquier protocolo de administración adecuado capaz de dar como resultado la actividad deseada. Así, el agente se puede incorporar en una diversidad de formulaciones, p.ej., vehículos farmacéuticamente aceptables, para la administración terapéutica. Más en particular, los agentes de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante una combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas (p.ej., cremas para la piel), soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Como tal, la administración de los agentes se puede conseguir de diversas maneras, que incluyen la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc.

En las formas farmacéuticas, los agentes se pueden administrar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o se pueden usar también solos o en una asociación adecuada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente ejemplares, y no son de ninguna manera limitantes.

Para las preparaciones orales, los agentes se pueden usar solos o en combinación con aditivos adecuados para producir comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como talco o estearato magnésico; y, si se desea, con diluyentes, agentes tamponadores, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

Los agentes se pueden formular en preparaciones para inyección disolviéndolos, suspendiéndolos o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilen glicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los agentes se pueden utilizar en una formulación de aerosol para administración por medio de inhalación. Los compuestos de la presente invención se pueden formular en propelentes aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, los agentes se pueden transformar en supositorios mezclándolos con una diversidad de bases, tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar de manera rectal por medio de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietilen glicoles, que se funden a la temperatura corporal, mientras se solidifican a la temperatura ambiente.

Se pueden proporcionar formas farmacéuticas unitarias para administración oral o rectal, tales como jarabes, elixires, y suspensiones, en las que cada unidad de dosis, por ejemplo, el volumen de una cucharilla de café, una cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. De forma similar, las formas farmacéuticas unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el/los inhibidor(es) en una composición en forma de una disolución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "forma farmacéutica unitaria", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, y cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado junto con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los requisitos para las formas farmacéuticas unitarias nuevas de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y del efecto a alcanzar, y la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el hospedador.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están disponibles fácilmente para el público. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares, están disponibles fácilmente para el público.

5 Cuando el agente es un polipéptido, polinucleótido, análogo o molécula mimética de los mismos, se puede introducir en los tejidos o las células hospedadoras mediante cualquier número de vías, que incluyen la infección viral, microinyección, o fusión de vesículas. También se puede usar la inyección con pistola para la administración intramuscular, como se describió en Furth *et al.* (1992), *Anal Biochem* 205:365-368. El ADN se puede revestir sobre micropartículas de oro, y administrarlo de manera intradérmica mediante un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola de genes", como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Tang *et al.* (1992), *Nature* 356:152-154), en la que se revisten microproyectiles de oro con el ADN, y después se bombardean sobre las células cutáneas. Para los agentes terapéuticos de ácidos nucleicos, tienen utilidad varios vehículos de administración diferentes, que incluyen sistemas de vectores virales y no virales, tal como se conocen en la técnica.

15 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la naturaleza del vehículo de administración, y similares. Las dosis preferidas para un compuesto determinado son fácilmente determinables por parte de los expertos en la técnica mediante una diversidad de medios.

20 Como se revisó anteriormente, los presentes agentes dan como resultado la reducción selectiva de la actividad perjudicial de un gen con repeticiones de trinucleótidos prolongadas en una célula o células objetivo, en la(s) que la(s) célula(s) objetivo puede(n) estar *in vitro* o *in vivo*. En ciertas realizaciones, los presentes agentes dan como resultado la reducción de la toxicidad de un gen objetivo, p.ej., por medio de una reducción de la agregación de una proteína codificada por él, en la(s) célula(s) objetivo. En ciertas realizaciones, los agentes dan como resultado el aumento de la función de una proteína codificada por un gen objetivo.

25 Los agentes anteriores tienen utilidad en una diversidad de diferentes aplicaciones. A continuación se revisan ciertas aplicaciones en la siguiente sección de Utilidad.

#### UTILIDAD

30 Los presentes agentes tienen utilidad en una diversidad de aplicaciones en las que se desea la reducción de la actividad perjudicial de un gen que contiene un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes. Como tales, los aspectos de la invención incluyen reducir la toxicidad y/o aumentar la funcionalidad de una proteína codificada por tal gen, como se describe en la presente memoria, en cualquier sujeto que lo necesite, p.ej., un sujeto al que se le ha diagnosticado una afección que se puede tratar alcanzando uno o más de los resultados anteriores en el sujeto. Tiene interés usar los agentes de la invención para modificar la progresión de estados patológicos asociados a la actividad perjudicial de genes que contienen un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes. La frase "modificar la progresión" se emplea para abarcar la reducción de la velocidad de progresión (p.ej., tal como se manifiesta en el retraso de la aparición de uno o más síntomas del estado patológico), así como la inversión de la progresión, que incluye la curación, de un estado patológico (p.ej., tal como se manifiesta en la reducción de la magnitud de uno o más síntomas del estado patológico). Los estados patológicos específicos en los que los métodos y las composiciones de la invención tienen utilidad incluyen, pero sin limitación, los estados patológicos por poliQ, tales como ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3, ataxia espinocerebelosa tipo 7, ataxia espinocerebelosa tipo 17, atrofia dentatorubropalidoluisiana, atrofia muscular espinobulbar, y enfermedad de Huntington.

45 En ciertos casos, el uso de los agentes de la invención da como resultado el tratamiento de un estado patológico en un sujeto. El tratamiento significa al menos una mejora de uno o más síntomas asociados al estado patológico que padece el sujeto, en el que la mejora se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción de la magnitud de un parámetro, p.ej., síntoma, asociado al estado patológico que se trata, tal como la pérdida de la función cognitiva, etc. Como tal, el tratamiento también incluye las situaciones en las que el estado patológico, o al menos los síntomas asociados a ella, se inhiben completamente, p.ej., se previene que ocurran, o se paran, p.ej., se terminan, de forma que el sujeto ya no padece el estado patológico, o al menos los síntomas que caracterizan al estado patológico.

50 Se puede tratar a una diversidad de hospedadores según los presentes agentes. En general, tales hospedadores son "mamíferos" o "mamífero", en los que estos términos se usan en líneas generales para describir los organismos que se hallan dentro de la clase Mammalia, que incluye los órdenes Carnivora (p.ej., perros y gatos), Rodentia (p.ej., ratones, conejillos de Indias, y ratas), y Primates (p.ej., seres humanos, chimpancés, y monos). En muchas realizaciones, los hospedadores serán seres humanos.

#### 55 ENSAYOS DE CRIBADO

Los aspectos de la invención también incluyen ensayos de cribado configurados para identificar los agentes que tienen utilidad en la invención, p.ej., como se revisó anteriormente. Los ensayos de cribado de interés incluyen los métodos para analizar si un compuesto de ensayo modula la actividad de una proteína codificada por un gen que

comprende un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes. Analizar significa al menos predecir que un compuesto de ensayo determinado tiene una actividad deseable, de forma que si se desea se ensayará posteriormente el compuesto en ensayos adicionales, tales como ensayos en modelos animales y/o ensayos clínicos. La identificación del papel de las proteínas SPT4 en la transcripción de genes que contienen repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes permite la reconstrucción *in vitro* de la ruta. Se pueden combinar *in vitro* dos o más de los componentes de la ruta, p.ej., una proteína SPT4 y SPT5, y se puede estudiar el comportamiento en presencia del compuesto de ensayo de varias maneras diferentes, p.ej., en la producción de una señal que se da solamente tras la interacción de los componentes de la ruta, con respecto a la activación de la transcripción de secuencias objetivo específicas, etc.

Se puede llevar a cabo el cribado de fármacos mediante el uso de un modelo *in vitro*, una célula o animal alterados genéticamente, o una proteína SPT4 purificada. Se pueden identificar ligandos o sustratos que compiten con, modulan o imitan la acción de la proteína SPT4. El cribado de fármacos identifica los agentes que imitan la actividad de SPT4, como antagonista o como agonista. Se puede usar una amplia diversidad de ensayos para este fin, que incluyen los ensayos de unión proteína-proteína *in vitro* con marcaje, los ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética, los inmunoensayos para la unión de proteínas, y similares. El conocimiento de la estructura tridimensional de SPT4, obtenida de la cristalización de una proteína SPT4 sintética purificada, conduce al diseño racional de fármacos pequeños que inhiben de manera específica la actividad de SPT4.

El término "agente", tal como se usa en la presente memoria, describe cualquier molécula, p.ej., proteína o molécula farmacéutica, con la capacidad de alterar o imitar la función fisiológica de una proteína SPT4. En general, se utiliza una diversidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. En general, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, una concentración nula o por debajo del nivel de detección.

Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, tales como moléculas orgánicas, p.ej., compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de alrededor de 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, en particular formación de enlaces de hidrógeno, y en general incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden a menudo estructuras carbocíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se hallan agentes candidatos entre las biomoléculas, lo que incluye péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de las mismas.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes, que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, hay disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatorizados y oligopéptidos. De manera alternativa, hay disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Además, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos de manera sintética se modifican fácilmente por medio de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y se pueden usar para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales. Tienen interés en ciertas realizaciones los compuestos que atraviesan la barrera hematoencefálica.

Cuando el ensayo de cribado es un ensayo de unión, una o más de las moléculas se pueden unir a un miembro de un sistema productor de señales, p.ej., un marcador, en el que el marcador puede proporcionar directamente o indirectamente una señal detectable. Los diversos marcadores incluyen, pero sin limitación: radioisótopos, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, moléculas de unión específica, partículas, p.ej., partículas magnéticas, y similares. Las moléculas de unión específica incluyen parejas, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específica, el miembro complementario se marcaría normalmente con una molécula que posibilitase la detección, de acuerdo con los procedimientos conocidos.

Se puede incluir una diversidad de otros reactivos en el ensayo de cribado. Estos incluyen reactivos tales como sales, proteínas neutras, p.ej. albúmina, detergentes, etc., que se usan para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o para reducir las interacciones inespecíficas o de fondo. Se pueden usar reactivos que mejoran la eficacia del ensayo, tales como los inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc. La mezcla de componentes se añade en cualquier orden que posibilite la unión requerida. Las incubaciones se llevan a cabo a cualquier temperatura adecuada, en general entre 4 y 40 °C. Los periodos de incubación se seleccionan para una actividad óptima, pero también se pueden optimizar para facilitar un cribado de alto rendimiento rápido. En general, será suficiente entre 0,1 y 1 horas.

Los compuestos que tienen la actividad farmacológica deseada se pueden administrar en un vehículo fisiológicamente aceptable a un hospedador para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada a la actividad de un gen que contiene repeticiones de trinucleótidos prolongadas. Los agentes se pueden administrar de una diversidad de maneras, de manera oral, tópica, parenteral p.ej., subcutánea, intraperitoneal, mediante infección

viral, de manera intravascular, etc. Dependiendo del modo de introducción, los compuestos se pueden formular de una diversidad de maneras. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar en alrededor del 0,1-10 %p.

5 En ciertos casos, los métodos incluyen el cribado del compuesto con una célula que incluye un sistema productor de señales acoplado de forma operable a una proteína SPT4 para analizar si el compuesto modula la actividad de la proteína codificada por un gen que comprende un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes. Un sistema productor de señales está acoplado de forma operable a una proteína SPT4 si la señal producida por el sistema productor de señales, p.ej., una señal fluorescente, la conversión de un sustrato en un producto detectable, etc., se da o no se da dependiendo de una actividad de una proteína SPT4, p.ej., la capacidad de la proteína SPT4 de unirse a una segunda proteína, tal como una proteína SPT5, la capacidad de una proteína SPT4 de asistir en la transcripción de un dominio de repeticiones de trinucleótidos mutantes, etc. Por lo tanto, el sistema productor de señales presente en la célula puede ser uno que produzca una señal de una manera dependiente de la actividad transcripcional de SPT4.

15 Tienen interés los ensayos en los que el sistema productor de señales produce una señal de una manera dependiente de la formación del complejo proteico SPT4/SPT5. Un ejemplo de tal ensayo es uno en el que SPT4 se marca con un primer miembro de un sistema productor de señales (p.ej., en el que el sistema productor de señales comprende una fusión de una proteína SPT4 y un marcador del sistema productor de señales) y SPT5 se marca con un segundo miembro de un sistema productor de señales, y la formación de un complejo de las proteínas SPT4 y SPT5 da como resultado que la proximidad del primer y segundo miembros del sistema productor de señales proporcione una señal, directamente o indirectamente. Un ejemplo de tal sistema es un ensayo FRET, en el que el primer miembro de un sistema productor de señales es un resto fluorescente donante y el segundo miembro del sistema productor de señales es un resto fluorescente aceptor. Mediante el cribado de la emisión fluorescente del resto fluorescente aceptor, se pueden emplear tales ensayos para analizar si un agente candidato interfiere con la unión de una proteína SPT4 a una proteína SPT5. Se puede emplear cualquier protocolo de FRET adecuado, en el que los protocolos y marcadores específicos de interés que se pueden adaptar fácilmente a los ensayos de la invención incluyen, pero sin limitación: los descritos en las patentes de EE.UU. n°s 7.749.759; 7.718.766; 7.709.608; 7.678.550; 7.674.588; 7.495.069; 7.413.862; 7.332.567; 7.208.285; 7.183.066; 7.160.998; 6.908.769; 6.642.001 y 6.376.257.

30 Otro tipo de ensayo de interés que produce una señal de una manera dependiente de la actividad transcripcional de SPT4 es uno en el que la proteína codificada por el gen objetivo comprende un dominio de un sistema productor de señales. En tales ensayos, el gen objetivo que incluye las repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes también incluye una secuencia codificante de una proteína que es un miembro del sistema productor de señales. Los ejemplos de tales proteínas incluyen las proteínas fluorescentes, enzimas, etc. En tales ensayos, los agentes que restablecen la función de una proteína marcadora codificada por un gen objetivo que tiene una repetición de trinucleótidos prolongada mutante se pueden identificar fácilmente mediante ensayos de la función de la proteína del sistema productor de señales, p.ej., la emisión fluorescente de la proteína, o la actividad enzimática de la proteína. Los ejemplos de tales ensayos incluyen los ensayos basados en GFP y ADE2 descritos con más detalle en la sección experimental. En tales ensayos, el gen objetivo empleado en el ensayo incluye una secuencia codificante de la proteína marcadora unida de forma operable a un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes. Los ejemplos adicionales de proteínas fluorescentes de interés que se pueden emplear como marcadores del sistema productor de señales incluyen, pero sin limitación, proteínas fluorescentes de arrecifes coralinos, p.ej., como las disponibles bajo la marca comercial Living Colors de Clontech Laboratories, y similares. Los ejemplos adicionales de marcadores enzimáticos de interés incluyen, pero sin limitación: luciferasa, SEAP, peroxidasa de rábano,  $\beta$ -galactosidasa, etc. Tienen interés en ciertos casos los ensayos *in vivo* no invasivos en animales completos, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. n°s 7.255.851; 7.198.774; 6.939.533; 6.923.951; 6.916.462; 6.908.605; 6.890.515; 6.649.143; 6.217.847; y 5.650.135. También tiene interés el ensayo de colonias coloreadas descrito en la patente de EE.UU. 7.375.190.

50 Como tales, los aspectos de la descripción incluyen además los ensayos de cribado diseñados para hallar agentes moduladores de la ruta de SPT4, en los que tales agentes pueden tener utilidad en una diversidad de aplicaciones, lo que incluye como agentes terapéuticos, como se describió anteriormente, p.ej., para el tratamiento o la prevención de afecciones que surgen de la actividad de un gen que contiene repeticiones de trinucleótidos prolongadas. Los métodos de cribado pueden ser ensayos que proporcionan medidas cualitativas/cuantitativas de la actividad de SPT4 en presencia de un agente terapéutico candidato particular. El método de cribado puede tener un formato *in vitro* o *in vivo*.

## 55 TERAPIAS DE COMBINACIÓN

Los agentes activos de la invención se pueden suministrar solos o en combinación con otro u otros agentes activos. Por ejemplo, los agentes inhibitorios selectivos de SPT4 se pueden suministrar solos o junto con otro u otros fármacos, tales como los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades de poliQ. Las moléculas de combinación posibles pueden incluir, p.ej., Tetrabenazina (Xenazina); fármacos antipsicóticos, tales como haloperidol (Haldol) y clozapina (Clozaril); fármacos anticonvulsivos tales como clonazepam (Klonopin) y fármacos ansiolíticos, tales como diazepam (Valium); antidepresivos, que incluyen fármacos tales como escitalopram

(Lexapro), fluoxetina (Prozac, Sarafem) y sertralina (Zoloft); y similares.

#### PREPARACIONES FARMACÉUTICAS

5 También se proporcionan preparaciones farmacéuticas de los presentes compuestos. Los presentes compuestos se pueden incorporar en una diversidad de formulaciones para la administración a un sujeto. Más en particular, los compuestos para el uso en la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas mediante una combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Las formulaciones se pueden diseñar para la administración por medio de varias vías diferentes, que incluyen la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc.

10 En las formas farmacéuticas, los compuestos se pueden administrar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o se pueden usar también solos o en una asociación adecuada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente ejemplares, y no son de ninguna manera limitantes.

15 Las composiciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral se pueden preparar según cualquier método conocido en la técnica de fabricación de composiciones farmacéuticas, y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y comestibles. Los comprimidos contienen el ingrediente activo mezclado con excipientes atóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido alginico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato magnésico, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin revestir, o se pueden revestir mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal, y por lo tanto proporcionar una acción mantenida a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, se puede emplear un material que retrasa el tiempo de liberación tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden revestir mediante la técnica descrita en las pat. de EE.UU. n°s 4.256.108; 4.166.452; y 4.265.874 para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para controlar la liberación.

20 Las formulaciones para uso oral se pueden presentar también en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.

25 Las suspensiones acuosas contienen el material activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinil-pirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfolípido natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes de cadena alifática larga, por ejemplo heptadecaetilen-oxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilén sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilén sorbitán. Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo, o de n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, sacarina o aspartamo.

30 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes, tales como los expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral de sabor agradable. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

35 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión se ejemplifican mediante los ya mencionados anteriormente. También puede haber presentes excipientes adicionales, por ejemplo edulcorantes, aromatizantes y agentes colorantes.

Las composiciones farmacéuticas para el uso en la invención también pueden estar en forma de emulsiones aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser fosfolípidos naturales, por ejemplo soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propileno glicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones pueden contener también un demulcente, un conservante y agentes aromatizantes y colorantes. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular según la técnica conocida mediante el uso de los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo en forma de una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean de manera convencional aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, lo que incluye los mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico tienen utilidad en la preparación de composiciones inyectables.

Los compuestos se pueden formular en preparaciones para inyección disolviéndolos, suspendiéndolos o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propileno glicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los compuestos se pueden utilizar en una formulación de aerosol para administrarla por medio de inhalación. Los compuestos para el uso en la presente invención se pueden formular en propelentes aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, los compuestos se pueden transformar en supositorios mezclándolos con una diversidad de bases, tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Los compuestos para el uso en la presente invención se pueden administrar de manera rectal por medio de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietileno glicoles, que se funden a la temperatura corporal, mientras se solidifican a la temperatura ambiente.

Los compuestos para el uso en esta invención, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que son activos tras la administración tópica se pueden formular como composiciones transdérmicas o dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Tales composiciones incluyen, por ejemplo, un soporte, un depósito de compuesto activo, una membrana de control, un revestimiento y adhesivo de contacto. Tales parches transdérmicos se pueden usar para proporcionar una infusión continua o discontinua de los compuestos de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y el uso de los parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Véase, p.ej., la pat. de EE.UU. nº 5.023.252.

Tales parches se pueden construir para la administración continua, pulsátil, o a voluntad de los agentes farmacéuticos.

Opcionalmente, la composición farmacéutica puede contener otros componentes farmacéuticamente aceptables, tales como tampones, tensioactivos, antioxidantes, agentes modificadores de la viscosidad, conservantes y similares. Cada uno de estos componentes es muy conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la pat. de EE.UU. nº 5.985.310.

Otros componentes adecuados para el uso en las formulaciones de la presente invención se pueden hallar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17ª ed. (1985). En una realización, la solución acuosa de ciclodextrina comprende además dextrosa, p.ej., alrededor del 5% de dextrosa.

Los niveles de dosis del orden de alrededor de 0,01 mg a alrededor de 140 mg/kg de peso corporal al día son útiles en las realizaciones representativas, o de manera alternativa alrededor de 0,5 mg a alrededor de 7 g por paciente al día. Por ejemplo, la inflamación se puede tratar de manera eficaz mediante la administración de alrededor de 0,01 a 50 mg del compuesto por kilogramo de peso corporal por día, o de manera alternativa alrededor de 0,5 mg a alrededor de 3,5 g por paciente por día. Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Las dosis para un compuesto determinado son fácilmente determinables por parte de los expertos en la técnica mediante una diversidad de medios.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los vehículos para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una

formulación destinada a la administración oral a seres humanos puede contener de 0,5 mg a 5 g de agente activo mezclado con una cantidad adecuada y conveniente de vehículo que puede variar de alrededor del 5 a alrededor del 95 por ciento de la composición total. Las formas farmacéuticas unitarias contendrán en general entre alrededor de 1 mg a alrededor de 500 mg de un ingrediente activo, en general 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 800 mg, o 1000 mg.

Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de la administración, vía de administración, velocidad de eliminación, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.

Como tal, se pueden proporcionar formas farmacéuticas unitarias para administración oral o rectal, tales como jarabes, elixires, y suspensiones, en las que cada unidad de dosis, por ejemplo, el volumen de una cucharilla de café, una cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. De forma similar, las formas farmacéuticas unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el/los inhibidor(es) en una composición en forma de una disolución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "forma farmacéutica unitaria", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, y cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado junto con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Los requisitos para las formas farmacéuticas unitarias nuevas de la presente invención dependen del compuesto peptidomimético particular empleado y del efecto a alcanzar, y la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el hospedador.

#### KITS Y SISTEMAS

También se discuten kits y sistemas que tienen utilidad en la puesta en práctica de las realizaciones de los métodos, tales como los descritos anteriormente. El término "sistema", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una colección de dos o más agentes activos diferentes, presentes en una composición individual o por separado, que se juntan con el propósito de poner en práctica los presentes métodos. El término kit se refiere a un agente o agentes activos envasados. Por ejemplo, los kits y sistemas para poner en práctica los presentes métodos pueden incluir una o más formulaciones farmacéuticas. Como tales, en ciertos casos, los kits pueden incluir una única composición farmacéutica, presente como una o más dosis unitarias, en la que la composición puede incluir uno o más compuestos inhibidores de la expresión/actividad. En otros casos, los kits pueden incluir dos o más composiciones farmacéuticas diferentes, y cada una contiene un compuesto activo diferente.

También tienen interés los kits y los sistemas que tienen utilidad en los ensayos de la invención, p.ej., como se describió anteriormente. Tales kits y sistemas pueden incluir uno o más componentes de los ensayos, p.ej., vectores que codifican proteínas de fusión, sustratos de enzimas, tampones, etc.

Además de los componentes anteriores, los presentes kits pueden incluir además instrucciones para poner en práctica los presentes métodos. Estas instrucciones pueden estar en los presentes kits en una diversidad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que pueden estar presentes estas instrucciones es en forma de información impresa en un medio o sustrato adecuado, p.ej., un trozo o trozos de papel sobre los cuales se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto dentro del envase, etc. Otros medios serían un medio legible por ordenador, p.ej., disquete, CD, etc., en el que se ha grabado la información. Otros medios que pueden existir son una dirección de una página web que se puede usar a través de Internet para acceder a la información desde un sitio remoto. Puede haber cualquier medio adecuado en los kits.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

#### PARTE EXPERIMENTAL

##### I. Materiales y Métodos

##### A. Cepas de levadura

Todas las cepas se construyeron mediante el método de alteración de genes en una etapa, y se confirmaron mediante PCR genómica como se describió previamente (Cheng, T.H., y Gartenberg, M.R. (2000). Yeast heterochromatin is a dynamic structure that requires silencers continuously. *Genes Dev* 14, 452-46). *hsp104Δ* y *spt4Δ* se obtuvieron de células W303-1A originales sustituyendo los genes *HSP104* (cromosoma XII, coordenadas 88622-91348) y *SPT4* (cromosoma VII, coordenadas 617828-617520) respectivos con un gen *KanMX* amplificado mediante PCR. De forma similar, se generó *thp2Δ* sustituyendo el gen *THP2* (cromosoma VIII, coordenadas 439344-440129) con un gen marcador *HIS3*.

##### B. Plásmidos

La construcción pYES2-ADE2 se ha descrito previamente (Ghukasyan, V., Hsu, C.C., Liu, C.R., Kao, F.J., y Cheng,

T.H. (2010). Fluorescence lifetime dynamics of enhanced green fluorescent protein in protein aggregates with expanded polyglutamine. *J Biomed Opt* 15, 016008), y los plásmidos pYES2-25Q-eGFP y pYES2-97Q-eGFP que contenían un tramo de (CAG CAG CAA CAG CAA CAA)<sub>n</sub> que codifica residuos de poliglutamina (Meriin, A.B., Zhang, X., He, X., Newnam, G.P., Chernoff, Y.O., y Sherman, M.Y. (2002). Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J Cell Biol* 157, 997-1004) fueron amablemente proporcionados por el Dr. Michael Sherman. El marco de lectura abierto de ADE2 se amplificó mediante PCR con el uso de pYES2-ADE2 como molde, y después se usó para sustituir eGFP en pYES2-25Q-eGFP y pYES2-97Q-eGFP para crear pYES2-25Q-ADE2 y pYES2-97Q-ADE2, respectivamente. Las construcciones resultantes expresaron poliQ-ADE2 marcada con FLAG de manera N-terminal bajo control del promotor inducible por galactosa *Gal1*. Los genes indicadores se subclonaron posteriormente en pRS424. Se amplificó *SPT4* junto con su promotor endógeno (cromosoma VII, coordenadas 618321-617353) mediante PCR con el uso de ADN genómico de levadura como molde, y después se clonó en pRS415 para generar pRS415-SPT4. El plásmido RNQ1-GFP se obtuvo del Dr. Chih-Yen King. Las construcciones que expresaban poliQ-ADE2 o poliQ-eGFP con repeticiones (CAG)<sub>n</sub> se obtuvieron de pYES2-eGFP (Ghukasyan *et al.*, 2010, anteriormente mencionado). Se mezclaron oligonucleótidos, 5'-p-CAGCAGCAGCAGCAGCAG-3' (SEQ ID N°:01) y 5'-p-CTGCTGCTGCTGCTGCTG-3' (SEQ ID N°:02), y se hibridaron a temperatura ambiente, se ligaron, se amplificaron mediante PCR, y se clonaron en el sitio *Sma* I de pYES2-eGFP para generar pYES2-(CAG)<sub>n</sub>-eGFP. Los fragmentos de CAG se liberaron de estas construcciones mediante digestión con *Kpn* I y *Bam* HI, y se clonaron en pYES2-25Q-ADE2 digerido con las mismas enzimas de restricción para crear pYES2-(CAG)<sub>n</sub>-ADE2. Los genes indicadores también se subclonaron en pRS424. Para expresar poliQ-eGFP en células mamíferas, los fragmentos de ADN correspondientes se amplificaron mediante PCR con el uso de diversas formas de pYES2-(CAG)<sub>n</sub>-eGFP como moldes, y se clonaron en pTRE2hyg2-HA (BD Biosciences) para crear pTRE2-(CAG)<sub>n</sub>-eGFP. Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

#### C. Cribado de todo el genoma de levadura e identificación de inhibidores

Se llevó a cabo una mutagénesis mediada por transposones aleatorios como se describió en el sitio web del laboratorio del Dr. Snyder (sitio web en la dirección formada colocando "http://" antes de "snyderlab.stanford.edu"). Brevemente, se digirió una biblioteca de inserción mTn-lacZ/LEU2 con *Not* I y se usó para transformar células W303-1A que albergaban pRS424-97Q-ADE2. Los transformantes se recuperaron en medio YPDA rico durante 2 hr y se extendieron sobre placas de selección adecuadas. Las células se incubaron a 30 °C durante 3 días y después se replicaron en placas que contenían galactosa (2%) y adenina limitante (4 µg/ml). Después del desarrollo de color en las colonias de levaduras, se recogieron los candidatos (colonias blancas o rosas) y se confirmó la solubilidad de la proteína poliQ-Ade2 mediante un ensayo de captura en filtro. Más de 150.000 transformantes se sometieron a este cribado.

El sitio de inserción de transposón se identificó mediante PCR inversa (Scholes, D.T., Banerjee, M., Bowen, B., y Curcio, M.J. (2001)). Multiple regulators of Ty1 transposition in *Saccharomyces cerevisiae* have conserved roles in genome maintenance. *Genetics* 159, 1449-1465). El ADN genómico de los clones candidatos se aisló y digirió con *Rsa* I, seguido de ligadura de ADN y amplificación mediante PCR con el uso del grupo de cebadores inversos IN1 e IN2, seguido de secuenciación de ADN con el uso del cebador SEQ (Tabla S1, más adelante).

#### D. Anticuerpos

Se adquirieron anticuerpos hacia  $\alpha$ -tubulina (DM1A, Sigma), epitopo FLAG (M5, F4042, Sigma), Hsp104 (ab2924, Abcam), GFP (ab6556, Abcam), Supt4h (ab54350, Abcam), superóxido dismutasa MnSOD (DD-17, Sigma), Huntingtina (MAB2166, chemicon), y proteína de unión a TATA (58C6, Sigma). También se adquirió anticuerpo monoclonal anti-ARN polimerasa II (4H8-ChIP Grade, Abcam), usado para la inmunoprecipitación de la cromatina.

#### E. Análisis bioquímico

Para preparar lisados de levaduras, se recogieron 10 DO<sub>600</sub> de células, se suspendieron en tampón ESB (2% de SDS, Tris-HCl 80 mM [pH 6,8], 10% de glicerol, 1,5% de DTT) complementado con Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), seguido de trituración con esferas de vidrio. El sobrenadante se recogió en forma de un lisado bruto tras una centrifugación a baja velocidad (600 g). Todas las etapas se llevaron a cabo a 4 °C. Se lisaron neuronas cultivadas con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,1% de SDS y 1% de desoxicolato sódico) complementado con Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas.

Los lisados brutos se diluyeron 100 veces con tampón TBS (Tris HCl 20 mM [pH 7,5], NaCl 500 mM), y después se cargaron en una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm para el ensayo de captura en filtro o en membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm para un ensayo de transferencia lineal. Después de dos lavados con TBST (TBS con 0,05% de Tween 20), las membranas se retiraron del aparato Bio-Dot (Bio-Rad) y se bloquearon con PBS-T (PBS 1X, 0,2% de Triton X-100) que contenían un 5% de leche en polvo descremada, se aplicó una sonda de anticuerpos primarios durante 1 hr, se lavaron tres veces con PBS-T durante 15 min, y se incubaron con anticuerpos secundarios adecuados conjugados a peroxidasa de rábano durante otra hora. Después de tres lavados de 15 min con PBS-T, se detectaron las señales mediante el uso de Western Lighting (PerkinElmer Life Sciences).

Se separaron cantidades iguales (10 o 15 µg) de lisado de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida, seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa. La inmunotransferencia se llevó a cabo básicamente como se describió anteriormente. Para analizar las variantes de huntingtina, se usaron geles de poliacrilamida Tris-acetato para obtener una mayor resolución (Hu, J., Matsui, M., Gagnon, K.T., Schwartz, J.C., Gabillet, S., Arar, K., Wu, J., Bezprozvanny, I., y Corey, D.R. (2009). Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. *Nat Biotechnol* 27, 478-484).

#### F. Transferencia de Northern

Se aisló el ARN total de levadura mediante el uso del método de fenol ácido en caliente (Cheng y Gartenberg, 2000, anteriormente mencionado). Se cargaron 15 µg de ARN de cada muestra y se separaron en geles de agarosa del 1%, seguido de transferencia a una membrana de nailon (Schleicher & Schuell). La membrana se hibridó según las sugerencias del fabricante (DIG Northern Starter Kit, Roche) mediante el uso de sondas de poliQ y SCR1 marcadas mediante el kit de síntesis de sondas PCR DIG (Roche).

#### G. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

Se llevó a cabo la ChIP como se describió (Cheng y Gartenberg, 2000, anteriormente mencionado) con las siguientes modificaciones. Las células se recogieron (50 DO<sub>600</sub>) después de cultivarlas en un medio del 2% de galactosa durante 12 hr. Tras la fijación con formaldehído, las células se trataron con zimoliasa en sorbital 1,2 M 1 hr para facilitar la lisis celular. La cromatina se recogió, se lavó con tampón TE 0,1X, y se fragmentó mediante el uso de nucleasa microcócica (New England Biolabs). La cromatina asociada con la ARN polimerasa II se precipitó mediante un anticuerpo anti-ARN polimerasa (Abcam) unido a esferas de agarosa-proteína A (Upstate). El tampón de lavado 3 (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], LiCl 0,5 M, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato sódico, EDTA 1 mM, y 0,05% de SDS) se modificó para incrementar la rigurosidad. Se usaron grupos de cebadores de PCR (TRP1-5' y TRP1-3' para el promotor *TRP1*; ChIP prom-5' y ChIP prom-3' para el promotor *GAL1*; ChIP dn500-5' y ChIP dn500-3' para la región de ADN a 500 pb en dirección 3' de la repetición de CAG; ChIP dn1000-5' y ChIP dn1000-3' para la región de ADN a 1000 pb desde la repetición de CAG) para amplificar los respectivos dominios de ADN. Las secuencias de oligonucleótidos se enumeran en la Tabla S1 Suplementaria, más adelante.

#### H. Cultivo celular y transfección

Se cultivaron líneas celulares neuronales estriatales murinas ST14A (rata), Hdh<sup>Q7/Q7</sup> (ratón), Hdh<sup>Q111/Q111</sup> (ratón), y Hdh<sup>Q7/Q111</sup> (ratón) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (SH30022, HyClone) complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) a 33 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. ST14A se transfectó con el plásmido pTet-Off (BD Biosciences) para establecer la línea celular estable ST14A<sup>tet</sup>, que expresaba pTRE2-(CAG)<sub>n</sub>-eGFP en ausencia de tetraciclina. Se llevaron a cabo transfecciones de ADN y siARN mediante el uso de LipofectAMINE 2000 (Invitrogen). Se usaron 100 nM de siARN de Supt4h (DHARMACON, ON-TARGET plus SMART pool, L-048866-01) y (DHARMACON, J-086342-10, 5'-UGGCCUACAAUUCGAGAGAUU-3' (SEQ ID N°:03) y 5'-UCUCUCGAUUUGUAGGCCAUU-3' (SEQ ID N°:04)) para inhibir la expresión de Supt4h en células de ratón y rata, respectivamente. La transfección de una cantidad equivalente de oligonucleótidos bicatenarios hibridados (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' (SEQ ID N°:05) y 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3' (SEQ ID N°:06)) que no seleccionan como objetivo ningún gen sirvió como control.

#### I. Microscopía

Como se describió (King, C.Y., Wang, H.L., y Chang, H.Y. (2006). Transformation of yeast by infectious prion particles. *Methods* 39, 68-71), las células de levadura se transformaron con el plásmido RNQ1-GFP, seguido de cultivo en medio de cultivo que contenía CuSO<sub>4</sub> 100 nM para monitorizar los priones [*PIN*<sup>+</sup>]. La formación de agregados poliQ-eGFP se monitorizó tras la inducción génica cultivando células de levadura en un medio con un 2% de galactosa. A las 2, 4, y 8 hr, las células se montaron en una almohadilla de agarosa en un portaobjetos de una única cavidad, y se visualizó mediante el uso del microscopio de fluorescencia Axioskop 2 (Carl Zeiss) con un objetivo de inmersión en aceite 100X. Se tomaron imágenes de contraste de interferencia diferencial (CID) para el contraste de fases. De forma similar, para ST14A<sup>tet</sup>, las células se sembraron en cubreobjetos y se co-transfectaron con siARN y construcciones de plásmidos poli-eGFP. La formación de imágenes se llevó a cabo a las 24 hr.

#### J. Viabilidad celular

Este ensayo se llevó a cabo como se describió (Varma, H., Voisine, C., DeMarco, C.T., Cattaneo, E., Lo, D.C., Hart, A.C., y Stockwell, B.R. (2007). Selective inhibitors of death in mutant huntingtin cells. *Nat Chem Biol* 3, 99-100.) con modificaciones menores. Las células ST14A<sup>tet</sup> se colocaron en placas de 12 pocillos a una densidad de 1 x 10<sup>5</sup>/pocillo. Tras la co-transfección de siARN y construcciones de plásmidos pTRE2-(CAG)<sub>n</sub>-eGFP (7Q o 81Q), las células se incubaron a 33° C durante 36 hr. Los cultivos se lavaron con HBSS, el medio se sustituyó con uno de bajo contenido de suero (0,5% de FBS), y las células se incubaron a 39 °C. Al 4º día, las células se tripsinizaron y se contó el número de células viables mediante el uso del método de exclusión de colorante azul tripán.

#### K. Transcripción inversa-PCR y RT-PCR cuantitativa

5 El ARN total se aisló mediante el uso del reactivo TRI (Sigma), y una cantidad igual (5 µg) de ARN de cada muestra se convirtió en cADN mediante una transcriptasa inversa (SuperScript II, Invitrogen). Brevemente, se mezcló el ARN con oligo dT 5 µM, cebador SnRNA U6 rt-PCR 5 µM, y dNTPs 500 µM. La mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min y después se enfrió sobre hielo. Tras la adición del tampón First-Strand, DTT ( $C_f = 10$  mM) y 1 µL de transcriptasa  
 10 inversa, la reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 1 hr. Se amplificaron volúmenes equivalentes de los productos de cADN mediante PCR, y los productos se resolvieron en geles de agarosa del 2,5% para determinar los niveles relativos de transcritos con *SnRNA U6*, que sirvió como control. Los grupos de cebadores de PCR se muestran en la Tabla S1 suplementaria. La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo mediante el uso de un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystem), y se analizó mediante el uso del programa Quantitative-Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ).

L. Cebadores

Tabla S1 Suplementaria

Un resumen de los cebadores oligonucleotídicos usados en los experimentos en este estudio

PCR Inversa	secuencia
Cebador IN1	5'-TAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTTC-3'
Cebador IN2	5'-TTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATG-3'
Cebador SEQ	5'-CCCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACT-3'
Sondas de transferencia de Northern	secuencia
Cebador poliQ-5'	5'-ACTACAAGGACGACGATGAC-3'
Cebador poliQ-3'	5'-CCTCCTAATATACCAACTGTTC-3'
Cebador SCR1-5'	5'-GGCTGTAATGGCTTTCTGGTG-3'
Cebador SCR1-3'	5'-ACCAGACAGAGACGGATTC-3'
ChIP	secuencia
Cebador TRP1-5'	5'-GATGGCAGTAGTGGAAGATATTC-3'
Cebador TRP1-3'	5'-CAATGGACCAGAACTACCTGTG-3'
Cebador ChIP prom-5'	5'-TTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTC-3'
Cebador ChIP prom-3'	5'-GAAGGCCTTCATCAGCTTTTC-3'
Cebador ChIP dn500-5'	5'-TCCGGAAGCTTTGGAAGTACTG-3'
Cebador ChIP dn500-3'	5'-TAAGTTGAACGGAGTCCGGAAC-3'
Cebador ChIP dn1000-5'	5'-GGTTCCTCAGTGTACTTATATGG-3'
Cebador ChIP dn1000-3'	5'-TTTAAAACCGCACATGCGGCAG-3'
qPCR	secuencia
Cebador Tuba1a rtPCR-5'	5'-CCATTGGCAAGGAGATCATTG-3'
Cebador Tuba1a rtPCR-3'	5'-ATGGCCTCATTGTCTACCATG-3'
Cebador Tuba1a qPCR-3'	5'-CTTCCGTAATCCACAGAGAG-3'
Cebador Supt4 rtPCR-5'	5'-TCATTGCGATGATGAGTCCAG-3'
Cebador Supt4 rtPCR-3'	5'-TTTCGTGGAGTCTGCTGATTC-3'
Cebador Supt4 qPCR-3'	5'-GCTGTGTCTCTGGATTTGTAG-3'
Cebador Htt rtPCR-5'	5'-TCCTGATCAGTGAAGTGGTTC-3'
Cebador Htt rtPCR-3'	5'-GTCACACTCCAACACATAGAG-3'
Cebador SnRNA U6 rt-PCR	5'-AAAAATATGGAACGCTTCACGA-3

Cebador SnRNA U6-5'

5'-CTCGCTTCGGCAGCACATAT-3'

Cebador SnRNA U6-3'

5'-TATGGAACGCTTCACGAATTTG-3'

## II. RESULTADOS

Se cree que las proteínas que contienen tramos largos de poliQ son intrínsecamente susceptibles a un plegamiento incorrecto y a la agregación consiguiente, y se ha atribuido la pérdida de actividad de tales proteínas a tales eventos (Krobitsch, S., y Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1589-1594; Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., *et al.* (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91, 753-763). Para descubrir las posibles funciones celulares que restablecen la actividad de las proteínas de poliQ largas, se estableció un sistema genético que posibilitaba la identificación basada en el color de los clones de levadura mutantes en los que una proteína de levadura modificada para que incluyese repeticiones de poliQ prolongadas se hiciera enzimáticamente funcional. La conversión metabólica de *p*-ribosilamino imidazol (AIR) en carboxilato de *p*-ribosilamino imidazol (CAIR) está mediada en levaduras por la proteína Ade2 (Jones, E.W., y Fink, G.R. (1982). Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, J.N. Strathern, Jones, E.W., & Broach, J.R., ed. (Cold Spring Harbor NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press), págs. 181-299): en las células de levadura mutadas cromosómicamente en *ADE2*, AIR se acumula y favorece un cambio del color de las colonias de blanco a rojo (Figura 1A). Se construyó una serie de plásmidos que producían proteína Ade2 de tipo natural o proteína que contenía repeticiones cortas o largas de poliQ (25Q-Ade2 o 97Q-Ade2, respectivamente) bajo control de un promotor inducible por galactosa (Figura 1B). El color rojo característico de la deficiencia de *ade2* se invirtió mediante la expresión ectópica de la proteína Ade2 de tipo natural o 25Q-Ade2, pero no mediante la expresión de 97Q-Ade2, tal como se indica mediante la persistencia de colonias de color rojo producidas por la levadura que expresaba 97Q-Ade2 (Figura 1C). Sin embargo, en las células de levadura mutantes *ade2* que también portaban una mutación en la proteína chaperonina Hsp104, que se sabe que es necesaria para la agregación de proteínas de poliQ (Krobitsch y Lindquist, 2000, anteriormente mencionado), se descubrió que la proteína 97Q-Ade2 se volvió bioquímicamente activa (Figura 1C). Un ensayo de captura en filtro (Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., y Wanker, E.E. (1997)). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates *in vitro* and *in vivo*. *Cell* 90, 549-558) confirmó la formación de agregados de proteína 97Q-Ade2 en células *HSP104<sup>+</sup>*, pero no en *hsp104Δ* (Figura 1D). Como es característico de otras proteínas que contienen repeticiones de poliQ cortas (Krobitsch y Lindquist, 2000, anteriormente mencionado; Meriin *et al.*, 2002, anteriormente mencionado), no se observó la agregación de la proteína 25Q-Ade2 en células *HSP104<sup>+</sup>*.

A. Identificación de las mutaciones de levadura que reanudan la actividad de una proteína que contiene expansiones de poliQ largas

Se llevó a cabo un cribado fenotípico de las mutaciones de *S. cerevisiae* que posibilitan que la construcción 97Q-Ade2 produzca una proteína Ade2 enzimáticamente activa mediante el uso de mutagénesis por inserción de transposón. Este cribado identificó múltiples clones en los que el color de las colonias cambió de rojo a rosa o blanco. La síntesis de ADN mediante PCR inversa, junto con la secuenciación de nucleótidos, determinó que algunos de estos clones contuvieron lógicamente un transposón insertado en los genes que codificaban Hsp104 o la proteína priónica [*PIN<sup>+</sup>*] Rnq1, las cuales se sabe que son necesarias para la agregación de las proteínas de poliQ en levaduras (Meriin *et al.*, 2002, anteriormente mencionado). Sin embargo, el cribado también detectó un clon (clon 23-44) en el que Hsp104 y Rnq1 estuvieron intactas, y además se demostró que en este clon el transposón se había insertado en el gen que codificaba el factor de elongación de la transcripción Spt4 (Figura 1E), lo que generó la expectativa de que la pérdida de la función de *SPT4* hubiera posibilitado que la construcción 97Q-Ade2 produjera una proteína 97Q-Ade2 funcional. Esta hipótesis se confirmó introduciendo una delección de *spt4* (*spt4Δ*) en una cepa que contenía la mutación cromosómica *ade2-1*. Como se ha observado para el clon 23-44, la expresión de la proteína 97Q-Ade2 en la cepa *spt4Δ*, que como el clon 23-44 mostró una expresión normal de la proteína Hsp104 y de la proteína priónica [*PIN<sup>+</sup>*] (Figura 8), dio como resultado tanto un color rosa claro en las colonias como la formación disminuida de agregados proteicos dependientes de poliQ (Figuras 1F y 1G).

B. La mutación de *SPT4* disminuye la agregación de proteínas que contienen tramos largos de poliQ interfiriendo de manera selectiva con la transcripción del mRNA que contiene múltiples repeticiones de CAG

Las células *spt4Δ* mostraron una abundancia reducida de mRNA de 97Q-ADE2 y de la proteína de poliQ codificada por estos transcritos (Figuras 2B y 2C). Como se ha informado que el grado de la agregación de la proteína de poliQ *in vitro* está relacionado con la concentración de proteína (Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G.P., Lehrach, H., y Wanker, E.E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4604-4609), se deseó investigar si la producción disminuida de la proteína 97Q-Ade2 que se había observado en las células de levadura mutantes *spt4* era suficiente para justificar la agregación disminuida, y la funcionalidad

incrementada, de la proteína. Se varió el grado de transcripción de 97Q-ADE2 a partir del promotor GAL1 alterando la concentración de la glucosa que inhibía al promotor en el medio de cultivo (Figura 11). A medida que la expresión de 97Q-Ade2 disminuyó, la agregación se redujo de manera correspondiente, y la intensidad del color rojo en las colonias que expresaban 97Q-ADE2 disminuyó en consecuencia (Figura 11). Estos hallazgos demuestran que la agregación disminuida y la complementación concurrente de la deficiencia de *ade2* observada para la proteína 97Q-Ade2 en las células *spt4Δ* fue consecuencia de la reducción de la concentración celular de la proteína mutante.

A diferencia de las mutaciones en células de levadura que dan como resultado una reducción total de la síntesis de mRNA mediante la ARN polimerasa II (Rondon, A.G., García-Rubio, M., González-Barrera, S., y Aguilera, A. (2003). Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. EMBO J 22, 612-620), las células mutantes de *spt4* mostraron poco efecto sobre la producción del mRNA que codificaba la proteína de poliQ corta (es decir, 25Q-Ade2) (Figura 2C), o sobre el color de las colonias de levadura que portaban este gen mutante (Figuras 2B y 2A), lo que demuestra que Spt4 no es necesario para la elongación de los transcritos que contienen solamente un tramo corto de repeticiones de CAG. Se confirmó que Spt4 es necesaria de manera específica para la expresión de genes que contienen un tramo largo de repeticiones de CAG directamente mediante el uso de construcciones con genes indicadores que albergan tramos de CAG largos frente a cortos (99Q-ADE2 y 29Q-ADE2, respectivamente, Figura 10). El requerimiento de las células de levadura de Spt4 para elongar de manera específica los transcritos que tienen tramos largos de repeticiones de trinucleótidos no se limita a los transcritos que codifican Ade2: la delección de *SPT4* también dio como resultado una agregación retardada y reducida de la proteína GFP de una construcción que contenía 65 repeticiones de CAG (es decir, 65Q-eGFP) (Figura 2D).

Como Spt4, el complejo THO, que se forma mediante la interacción de las proteínas Hpr1, Mft1, Tho2, y Thp2, estimula la elongación de los transcritos mediante la ARN polimerasa II. Mientras el complejo THO es necesario para la transcripción de genes de levadura que incluyen múltiples secuencias repetidas en tándem (Voynov, V., Verstrepen, K.J., Jansen, A., Runner, V.M., Buratowski, S., y Fink, G.R. (2006). Genes with internal repeats require the THO complex for transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 14423-14428), THO y Spt4 afectan a la procesividad de la ARN polimerasa II mediante diferentes mecanismos (Mason, P.B., y Struhl, K. (2005). Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II *in vivo*. Mol Cell 17, 831-840). En contraste con las células *spt4Δ*, se descubrió que las células deficientes en complejo THO (es decir, *thp2Δ*) mostraron una producción gravemente alterada de la proteína Ade2 que contenía repeticiones 25Q, así como de la variante de Ade2 que contenía repeticiones 97Q (Figura 2E), y no pudieron mostrar la complementación de la deficiencia de *ade2* mediante ninguna de las construcciones expresadas de manera adventicia (Figura 2F). Estos resultados indican que, a diferencia de Spt4, THO no diferencia entre los transcritos que contienen tramos cortos frente a los largos de la repetición de trinucleótidos de CAG, y que la deficiencia de THO da como resultado un defecto general en la síntesis de la proteína de poliQ.

Se ha informado que la mutación en *SPT4* afecta especialmente a la transcripción de genes de elevado contenido en GC (Rondon *et al.*, 2003, anteriormente mencionado), y se plantea la hipótesis de que los tramos largos de repeticiones de CAG puedan crear una barrera local para la ARN polimerasa II, que se supera mediante las acciones del factor de elongación de la transcripción codificado por este gen. Mediante el uso de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para analizar la ocupación de la ARN polimerasa II en diferentes segmentos de moldes de ADN, se descubrió que la cantidad de enzima unida a secuencias de transcritos en posición 3' de un tramo de 99 repeticiones de CAG se redujo por la deficiencia de *spt4*, mientras la ocupación de segmentos de ADN en posición 5' o 3' de un segmento de 29 repeticiones de CAG fue similar en las células *SPT4<sup>+</sup>* y *spt4Δ* (Figura 3). A partir de este hallazgo se concluyó que Spt4 es prescindible para el paso de la maquinaria transcripcional a través de una región que contiene un tramo corto de repeticiones de CAG, pero es necesario para que la polimerasa prosiga a través de una expansión larga de la secuencia de repeticiones de CAG.

C. La mutación de *SPT4* aumenta la función de la proteína normal que contiene tramos de poliQ cortos disminuyendo su co-agregación con la proteína de poliQ larga presente simultáneamente

La interacción entre proteínas que contienen una repetición de poliQ expandida con proteínas que contienen un tramo corto no patógeno de poliQ da como resultado la co-agregación de proteínas de poliQ cortas y largas en células de mamífero y de levadura (Duennwald, M.L., Jagadish, S., Giorgini, F., Muchowski, P.J., y Lindquist, S. (2006). A network of protein interactions determines polyglutamine toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 11051-11056; Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D., y Housman, D. (1999). Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 11404-11409). Para investigar si la reducción de la agregación de proteínas de poliQ largas por la deficiencia de *spt4* puede afectar a la proteína de poliQ normal presente simultáneamente, se co-expresó 99Q-Ade2 junto con 29Q-Ade2 marcada en el extremo C-terminal con hemaglutinina (29Q-Ade2-HA), y se examinó el efecto de la mutación de *SPT4* sobre la función de Ade2 en el ensayo colorimétrico y sobre la co-agregación de las proteínas. Como se describió anteriormente, en las células W303-1A de tipo natural, la expresión de 29Q-Ade2-HA o 29Q-Ade2 o ambas dio como resultado colonias de color blanco. Sin embargo, se observó un color rojo cuando se co-expresó 29Q-Ade2-HA con 99Q-Ade2 (Figura 4A), que recuerda a las células que expresaban 99Q-Ade2 solo (Figura 10), lo que indica que 99Q-Ade2 es dominante fenotípicamente sobre 29Q-Ade2-HA. De acuerdo con esta conclusión, 29Q-Ade2-HA, que normalmente es soluble en ausencia de la proteína de poliQ larga, estuvo presente en los agregados celulares formados en las células que expresaban 99Q-Ade2 (Figura

4B). El efecto de la expresión de 99Q-Ade2 sobre la 29Q-Ade2-HA presente simultáneamente se redujo enormemente por la deficiencia de *spt4*, como se reveló mediante el cambio de color de las colonias de rojo a blanco (Figura 4A). Además, el grado total de agregación de 29Q-Ade2-HA disminuyó sustancialmente en células mutantes *spt4* (Figura 4B), mientras las cantidades de proteína y mRNA correspondientes no se alteraron por la carencia de Spt4 (Figuras 4B y 4C). Estos resultados demuestran que la regulación selectiva de la producción de la proteína codificada por los genes que contienen tramos largos de repeticiones de trinucleótidos de CAG mediante Spt4 además puede afectar indirectamente a la agregación y al funcionamiento de la proteína codificada por un alelo coexistente que contiene repeticiones de CAG cortas.

D. Supt4h, un ortólogo de mamífero de Spt4, afecta a la abundancia y la agregación de las proteínas de poliQ en neuronas

*SPT4* está muy conservada entre las células de levadura y de mamífero, y los defectos de *spt4* en levadura se pueden complementar funcionalmente mediante el ortólogo de células de mamífero *Supt4h* (Hartzog, G.A., Basrai, M.A., Ricupero-Hovasse, S.L., Hieter, P., y Winston, F. (1996). Identification and analysis of a functional human homolog of the SPT4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2848-2856). Mediante el uso de siARN para reducir la expresión de Supt4h en la línea celular estriatal murina ST14A (Ehrlich, M.E., Conti, L., Toselli, M., Taglietti, L., Fiorillo, E., Taglietti, V., Ivkovic, S., Guinea, B., Tranberg, A., Sipione, S., *et al.* (2001). ST14A cells have properties of a medium-size spiny neuron. *Exp Neurol* 167, 215-226), se descubrió que en una población de células que mostraban aproximadamente un 60% de inhibición de Supt4h, el número de células que mostraban focos eGFP-positivos agregados disminuyó aproximadamente a la mitad (Figuras 5A y 5B), que se redujo la abundancia celular de una proteína GFP que contenía un tramo de 81 aminoácidos de poli Q (es decir, 81Q-eGFP), y que la agregación total de la proteína eGFP disminuyó un 65% (Figura 5C), en comparación con una población de células transfectadas con un siARN de control negativo. En contraste, la expresión de 7Q-eGFP se vio afectada solamente mínimamente por la inactivación de *Supt4h* (Figuras 5A, 5B, y 5C), lo que sugiere que otros componentes de elongación de la transcripción pueden compensar en gran medida la ausencia de Supt4h para posibilitar la transcripción de mensajes que codifican poliQ cortas. Como la agregación de proteínas que contienen tramos de poliQ expandidos es tóxica para las células neuronales (Li, H., Li, S.H., Johnston, H., Shelbourne, P.F., y Li, X.J. (2000). Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet* 25, 385-389; Varma, H., Voisine, C., DeMarco, C.T., Cattaneo, E., Lo, D.C., Hart, A.C., y Stockwell, B.R. (2007). Selective inhibitors of death in mutant huntingtin cells. *Nat Chem Biol* 3, 99-100), se planteó la cuestión de si se incrementó la supervivencia celular mediante la atenuación de la agregación de poliQ por medio de la inactivación de *Supt4h*. Se transfectaron células ST14A con construcciones de poliQ-eGFP en presencia o ausencia de siARN de Supt4h. Como se observa en la Figura 5D, la viabilidad reducida de las células ST14A que expresaban de manera adventicia la proteína 81Q-eGFP se invirtió mediante siARN dirigido contra *Supt4h*, y tal siARN no tuvo un efecto detectable sobre la viabilidad de las células que producen la proteína 7Q-eGFP.

Para investigar el efecto de la inactivación de *Supt4h* específicamente sobre la producción de *huntingtina* (*Htt*), se analizaron neuronas estriatales derivadas de ratones con activación de Hdh<sup>Q7/Q7</sup> y Hdh<sup>Q111/Q111</sup> homocigotos (Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V.C., Sharp, A.H., Persichetti, F., Cattaneo, E., y MacDonald, M.E. (2000). Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet* 9, 2799-2809) tras la inactivación de *Supt4h* mediante siARN. Tanto la RT-PCR como la RT-PCR cuantitativa en tiempo real mostraron que la abundancia de mRNA de *Htt*<sup>Q7</sup> solamente disminuyó ligeramente en las células tratadas con siARN dirigido contra *Supt4h*, al igual que la abundancia de mRNA de  $\alpha$ -*Tubulina* en las células deficientes en factor de elongación. Sin embargo, la abundancia del mRNA de *Htt*<sup>Q111</sup> mutante se redujo sustancialmente (Figuras 6A y 6B) en las células que tuvieron una reducción similar de mRNA de *Supt4h*. De manera concurrente con la reducción observada de mRNA de *Htt*<sup>Q111</sup>, la proteína Htt<sup>Q111</sup> disminuyó; sin embargo, la producción de Htt<sup>Q7</sup> y Tbp, que contienen solamente tramos cortos de glutamina, no se vio afectada de manera detectable por la inhibición de Supt4h (Figura 6C). De manera importante, la inactivación de *Supt4h* en células Hdh<sup>Q7/Q111</sup> heterocigotas demostró que las proteínas Htt<sup>Q111</sup> y Supt4h se redujeron de manera concomitante en presencia de siARN de Supt4h, pero que el mismo grado de inactivación de *Supt4h* tuvo poco efecto sobre la expresión de Htt<sup>Q7</sup> (Figura 6D). Estos hallazgos demuestran que Supt4h es necesaria de manera diferencial para la expresión del alelo de *Htt* mutante en neuronas estriatales de ratón.

### III. DISCUSIÓN

Las investigaciones, que revelan un papel específico para los factores de elongación de la transcripción Spt4 y Supt4h en la expresión de genes que contienen repeticiones de trinucleótidos largas, ofrecen una aproximación a la reducción de las proteínas en agregación afectadas por los transcritos de repeticiones de trinucleótidos largos mientras todavía se posibilita la síntesis prácticamente normal de la proteína codificada por otros mARNs. Aunque se ha propuesto que las proteínas que contienen tramos de poliQ prolongados son intrínsecamente susceptibles al plegamiento incorrecto (Krobitsch y Lindquist, 2000, anteriormente mencionado; Ordway *et al.*, 1997, anteriormente mencionado), los resultados indican que las proteínas de poliQ largas pueden plegarse de manera lo suficientemente adecuada para exhibir actividad enzimática si su producción se reduce simplemente hasta un nivel lo suficientemente bajo para disminuir su agregación. En levaduras, se ha demostrado que se puede reducir la síntesis de proteínas que contienen repeticiones de poliQ largas mediante la deficiencia de *spt4* hasta un nivel que restablezca la funcionalidad de la proteína. En tales condiciones, la proteína de poliQ sin agregación puede

complementar la deficiencia de *ade2* en el ensayo que se usó para identificar los loci que afectan a la función de la proteína que contiene repeticiones de poliQ prolongadas. Se ha demostrado adicionalmente que los efectos de Spt4 (Supt4h) sobre las células de levadura y mamífero son específicos del alelo: la deficiencia de Spt4 reduce de manera específica la capacidad de la ARN polimerasa II de continuar a lo largo de tramos prolongados de repeticiones de CAG, y reduce la abundancia de las proteínas codificadas por estos transcritos sin afectar significativamente a los transcritos de un alelo de *Htt* no mutante coexistente. Como *Htt* es necesaria en la etapa embrionaria y para la función neurológica normal en adultos (Dragatsis, I., Levina, M.S., y Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26, 300-306; Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., y Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823), la capacidad de reducir de manera diferencial la neurotoxicidad de la proteína Htt mutante beneficiará a los pacientes de EH, y los inhibidores de moléculas pequeñas de Supt4h son una aproximación viable para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Scherzinger *et al.* (1999, anteriormente mencionado) descubrió que la formación de agregados de la proteína huntingtina similares al amiloide *in vitro* no se dio hasta que la concentración de monómero superó un nivel crítico. Los presentes resultados establecen que la concentración de proteínas que contienen tramos de poliQ largos también es un determinante crucial de la capacidad de estas proteínas de experimentar una agregación patológica *in vivo*, y además demuestran el valor de la disminución de la proteína de poliQ larga hasta una concentración en la que disminuye la agregación y se restablece la funcionalidad. De manera importante, también se ha descubierto que la co-agregación previamente observada (Duenwald *et al.*, 2006, anteriormente mencionado) de una proteína de poliQ corta normal con una proteína de poliQ expandida que se ha producido mediante un segundo alelo en la misma célula se redujo rápidamente mediante una disminución de la abundancia de la proteína variante de poliQ larga. Así, la reducción de la abundancia de la proteína Htt mutante mediante la interferencia con la función de Supt4h no solamente puede disminuir los efectos tóxicos directos de la agregación de la proteína mutante, sino que también puede posibilitar una funcionalidad incrementada de la proteína de tipo natural coexistente.

La Supt4h humana normalmente forma un complejo con Supt5h, al igual que su ortólogo de levadura, para regular la elongación de la transcripción (Guo, M., Xu, F., Yamada, J., Egelhofer, T., Gao, Y., Hartzog, G.A., Teng, M., y Niu, L. (2008). Core structure of the yeast spt4-spt5 complex: a conserved module for regulation of transcription elongation. *Structure* 16, 1649-1658; Hatzog *et al.*, 1998, anteriormente mencionado; Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., *et al.* (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* 12, 343-356; Wenzel, S., Martins, B.M., Rosch, P., y Wohrl, B.M. (2009). Crystal structure of the human transcription elongation factor DSIF hSpt4 subunit in complex with the hSpt5 dimerization interface. *Biochem J* 425, 373-380). Este complejo se une al dominio de hélice superenrollada de la ARN polimerasa II y rodea el ADN para favorecer la procesividad (Klein, B.J., Bose, D., Baker, K.J., Yusoff, Z.M., Zhang, X., y Murakami, K.S. (2011). RNA polymerase and transcription elongation factor Spt4/5 complex structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 546-550; Martínez-Rucobo, F.W., Sainsbury, S., Cheung, A.C., y Cramer, P. (2011). Architecture of the RNA polymerase-Spt4/5 complex and basis of universal transcription processivity. *EMBO J* 30, 1302-1310). En particular, los efectos de *spt4Δ* sobre la expresión génica de poliQ se pueden recapitular mediante un único mutante de *spt5* que no puede interactuar con su molécula de unión Spt4 (Figura 11). Así, un complejo Spt4/5 intacto para la elongación de la transcripción es crucial para la producción de mARNs que codifican una poliQ expandida. Como *SPT4* no es un gen esencial (Malone, E.A., Fassler, J.S., y Winston, F. (1993). Molecular and genetic characterization of SPT4, a gene important for transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 237, 449-459) y la proteína que codifica no entra en contacto directamente con la ARN polimerasa, como se reveló mediante análisis de la estructura cristalina, es probable que Spt4 funcione como un "soporte de ADN en 5'" que estabiliza los complejos de polimerasa/molde mediante la unión al ADN de manera externa a la burbuja de transcripción (Klein *et al.*, 2011, anteriormente mencionado; Martínez-Rucobo *et al.*, 2011, anteriormente mencionado). Un dominio de dedos de zinc en Spt4 media en esta interacción proteína-ADN, y las mutaciones puntuales que inhabilitan este dominio tienen el mismo efecto sobre la expresión génica de poliQ larga que la delección de *SPT4* (datos no mostrados), lo que sugiere que las acciones estabilizantes del complejo de Spt4 son importantes para la transcripción de la ARN polimerasa II a través de las regiones del molde que contienen múltiples repeticiones de CAG.

Durante estas investigaciones, se descubrió que un tramo largo de repeticiones de CAG reduce la abundancia del transcrito en células de levadura y de mamífero. De manera específica, incluso en presencia de Supt4h, los transcritos del alelo *Htt* mutante se produjeron de manera mucho menos eficaz que los transcritos de tipo natural en neuronas de ratones con activación génica, así como en fibroblastos de pacientes de EH (Figura 6A y Figura 12). *In vitro*, se ha demostrado que las repeticiones de CAG expandidas forman estructuras de ADN de tipo tallo-bucle o de orden superior (Lenzmeier, B.A., y Freudenreich, C.H. (2003). Trinucleotide repeat instability: a hairpin curve at the crossroads of replication, recombination, and repair. *Cytogenet Genome Res* 100, 7-24), lo que provoca que la ARN polimerasa II se detenga temporalmente y se disocie del molde. Los datos demuestran que el bloqueo transcripcional planteado por tal barrera estructural se ve afectado por la longitud de la secuencia de repeticiones. Los resultados demuestran que en ausencia de la función de Spt4, se incrementa la disociación de la ARN polimerasa del molde en las regiones de repeticiones de CAG prolongadas, lo que da como resultado 1) la reducción

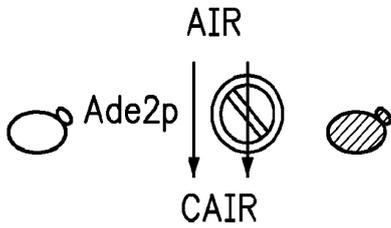
de la polimerasa unida al molde en posición distal a la repetición prolongada, 2) una disminución global de la abundancia de transcrito, 3) una producción reducida de la proteína de poliQ larga, y 4) una agregación disminuida de esta proteína. Este modelo mecanístico, que se muestra en la Figura 7, proporciona una base molecular para las contramedidas hacia EH que seleccionan como objetivo la función de Supt4h.

- 5 El trabajo reciente ha demostrado que también se puede llevar a cabo la reducción específica de alelo de la abundancia de Htt mutante mediante el uso de aproximaciones basadas en ARNi (Hu, J., Matsui, M., Gagnon, K.T., Schwartz, J.C., Gabillet, S., Arar, K., Wu, J., Bezprozvanny, I., y Corey, D.R. (2009). Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs. *Nat Biotechnol* 27, 478-484; Pfister, E.L., Kennington, L., Straubhaar, J., Wagh, S., Liu, W., DiFiglia, M., Landwehrmeyer, B., Vonsattel, J.P., Zamore, P.D., y Aronin, N. (2009). Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Curr Biol* 19, 774-778; van Bilsen, P.H., Jaspers, L., Lombardi, M.S., Odekerken, J.C., Burrell, E.N., y Kaemmerer, W.F. (2008). Identification and allele-specific silencing of the mutant huntingtin allele in Huntington's disease patient-derived fibroblasts. *Hum Gene Ther* 19, 710-719; Zhang, Y., Engelman, J., y Friedlander, R.M. (2009). Allele-specific silencing of mutant Huntington's disease gene. *J Neurochem* 108, 82-90), o seleccionando como objetivo la proteína mutante para la degradación mediante una proteína de fusión modificada que comprende un péptido de unión a poliglutamina 1 (QBP1) y dos motivos de unión diferentes a la proteína cognada de choque térmico 70 (HSC70) (Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., *et al.* (2010). Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* 28, 256-263). Sin embargo, las pruebas recientes sugieren que los siARNs que contienen repeticiones de trinucleótidos pueden contribuir de hecho a los efectos tóxicos de las repeticiones de CAG prolongadas de los mARNs (Yu, Z., Teng, X., y Bonini, N.M. (2011). Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a *Drosophila* model for myotonic dystrophy. *PLoS Genet* 7, e1001340). Además, parece probable que el potencial terapéutico del siARN y las aproximaciones basadas en la fusión de proteínas se limite por la incapacidad de estos agentes de pasar a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Lichota, J., Skjorringe, T., Thomsen, L.B., y Moos, T. (2010). Macromolecular drug transport into the brain using targeted therapy. *J Neurochem* 113, 1-13). Los inhibidores de moléculas pequeñas de Supt4h que son accesibles para el cerebro superarán estas limitaciones.

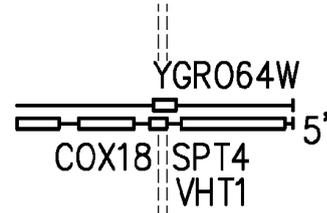
Además, todos los ejemplos y términos condicionales utilizados en la presente memoria pretenden principalmente ayudar al lector a entender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para avanzar en la técnica, y se deben considerar sin limitación con respecto a tales ejemplos y condiciones enumerados de manera específica. Además, todas las exposiciones en la presente memoria que enumeran principios, aspectos, y realizaciones de la invención, así como ejemplos específicos de los mismos, pretenden abarcar los equivalentes estructurales y funcionales de los mismos. Además, se pretende que tales equivalentes incluyan tanto los equivalentes conocidos en la actualidad como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que lleve a cabo la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las realizaciones ejemplares mostradas y descritas en la presente memoria. En su lugar, el alcance de la presente invención se plasma mediante las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

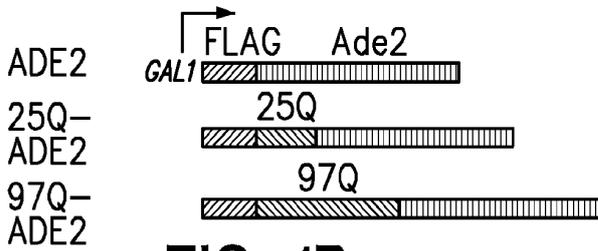
- 5 1. Un agente para el uso en la modificación de la progresión en un sujeto de una enfermedad que surge de un gen que contiene un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, en el que la administración al sujeto de una cantidad eficaz del agente reduce de manera selectiva una actividad transcripcional mediada por SPT4, para reducir de manera selectiva la actividad perjudicial del gen para modificar la progresión de la enfermedad en el sujeto.
2. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el agente modula la actividad de una proteína codificada por el gen que comprende el dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes.
- 10 3. El agente para el uso según la reivindicación 2, en el que el impacto perjudicial del gen es la toxicidad de la proteína, y el agente reduce la toxicidad de la proteína en la célula.
4. El agente para el uso según la reivindicación 2, en el que el impacto perjudicial del gen es la pérdida de la función de la proteína, y el agente aumenta la funcionalidad de la proteína en la célula.
5. El agente para el uso según la reivindicación 2, en el que el agente modula de manera selectiva la actividad perjudicial de la proteína codificada por el gen tras la expresión.
- 15 6. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el dominio de repeticiones de trinucleótidos mutantes está presente en una región codificante del gen.
7. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el dominio de repeticiones de trinucleótidos mutantes está presente en una región no codificante del gen.
- 20 8. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes es un dominio de repeticiones de CAG o CTG.
9. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el agente se selecciona de un agente de molécula inversa, un agente de ARNi, un agente que interfiere con la unión de factores de transcripción a una secuencia promotora del gen SPT4, un compuesto de ácido nucleico catalítico y un mutante de SPT4 negativo dominante.
- 25 10. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes comprende 35 o más repeticiones de CAG.
11. El agente para el uso según la reivindicación 1, en el que el gen es un gen *HTT*.
12. Un método para analizar si un compuesto de ensayo modula la actividad de una proteína codificada por un gen objetivo que comprende un dominio de repeticiones de trinucleótidos prolongadas mutantes, y el método comprende:  
 30 cribar el compuesto con una célula que comprende un sistema productor de señales acoplado de forma operable a una proteína SPT4 para analizar si el compuesto modula de manera selectiva la actividad de la proteína SPT4 y modula la actividad de la proteína codificada por el gen objetivo.



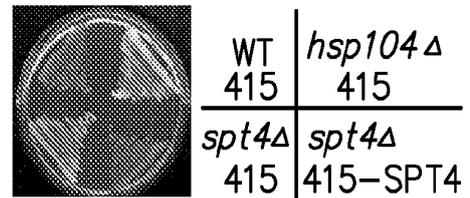
**FIG. 1A**



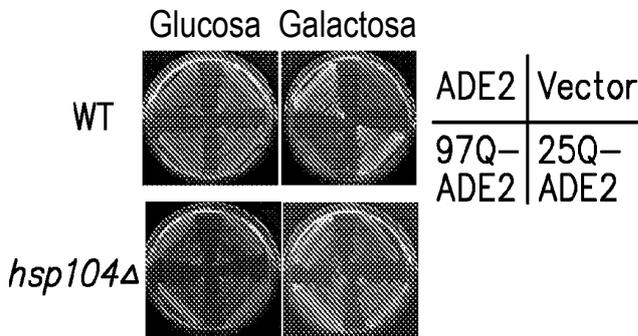
**FIG. 1E**



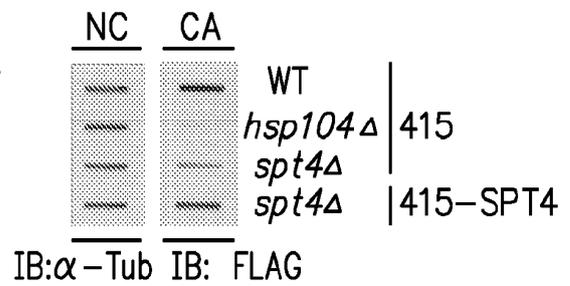
**FIG. 1B**



**FIG. 1F**



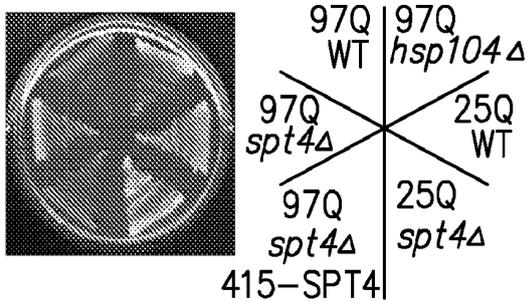
**FIG. 1C**



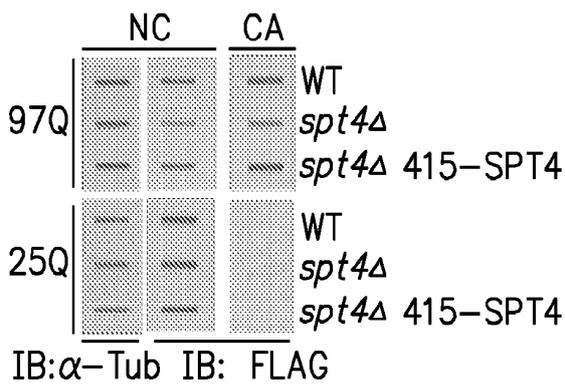
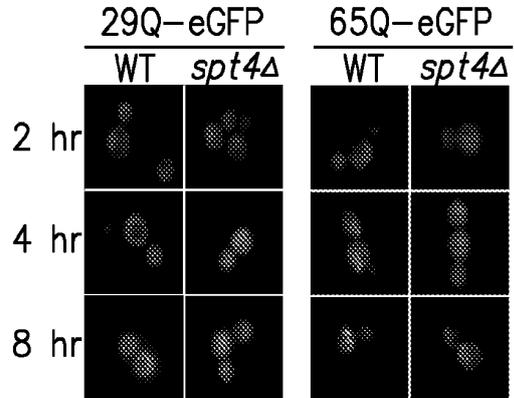
**FIG. 1G**



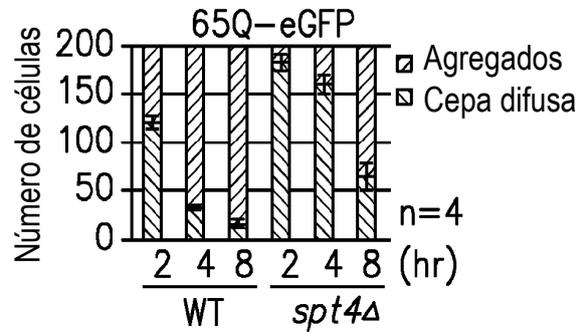
**FIG. 1D**



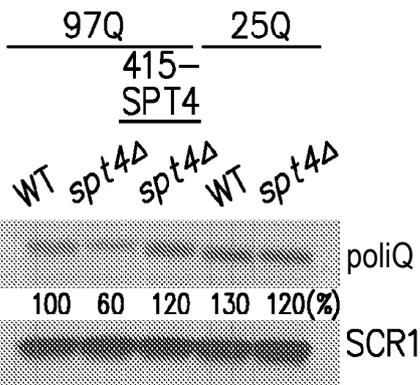
**FIG. 2A**



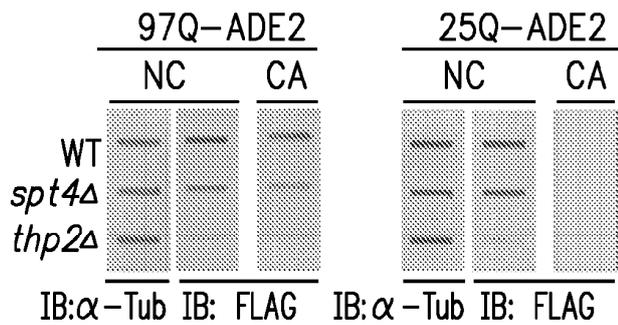
**FIG. 2B**



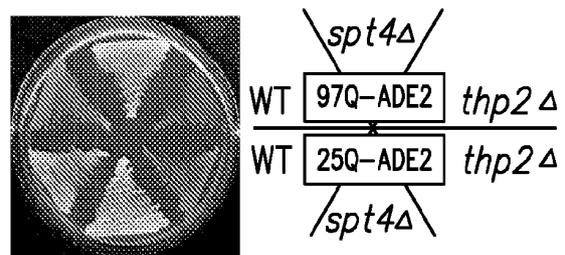
**FIG. 2D**



**FIG. 2C**



**FIG. 2E**



**FIG. 2F**

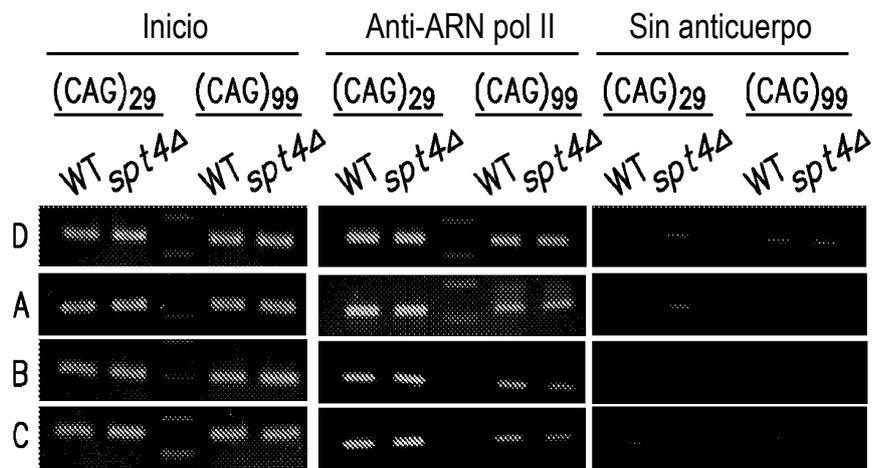
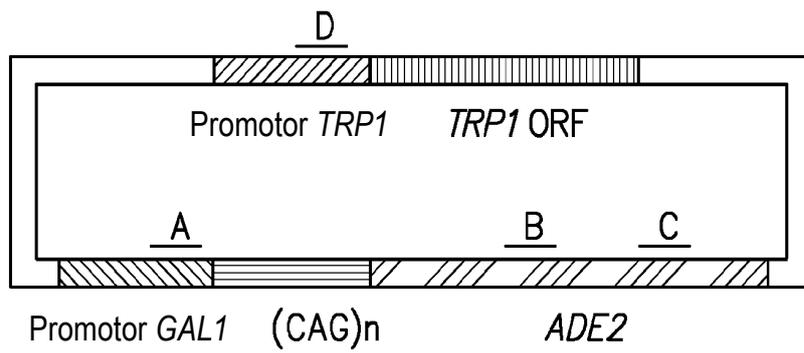
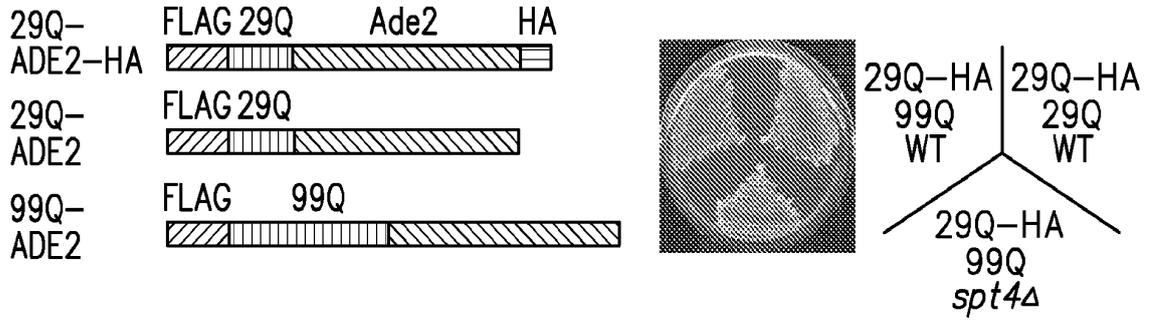
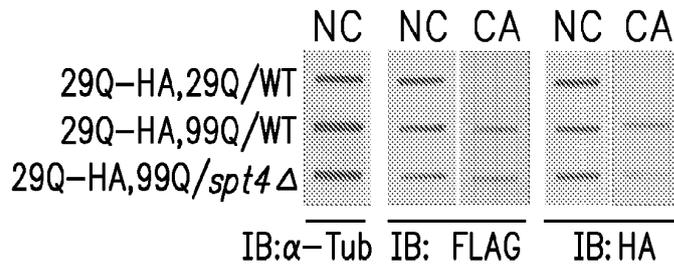


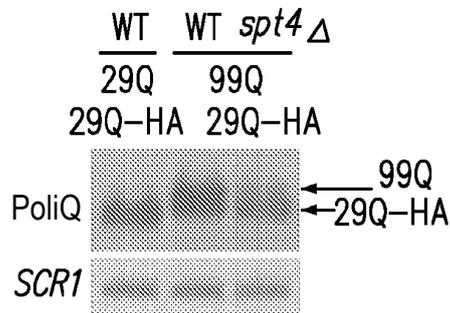
FIG. 3



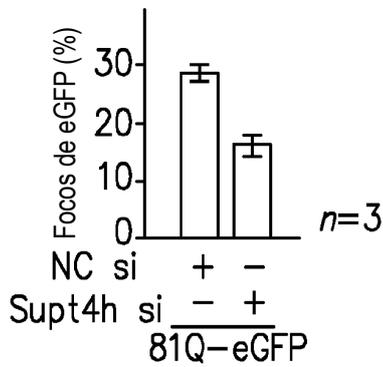
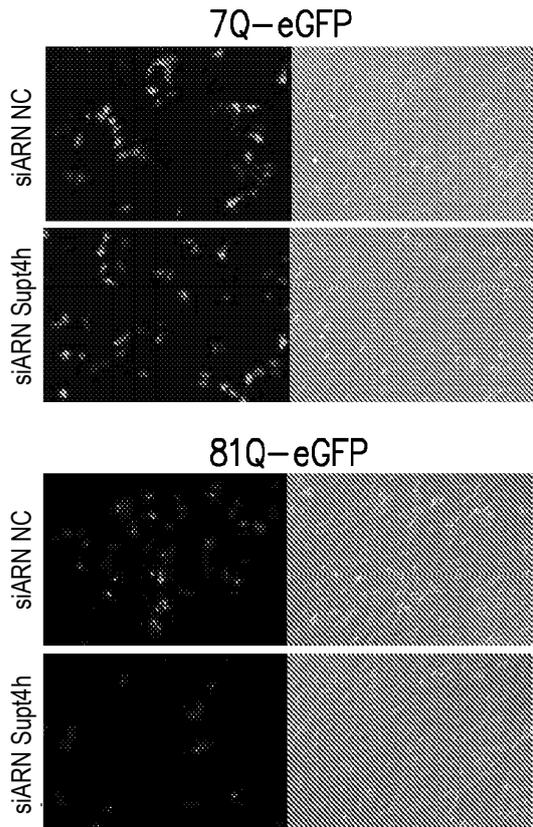
**FIG. 4A**



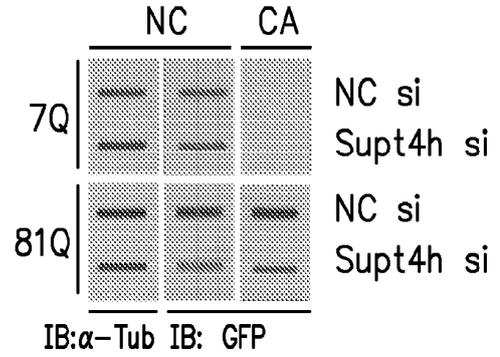
**FIG. 4B**



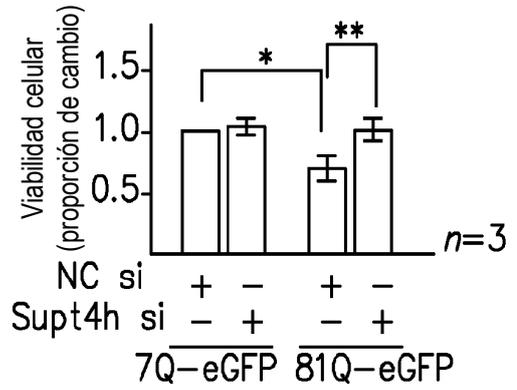
**FIG. 4C**



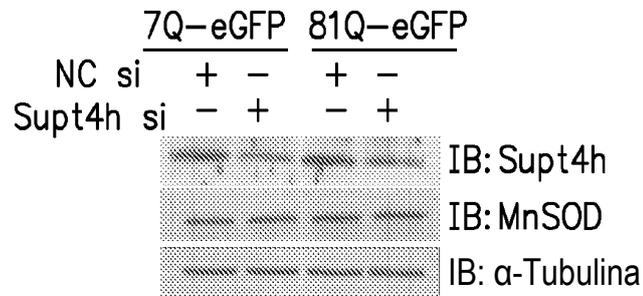
**FIG. 5A**



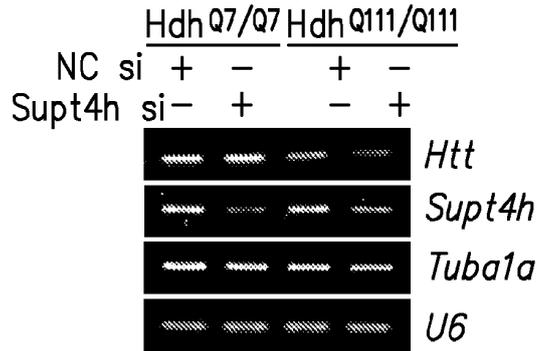
**FIG. 5C**



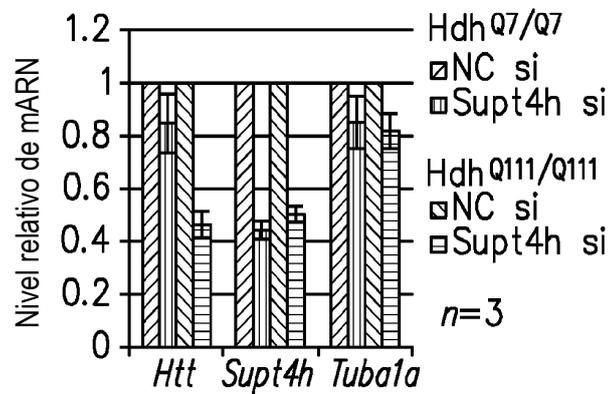
**FIG. 5D**



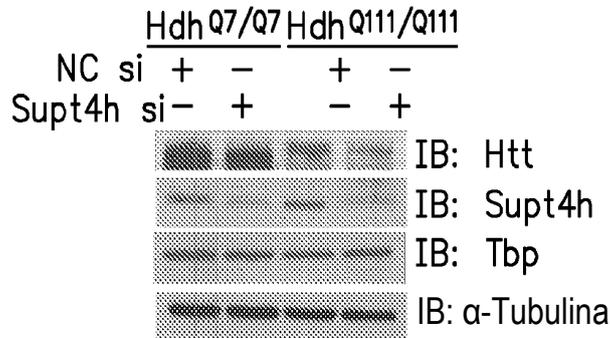
**FIG. 5B**



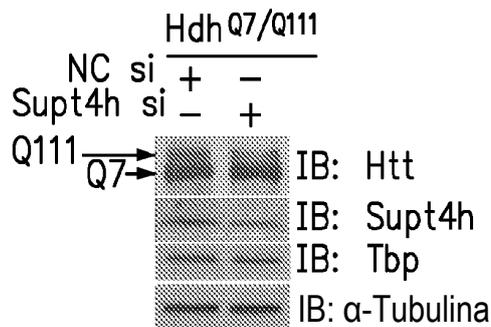
**FIG. 6A**



**FIG. 6B**



**FIG. 6C**



**FIG. 6D**

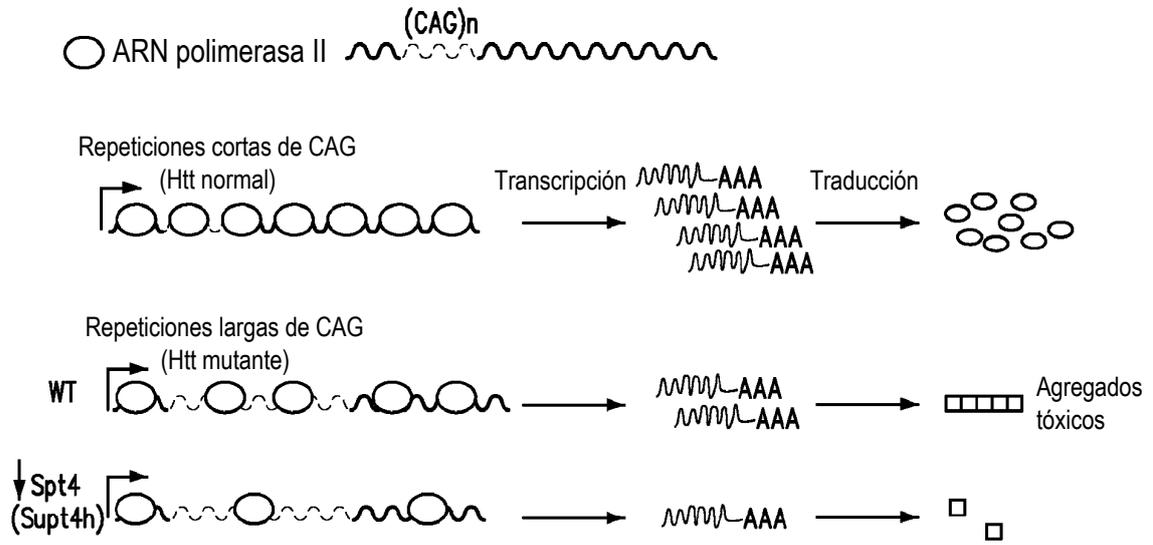


FIG. 7

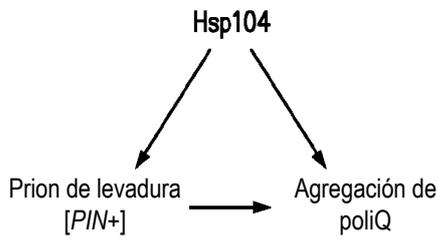


FIG. 8A

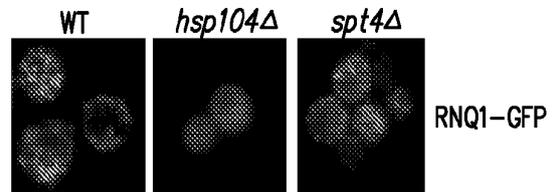


FIG. 8B

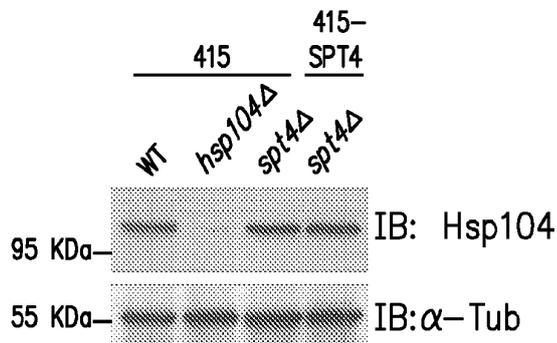
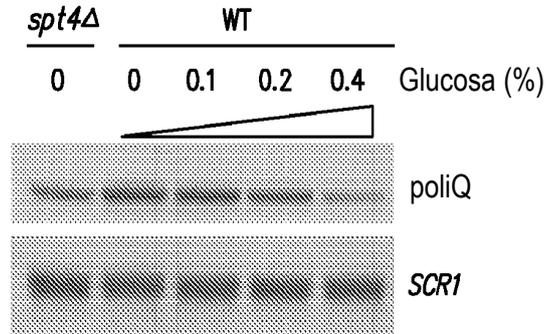
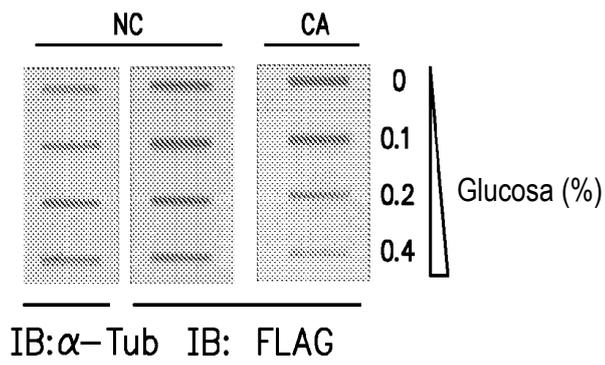


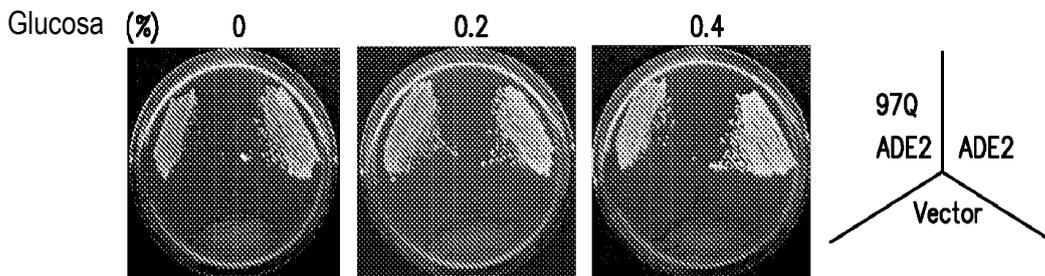
FIG. 8C



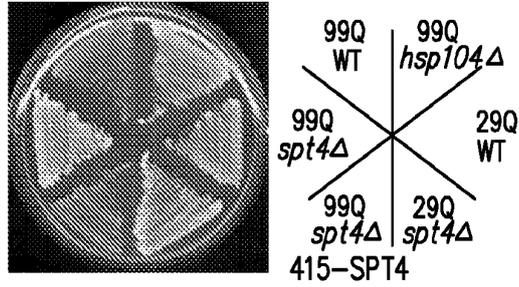
**FIG. 9A**



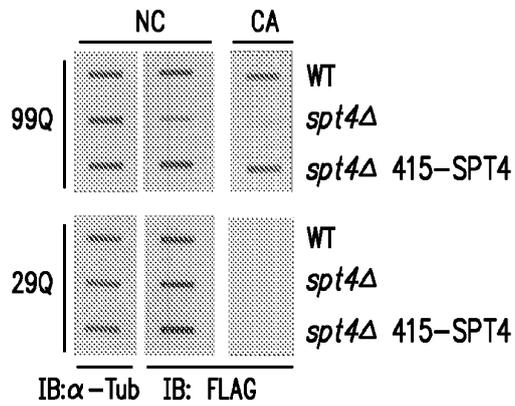
**FIG. 9B**



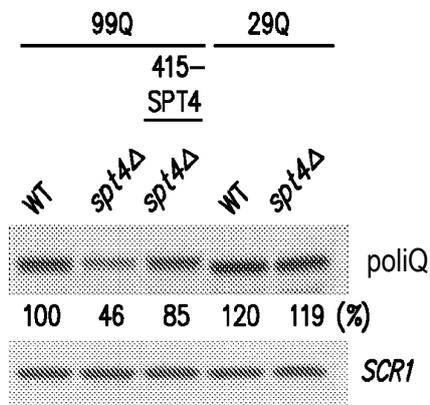
**FIG. 9C**



**FIG. 10A**



**FIG. 10B**



**FIG. 10C**

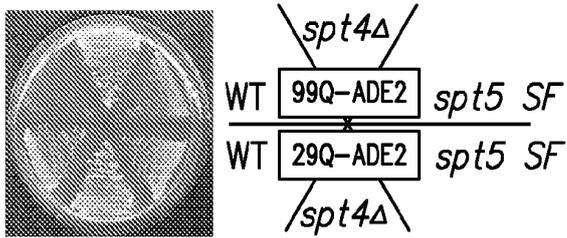


FIG. 11A

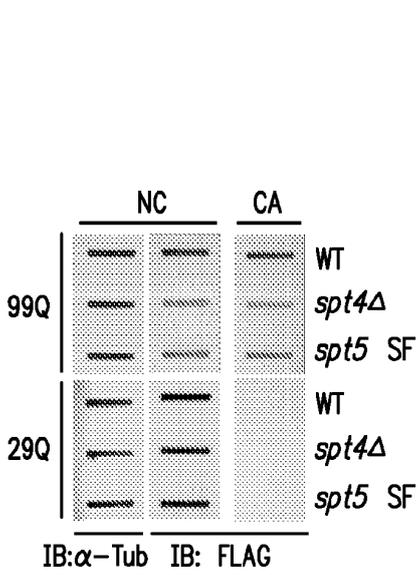


FIG. 11B

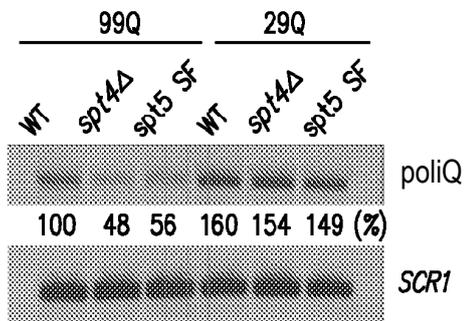


FIG. 11C

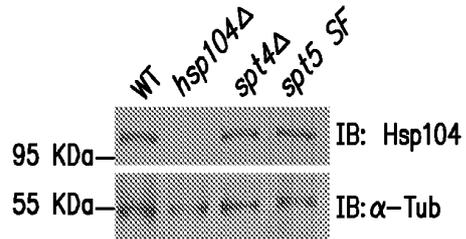


FIG. 11D

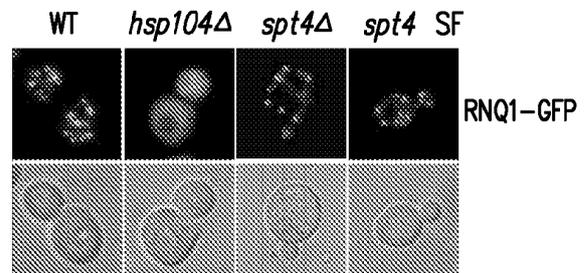


FIG. 11E

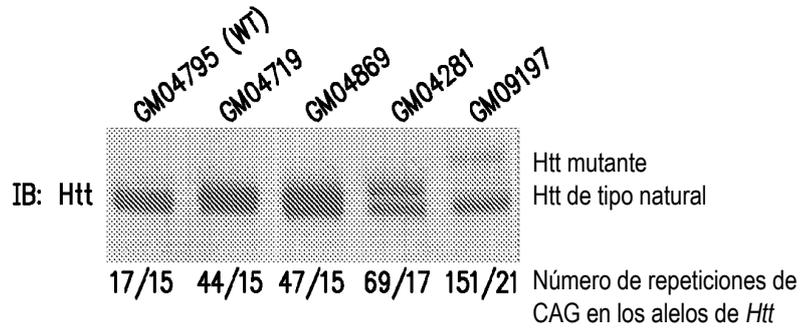


FIG. 12A

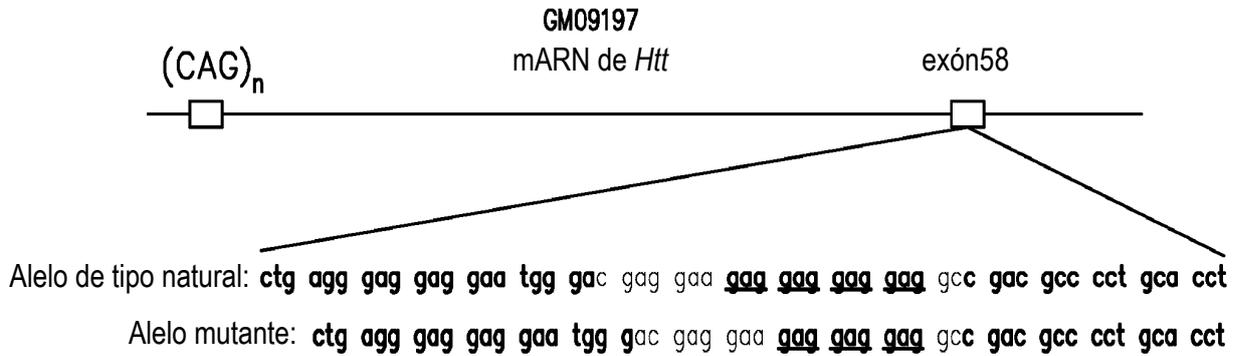


FIG. 12B

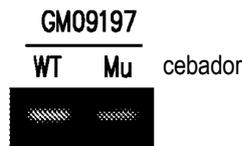
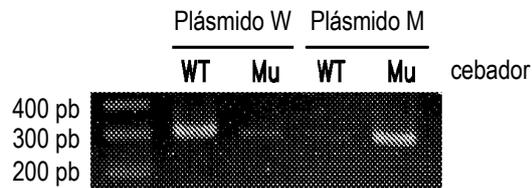


FIG. 12C