

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 452**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2016** **PCT/EP2016/050678**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016** **WO16113357**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2016** **E 16700619 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 3244909**

54 Título: **Inhibidores del proteasoma para tratar un trastorno relacionado con una acumulación de proteína anómala no degradada o un cáncer**

30 Prioridad:

14.01.2015 EP 15305026

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (16.7%)
58 boulevard Charles Livon
13007 Marseille, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE
MARSEILLE (16.7%);
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (16.7%);
ASSOCIATION FRANCAISE CONTRE LES
MYOPATHIES (16.7%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (16.7%) y
PROGELIFE (16.7%)

72 Inventor/es:

LEVY, NICOLAS;
CAU, PIERRE;
DE SANDRE-GIOVANNOLI, ANNACHIARA;
HARHOURI, KARIM;
PERRIN, SOPHIE;
NAVARRO, CLAIRE;
CHARTIER, AYMERIC y
SIMONELIG, MARTINE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 764 452 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

Inhibidores del proteasoma para tratar un trastorno relacionado con una acumulación de proteína anómala no degradada o un cáncer

5

Sector de la técnica

La divulgación se refiere al uso de inhibidores del proteasoma en el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, tal como progerina y/o prelamina A farnesilada y, particularmente, un trastorno de envejecimiento prematuro ligado a estas proteínas anómalas anteriores.

10

La divulgación también se refiere al uso dermatológico, dermocosmético o cosmético de un inhibidor del proteasoma para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel ligado a progerina y/o prelamina A farnesilada. La divulgación también se refiere al uso de un inhibidor del proteasoma para atenuar el envejecimiento fisiológico ligado a progerina y/o prelamina A farnesilada.

15

La divulgación también se refiere al uso de inhibidores del proteasoma en el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la edad y sus consecuencias metabólicas asociadas con la presencia y/o acumulación de progerina y/o prelamina A farnesilada, en particular en tejidos que incluyen la piel, tejido adiposo, hueso, vasos sanguíneos incluyendo células endoteliales y del músculo liso vascular y sus consecuencias patológicas sobre la piel, el corazón, el cerebro o los riñones.

20

La divulgación también se refiere al uso de inhibidores del proteasoma en el tratamiento de trastornos asociados con la presencia y/o acumulación de proteína tóxica durante enfermedad genética neurodegenerativa y/o muscular.

25

La divulgación también se refiere al uso de inhibidores del proteasoma en el tratamiento de trastornos asociados con la sobreexpresión de SRSF1, tal como cáncer.

Estado de la técnica

30

El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS; OMIM n.º 176670) es un trastorno genético infrecuente que afecta a 1 de cada 4-8 millones de niños con síntomas que se parecen al envejecimiento normal en adultos, que incluyen alteración del crecimiento, piel muy delgada, pérdida de grasa subcutánea, alopecia, osteoporosis y cardiopatía que da lugar a una esperanza de vida reducida y muerte a aproximadamente los 13,5 años (1, 2). Este síndrome está causado por una mutación puntual de sentido alterado *de novo* c.1824 C>T, p.G608G dentro del exón 11 del gen *LMNA* que codifica lamina A (3, 4). Esa mutación activa un sitio donador críptico de corte y empalme en el exón 11 que da lugar a la eliminación de 50 aminoácidos en el dominio globular carboxiterminal que provoca una prelamina A truncada y permanentemente farnesilada llamada progerina. Esta proteína carece de los restos 607-656 de prelamina A, pero retiene la secuencia CAAX del extremo C, una diana para la farnesilación. Como se pierde un sitio de escisión endoproteolítico en la lamina truncada/progerina, queda permanentemente farnesilada. Las laminas A/C, conjuntamente con las laminas de tipo B, son los componentes principales de la lámina nuclear, una red fibrosa subyacente a la membrana nuclear interna.

35

40

A nivel celular, el trastorno de envejecimiento prematuro HGPS se caracteriza por defectos drásticos en la estructura de la envuelta nuclear, alteraciones a gran escala en la forma nuclear, vesiculación, "hernias", pérdida de algunas proteínas de la membrana nuclear interna (INM) de un polo del núcleo y alteración de la heterocromatina subyacente. Como la lamina A también es un componente de la matriz nuclear interna, su alteración en células de pacientes con HGPS podría afectar a la distribución y/o la organización estructural de zonas funcionales nucleares tales como los nucleolos, punteados y cuerpos nucleares. Las anomalías en la composición de la matriz nuclear también pueden provocar defectos en las etapas de metabolismo del ADN y el ARN, a partir de la reparación del ADN, que da lugar a inestabilidad del genoma, a transcripción del ARN y corte y empalme. Los defectos metabólicos nucleares, así como sus consecuencias en el ciclo celular, las rutas metabólicas y las funciones de los compartimentos celulares dan lugar a senescencia celular (5).

45

50

Se ha mostrado que la progerina se produce sin mutación en el gen *LMNA* durante el envejecimiento fisiológico (6) y se considera como un biomarcador de envejecimiento en piel humana (7) y de ratón, donde se ha mostrado que la síntesis de progerina se activa mediante producción de ROS inducida por UV (8) principalmente mediante sobreactividad de la NADPH oxidasa NOX1 (9). Ambos fenómenos se han observado en una enfermedad genética de reparación del ADN, xerodermia pigmentosa de tipo C (XPC), tanto en queratinocitos cultivados humanos de pacientes como en ratones *Xpc*^{-/-} (9). Se ha informado de una sobreactividad comparable de NOX1 en otras enfermedades de reparación de ADN y también podría dar lugar a producción de progerina (10). El acortamiento de los telómeros durante la senescencia replicativa en células cultivadas inducía síntesis de progerina (11). Las células de linaje mesenquimatoso, tales como células endoteliales y de músculo liso de vasos sanguíneos, osteocitos y células de tejido adiposo, células de músculo esquelético y cardíacas son más específicamente sensibles a progerina, lo que induce la desaparición progresiva de células madre adultas responsables de la renovación de estos tejidos (12), un fenómeno también inducido por prelamina A farnesilada y observado en células madre epidérmicas adultas (13). Por

60

65

otro lado, la agresión oxidativa provocaba el bloqueo de ZMPSTE24 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, provocando la producción de prelamin A farnesilada durante el envejecimiento de células de músculo liso de vasos sanguíneos (14). Entre las edades de 1 mes y 97 años, la tinción de progerina aumentaba en arterias coronarias de sujetos sin HGPS (15). Además, durante la senescencia de los endotelios, la ubicación incorrecta de SRSF1 del núcleo al citosol provocaba eventos anómalos de corte y empalme en varios ARNm, entre ellos ARNm de prelamin A (16). Ni la progerina ni la prelamin A farnesilada se produjeron en neuronas y astrocitos del cerebro, debido a la escisión inducida por miR-9 de ARNm de prelamin A (17, 18). Sin embargo, la progerina o prelamin A farnesilada podrían contribuir indirectamente al envejecimiento cerebral a través de su síntesis por células vasculares (19) y endotelios (20) en respuesta a agresión oxidativa (21, 22) conjuntamente con la acumulación de lamina B en células neurales (23).

Las estrategias para tratar HGPS, así como otros síndromes progeroides ligados al procesamiento de prelamin A, pueden dividirse en tres ejes principales: i/ disminución de la toxicidad de prelamin A farnesilada, notablemente a través del bloqueo de la biosíntesis de isoprenoides o mediante el bloqueo de su síntesis; ii/ bloqueo del sitio críptico de corte y empalme del exón 11 de *LMNA* que da lugar a ARNm de progerina maduro, después a síntesis de progerina; iii/ degradación de progerina o prelamin A farnesilada dentro de las células.

Únicamente la primera estrategia dio lugar a ensayos terapéuticos en pacientes humanos hasta la fecha (5).

Un inhibidor de la farnesil transferasa (FTI), lonafarnib, se han ensayado (24), pero sus beneficios son controvertidos (25). Como RAS está bien establecido como el oncogén mutado más frecuentemente en cáncer humano y tanto RAS normal como oncogénico requieren farnesilación, la farnesiltransferasa (Ftasa) ha sido una de las dianas más atractivas para descubrimiento de fármacos antineoplásicos. Se ha desarrollado un gran número de inhibidores de Ftasa (FTI) y se ha ensayado en más de 70 ensayos clínicos (26). Los resultados fueron en gran medida desalentadores, sin embargo, con el hallazgo sorprendente de que H-RAS y K-RAS aún pueden geranilgeranilarse cuando se inhibe Ftasa (27). Además, un FTI, FTI-277, ha mostrado inhibir la actividad del proteasoma (28). Sin embargo, ninguno de los FTI previamente usados en células cultivadas de pacientes con progeria, en varios modelos de ratón donde la eficacia de FTI era muy inferior que en células cultivadas (29) y en ensayos clínicos de progeria (24), ha evidenciado una actividad inhibidora hacia el proteasoma o ha mostrado una disminución en la cantidad de progerina o de prelamin A como se describe en la presente divulgación.

Otro tratamiento, que se ensayó entre 2008 y 2013, es la combinación de zoledronato (un inhibidor de aminobisfosfonato de la farnesil-pirofosfato sintasa, Zo) y pravastatina (inhibidor de estatina de la HMG-CoA reductasa, Pra), es decir, ZoPra. Un tercer ensayo clínico que combina ZoPra con lonafarnib está en progreso.

La segunda estrategia se ha validado tanto en células de HGPS cultivadas, así como en un modelo de ratón de progeria. Oligonucleótidos cortos se unen al sitio críptico de corte y empalme del exón 11 de *LMNA* activado por mutación de *LMNA* y dan lugar a la reducción de ARNm de progerina y biosíntesis de proteína en células de HGPS (30). La administración intravenosa de dos morfolinooligonucleótidos rescata la esperanza de vida, así como varios parámetros biológicos del modelo de ratón KI G609G, que reproduce tanto el mecanismo fisiopatológico, como los síntomas clínicos y biológicos de la progeria (31). Un morfolino se dirige al sitio críptico de corte y empalme del exón 11 de *LMNA* e inhibe la producción de ARNm de progerina, mientras que el segundo se dirige al sitio de corte y empalme del exón 10 de *LMNA*, favoreciendo, por tanto, la producción de ARNm de lamina C y reduciendo la producción de ARNm de lamina A. En el mismo modelo de ratón KI de progeria, se ha demostrado que el factor de corte y empalme SRSF1 se une al sitio críptico del exón 11 de *LMNA* y favorece la producción de ARNm de progerina (32).

La tercera estrategia, la degradación de progerina o de la prelamin A farnesilada dentro de las células, se ha estudiado. El inmunosupresor rapamicina, mediante la activación de macroautofagia, reduce la progerina en fibroblastos de HGPS y rescata su fenotipo de forma nuclear (33, 34) y posterior errata 2013). Por tanto, se ha propuesto que la rapamicina constituye un tratamiento adecuado de HGPS. Se ha mostrado que la lamina B1 anclada mediante un grupo farnesilo a la lámina nuclear se exporta al citosol y se degrada mediante autofagia en células cultivadas tras lesiones oncogénicas, tal como mediante RAS activado (35).

Sin embargo, aún hay una necesidad de un tratamiento eficaz de HGPS y otros síndromes progeroides que tengan un mecanismo fisiopatológico relacionado, similar o idéntico. Dicho mecanismo puede implicar la presencia de prelamin A truncada y/o farnesilada y/o laminas de tipo B, y/o duplicación de *LMNA*, *LMNB1* y/o *LMNB2*. Dicho tratamiento también podría ser beneficioso para prevenir y/o para tratar enfermedades que acompañan al envejecimiento fisiológico ligado a lamina.

Objeto de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Como se muestra en el ejemplo 1, los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que el uso de un inhibidor del proteasoma, tal como MG132, induce eliminación de progerina en células de HGPS. De hecho, MG132

tiene dos funciones independientes en células de HGPS:

- por un lado, induce autofagia y, por tanto, degradación de la proteína, y
- por otro lado, reduce la cantidad del factor de transcripción llamado SRSF1, que está implicado en el corte y empalme del ARNm de prelamina A que da lugar a ARNm de progerina (32).

Como consecuencia, la progerina se degrada por autofagia y también se produce menos debido a la regulación por disminución de SRSF1.

Los autores de la invención también han mostrado sorprendentemente que el uso de un inhibidor del proteasoma es eficaz para tratar células cancerosas (véase el ejemplo 2) y para tratar un modelo animal de distrofia muscular oculofaríngea (OPMD) (véase el ejemplo 3).

La presente divulgación, por tanto, se refiere a un inhibidor del proteasoma para su uso para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, tal como una prelamina A truncada y/o farnesilada, que da lugar particularmente a un trastorno de envejecimiento prematuro.

Preferiblemente, el inhibidor del proteasoma es para su uso para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, tal como prelamina A truncada y/o farnesilada que da lugar a un trastorno de envejecimiento prematuro, mediante regulación por disminución de SRSF1.

La presente divulgación también se refiere a un método para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, tal como prelamina A truncada y/o farnesilada que da lugar a un trastorno de envejecimiento prematuro, en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del proteasoma.

La presente divulgación también se refiere al uso dermatológico, dermocosmético o cosmético de un inhibidor del proteasoma para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, particularmente el envejecimiento de piel humana. La divulgación también se refiere al uso de un inhibidor del proteasoma para atenuar el envejecimiento fisiológico, tal como envejecimiento fisiológico ligado a progerina y/o prelamina A farnesilada.

La divulgación también se refiere al uso de inhibidores del proteasoma en el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la edad y sus consecuencias metabólicas, en particular aquellos que incluyen tejidos que expresan progerina y/o prelamina A farnesilada, tales como la piel, tejido adiposo, hueso, vasos sanguíneos y sus células endoteliales y del músculo liso vascular y sus consecuencias sobre la piel, el corazón, el cerebro o los riñones.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa en este documento, la expresión "inhibidor del proteasoma" es un compuesto que bloquea la actividad enzimática del proteasoma. El proteasoma de mamífero de 26S citosólico y nuclear está compuesto de un núcleo proteolítico de 20S y dos subunidades de capuchón reguladoras de 19S (36). El núcleo de 20S proporciona una cavidad con forma de barril en que se degradan proteínas.

El núcleo de 20S está compuesto de cuatro anillos, dos α y dos β . Cada anillo α comprende siete subunidades α distintas codificadas por 7 genes, y cada anillo β comprende siete subunidades β distintas codificadas por 7 genes.

La subunidad de capuchón reguladora de 19S está compuesta de una base que comprende 6 ATPasas y 2 subunidades que no son ATPasa, y una cubierta que contiene hasta 10 subunidades que no son ATPasa.

Como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" significan invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

Como se usa en este documento, el término "prevenir" o "prevención" se refiere a aliviar la aparición de la enfermedad o afección en un sujeto en el que aún no se ha diagnosticado que la tiene.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende para una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que induce, mitiga o causa de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, en la progresión de la enfermedad o el estado fisiológico asociado con una enfermedad o que mejora la resistencia a un trastorno.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un cánido y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la divulgación es un ser humano. Todos los tratamientos y métodos de la divulgación pueden aplicarse a mamíferos, particularmente mamíferos no humanos, así como a seres humanos. Preferiblemente, pueden aplicarse a seres humanos.

Tratamiento de trastornos relacionados con una acumulación de una proteína anómala no degradada de acuerdo con la divulgación

5 La presente divulgación se refiere a un inhibidor del proteasoma para su uso para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, tal como prelamina A truncada y/o farnesilada y/o laminas de tipo B, o las proteínas producidas por una duplicación de *LMNB1* y/o *LMNB2*.

10 Como se usa en este documento, el "trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada" es un trastorno que implica la presencia de una proteína anómala, acumulándose dicha proteína en la célula porque no se degrada. Dicha proteína anómala puede ser una proteína mal plegada, o una proteína mutante. La acumulación de proteína anómala no degradada puede ser nuclear y/o citosólica. Preferiblemente, la proteína anómala no degradada es una prelamina A truncada y/o farnesilada, una lamina de tipo B truncada y/o farnesilada, o una proteína producida por una duplicación de *LMNB1* y/o *LMNB2*. Un ejemplo preferido de una prelamina A truncada y farnesilada es progerina.

15 Preferiblemente, el trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada es un trastorno relacionado con una acumulación nuclear de una proteína anómala no degradada. Preferiblemente, dicho trastorno es elige de trastornos de envejecimiento prematuro, trastornos del músculo estriado y neurodegenerativos. En dichos trastornos, hay acumulación de una proteína anómala no degradada en el núcleo.

Preferiblemente, el trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada es un trastorno relacionado con una acumulación citosólica de una proteína anómala no degradada.

25 Preferiblemente, dicho trastorno se elige de trastornos del músculo estriado y neurodegenerativos. Entre los trastornos del músculo estriado y neurodegenerativos, se puede citar preferiblemente la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD). El uso de inhibidores del proteasoma en un modelo de OPMD se muestra en el ejemplo 3.

30 Más preferiblemente, de acuerdo con la divulgación, dicho trastorno es elige de trastornos de envejecimiento prematuro. Los trastornos de envejecimiento prematuro se caracterizan por un envejecimiento acelerado, que afecta a múltiples o todos los tejidos y que causa que los individuos afectados muestren únicamente algunas de las características asociadas con el envejecimiento (que se llama "segmentario"), o que afecta únicamente a un tejido (que se llama "unimodal"). Por ejemplo, los trastornos de envejecimiento prematuro pueden elegirse de trastornos que implican un envejecimiento acelerado, y en que al menos una de las siguientes mutaciones está presente:

- prelamina A y/o laminas B están truncadas, y/o
- progerina y/o prelamina A y/o laminas B están farnesiladas, y/o
- *LMNA*, *LMNB1* y/o *LMNB2* están duplicados.

40 Por ejemplo, si *LMNB1* se duplica, entonces este defecto genético da lugar a leucodistrofia autosómica dominante en la edad adulta (37).

Los trastornos de envejecimiento prematuro pueden elegirse entre síndromes progeroides.

45 Los síntomas progeroides son trastornos humanos hereditarios que incluyen síntomas clínicos que recuerdan al envejecimiento, pero que aparecen de forma prematura y cuya evolución está drásticamente acelerada. La mayoría de síndromes humanos de envejecimiento acelerado están causados por uno de dos mecanismos principales: defectos en la lámina nuclear y proteínas de la matriz o alteraciones en proteínas implicadas en la reparación del ADN (5).

50 Entre los síndromes progeroides, se puede citar el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), el síndrome de progeria atípica (APS), dermatopatía restrictiva, síndrome de progeria de Nestor-Guillermo, debidos a mutación en *LMNA*, *ZMPSTE24* o *BANF1* respectivamente, y los síndromes de Werner, Bloom, Rothmund-Thomson o Cockayne, xerodermia pigmentosa y tricotodistrofia, debidos a mutaciones en genes cuyos productos están implicados en la reparación del ADN.

60 Preferiblemente, el inhibidor del proteasoma es para su uso para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada mediante regulación por disminución de SRSF1. SRSF1 es un factor 1 de corte y empalme rico en serina/arginina, que pertenece a la familia de factores de corte y empalme ricos en serina/arginina. Por "regulación por disminución de SRSF1", se entiende que el inhibidor del proteasoma regula por disminución la proteína SRSF1 en al menos un 10 %, preferiblemente, en al menos un 50 %, preferiblemente, en al menos un 60 %, en comparación con un control no tratado. La regulación por disminución de SRSF1 puede medirse como se describe en el ejemplo 1 y la figura 3B. Sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, el inhibidor del proteasoma para su uso de acuerdo con la presente divulgación puede ejercer su acción induciendo una reducción mediada por caspasa de los niveles de SRSF1, que da lugar a regulación por disminución de SRSF1. Esta regulación por disminución entonces disminuye los niveles de transcrito de progerina y, por tanto, disminuye la producción de

progerina.

Preferiblemente, el inhibidor del proteasoma que se usa para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada de acuerdo con la divulgación es un compuesto químico.

- 5 Preferiblemente, no comprende MG132. Más preferiblemente, se elige de péptidos, opcionalmente modificados. Más preferiblemente, se elige de péptidos, opcionalmente modificados, excepto MG132.

Los péptidos son preferiblemente tripéptidos, opcionalmente modificados. Preferiblemente, estos péptidos son tripéptidos que comprenden al menos dos leucinas, opcionalmente modificadas. La modificación puede ser la adición de una función aldehído, o la adición de un compuesto químico, como $-B(OH)_2$.

Preferiblemente, estos péptidos incluyen Z-Leu-Leu-Leu- $B(OH)_2$, Z-Leu-Leu-Nva-H, Z-Leu-Leu-Phe-al y Z-Leu-Leu-Leu-al.

- 15 El tripéptido modificado Z-Leu-Leu-Leu- $B(OH)_2$ también se conoce con el nombre MG262.

El tripéptido modificado Z-Leu-Leu-Nva-H también se conoce con el nombre MG115.

- 20 El tripéptido modificado Z-Leu-Leu-Leu-al también se conoce con el nombre MG132. El tripéptido modificado Z-Leu-Leu-Phe-al también se conoce con el nombre MG110.

Más preferiblemente, el inhibidor del proteasoma se elige de MG115, MG262, MG110 y MG132. Más preferiblemente, el inhibidor del proteasoma se elige de MG115, MG110 y MG262.

- 25 La divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor del proteasoma de la divulgación, particularmente elegido de MG115, MG262, MG110 y MG132.

Cuando el inhibidor del proteasoma de la divulgación es un péptido, puede conjugarse o adherirse a un agente que aumenta la acumulación de dicho péptido en una célula.

- 30 Dicha conjugación con un agente adecuado haría que dicho péptido fuera más permeable en la membrana, tal como transportadores permeables en la membrana celular. Dicho agente puede ser un transportador permeable en la membrana celular, por ejemplo, un péptido rico en aminoácidos cargados positivamente, preferiblemente un péptido rico en arginina. Preferiblemente, el péptido rico en arginina es una marca de poliarginina que tiene la secuencia RRRRRRRR (SEQ ID NO: 12). Otros péptidos de penetración celular pueden elegirse entre el péptido NGR derivado del ligando N (CNGRCG) de aminopeptidasa (CD13), péptido líder de antenapedia (KKWKMRNQQFWVKVQRG SEQ ID NO: 13), péptido de unión a Bcl-2 (decanoil-KNLWAAQRYGRELRRMSDEFEGSFKGL SEQ ID NO: 14), una secuencia tat (RKKRRQRRR SEQ ID NO: 15), buforina (TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK SEQ ID NO: 16), un fragmento peptídico del virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV)-11 Rex (TRRQTRRRARRNR SEQ ID NO: 17), el péptido de traslocación de membrana lipídica (KKAAVLLPVLLAAP SEQ ID NO: 18) y penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKKGG SEQ ID NO: 19).

- 45 Cuando el inhibidor del proteasoma de la divulgación es un péptido, puede administrarse en forma de una de sus sales farmacéuticamente activas. Las sales farmacéuticamente activas adecuadas comprenden sales de adición de ácidos y sales alcalinas o alcalinotérreas. Por ejemplo, pueden obtenerse sales de sodio, potasio, litio, magnesio o calcio. El péptido forma sales farmacéuticamente aceptables con ácidos orgánicos e inorgánicos. Ejemplos de ácidos adecuados para dicha formación de sales de adición de ácidos son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido málico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfanílico, ácido alcanforsulfónico, ácido mandélico, ácido o-metilmandélico, ácido hidrogenobencenosulfónico, ácido pícrico, ácido adípico, ácido D-o-toliltartárico, ácido tartrónico, ácido a-tolúico, ácido (o, m, p)-tolúico, ácido naftilamina sulfónico y otros ácidos minerales o carboxílicos bien conocidos por los expertos en la materia. Las sales se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir una sal de la manera convencional.

- 60 El péptido de la presente divulgación también puede conjugarse con un resto no peptídico. Una molécula polimérica a acoplar al péptido puede ser cualquier molécula polimérica adecuada, tal como un homopolímero o heteropolímero natural o sintético, típicamente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 300-100 000 Da, tal como aproximadamente 500-20 000 Da. Ejemplos de moléculas poliméricas adecuadas incluyen moléculas poliméricas seleccionadas del grupo que consiste en poli(óxido de alquileño) (PAO), incluyendo polialquilenglicol (PAG), tal como polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG), PEG ramificados, poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, anhídrido de polietileno-co-ácido maleico, anhídrido de poliestireno-co-ácido maleico, dextrano, incluyendo carboximetildextrano, o cualquier otro biopolímero adecuado para reducir la inmunogenia y/o aumentar la

semivida *in vivo* funcional y/o semivida en suero. Otro ejemplo de una molécula polimérica es albúmina humana u otra proteína plasmática abundante. En general, los polímeros derivados de polialquilenglicol son biocompatibles, atóxicos, no antigénicos, no inmunógenos, tienen diversas propiedades de solubilidad en agua y se excretan fácilmente de los organismos vivos.

5 Por lo tanto, un inhibidor del proteasoma de la divulgación puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación mantenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

10 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según lo apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo, sólido, semisólido o líquido atóxico.

15 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen naturalmente dependerán de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

20 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intragástrica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intravaginal, rectal, sublingual, transdérmica o intraocular y similares.

Las formas de administración incluyen, por ejemplo, píldoras, comprimidos, comprimidos con película, comprimidos recubiertos, cápsulas, formulaciones liposómicas, micro- y nanoformulaciones, polvos y depósitos.

25 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estas pueden estar en soluciones particulares isotónicas, estériles, salinas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o en polvo, especialmente composiciones secadas por congelación que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de las soluciones inyectables.

30 Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse como una función de diversos parámetros, y en particular como una función del modo de administración usado, de la patología pertinente o como alternativa de la duración deseada del tratamiento. Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad eficaz del inhibidor del proteasoma en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; incluyendo las formulaciones aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

45 Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

50 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

55 La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

60 La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de esterilización por filtración.

65 En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo

estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de la solución filtrada a esterilidad previamente de los mismos.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de galénicas, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido en primer lugar tiene que volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa.

Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, el medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences" 15.^a Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación temporalizada; y cualquier otra forma actualmente usada.

El inhibidor del proteasoma puede usarse en solitario o en combinación con al menos otro fármaco.

Dichos fármaco puede elegirse de agentes antiinflamatorios (38); oligonucleótidos de antisentido, como 5'-GCTACCACTCACGTGGTGGTGATGG-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-GGGTCCACCCACCTGGGCTCCTGAG-3' (SEQ ID NO: 2), que se conocen de (31); inhibidores de aminobisfosfonato de la farnesil-pirofosfato sintasa, como zoledronato; inhibidores de estatina de la HMG-CoA reductasa, como pravastatina; otros péptidos tales como inhibidores de NOX1; activadores de chaperona o de su actividad ATPasa; activadores de autofagia tales como trehalosa, sales de litio, espermidina; inhibidores de la cinasa de Rho, tales como clorhidrato de fasudilo, Y-27632, HA1077 o H89; inhibidores de Rho, tales como BA-210 (Cethrin®) de BioAxxon Therapeutics; y mezclas de los mismos.

Dichos fármaco también puede ser quimioterapia o inmunoterapia.

La presente divulgación también se refiere al uso dermatológico, dermocosmético o cosmético de un inhibidor del proteasoma para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, particularmente el envejecimiento de piel humana. La presente divulgación también se refiere al uso de un inhibidor del proteasoma para atenuar el envejecimiento fisiológico.

El inhibidor del proteasoma es como se describe anteriormente.

Puede usarse para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel y, particularmente, para reducir las arrugas, las líneas finas y/o para prevenir el adelgazamiento de la piel y/o un aspecto de piel reblandecida y seca.

La divulgación también se refiere inhibidores del proteasoma para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la edad y sus consecuencias metabólicas, en particular aquellos que incluyen tejidos que expresan progerina y/o prelamin A farnesilada, tales como la piel, tejido adiposo, hueso, vasos sanguíneos y sus células endoteliales y del músculo liso vascular y sus consecuencias sobre la piel, el corazón, el cerebro o los riñones. Particularmente, el trastorno relacionado con la edad puede elegirse de osteoporosis, diabetes de tipo 2 y arterioesclerosis. Por tanto, preferiblemente, la divulgación se refiere a un inhibidor del proteasoma para su uso para tratar y/o prevenir trastornos relacionados con la edad y sus consecuencias metabólicas, en particular aquellos que incluyen tejidos que expresan progerina y/o prelamin A farnesilada, tales como la piel, tejido adiposo, hueso, vasos sanguíneos y sus células endoteliales y del músculo liso vascular y sus consecuencias sobre la piel, el corazón, el cerebro o los riñones. Preferiblemente, dicho trastorno relacionado con la edad se elige de osteoporosis, diabetes de tipo 2 y arterioesclerosis.

La administración del inhibidor del proteasoma puede ser por cualquier método adecuado como se describe anteriormente. Las cantidades adecuadas del inhibidor del proteasoma pueden determinarse empíricamente, pero típicamente están en el intervalo dado a continuación. Una sola administración de inhibidor del proteasoma puede ser suficiente para obtener un efecto beneficioso para el paciente, pero se apreciará que puede ser beneficioso que se administre más de una vez, en cuyo caso las pautas posológicas típicas pueden ser, por ejemplo, una vez o dos veces

a la semana durante 2-4 semanas cada seis meses, o una vez al día durante una semana cada cuatro a seis meses.

Las dosificaciones para administración dependerán de varios factores, incluyendo la naturaleza de la composición, la vía de administración y el cronograma y cronología de la pauta posológica.

Las dosis adecuadas de una molécula o una combinación de moléculas de la divulgación puede ser del orden de 1 µg hasta 10 µg, hasta 15 µg, hasta 20 µg, hasta 25 µg, hasta 30 µg, hasta 35 µg, hasta 50 µg, hasta 100 µg, hasta 500 µg o más por administración. Las dosis adecuadas pueden ser de menos de 15 µg, pero al menos 1 ng, o al menos 2 ng, o al menos 5 ng, o al menos 50 ng, o al menos 100 ng, o al menos 500 ng, o al menos 1 µg, o al menos 10 µg. Para algunas moléculas de la divulgación, la dosis usada puede ser mayor, por ejemplo, hasta 1 mg, hasta 2 mg, hasta 3 mg, hasta 4 mg, hasta 5 mg o mayor. Dichas dosis pueden proporcionarse en una formulación líquida, a una concentración adecuada para permitir un volumen apropiado para su administración por la vía seleccionada.

Método de diagnóstico de acuerdo con la divulgación

La divulgación también se refiere a un método para diagnosticar un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, particularmente un trastorno de envejecimiento prematuro, en una muestra biológica de un sujeto, que comprende i) la detección de PML-NB de tipo hebra en el núcleo celular, y ii) la detección de un parámetro secundario. Dicho parámetro secundario puede elegirse de un síntoma clínico de envejecimiento del sujeto, y/o la detección de rotura del ADN en la muestra biológica.

De hecho, como se muestra en el ejemplo, los autores de la invención han descubierto que los PML-NB de tipo hebra son marcadores de células de HGPS y, por tanto, pueden ser útiles en métodos de diagnóstico de un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, particularmente un trastorno de envejecimiento prematuro.

Los PML-NB (cuerpos nucleares de leucemia promielocítica) son cuerpos nucleares y se han descrito como punteados nucleares diferenciados muy asociados con la matriz nuclear (39).

El gen de PML se identificó inicialmente como el compañero de fusión del gen del receptor de ácido retinoico α en la translocación cromosómica T(15;17) en leucemia promielocítica aguda. Los PML-NB varían en tamaño de 0,2 µm a 1,2 µm de diámetro y son estructuras dinámicas que cambian de tamaño, posición y número en respuesta a agresión, tal como choque térmico, exposición a metales pesados y daño del ADN.

Los PML-NB pueden detectarse, gracias a métodos clásicos conocidas en la técnica, como inmunofluorescencia, transferencia de Western o citometría de flujo.

Por tanto, el método para diagnosticar un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada, particularmente un trastorno de envejecimiento prematuro (más particularmente HGPS y otros síndromes progeroides), en una muestra biológica de un sujeto, de acuerdo con la divulgación, comprende i) detectar PML-NB de tipo hebra en dicha muestra biológica, y ii) detectar un parámetro secundario. Si se detectan PML-NB de tipo hebra, y si se detecta el parámetro secundario, entonces puede concluirse que el sujeto está afectado por un trastorno relacionado con una acumulación de una proteína anómala no degradada.

La muestra biológica puede ser células de una biopsia de piel, células de sangre periférica, células epiteliales de la mucosa nasal u orina.

Tratamiento del cáncer de acuerdo con la divulgación

Finalmente, la divulgación también se refiere a un inhibidor del proteasoma como se describe anteriormente, y que regula por disminución SRSF1, para tratar y/o prevenir cánceres. Dicha aplicación se muestra sorprendentemente en el ejemplo 2 a continuación.

Dicho inhibidor del proteasoma puede ser como se describe anteriormente. Preferiblemente, dicho inhibidor del proteasoma puede elegirse de MG132, MG115, MG262 y MG110.

Se ha observado sobreexpresión del protooncogén SRSF1 en cánceres humanos (40).

Por tanto, regulando por disminución SRSF1, los inhibidores del proteasoma de la divulgación pueden tratar cánceres.

El cáncer puede ser de cualquier tipo. Preferiblemente, el cáncer se elige de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de piel.

La divulgación se ilustrará además en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

Descripción de las figuras

Figura 1. MG132, un inhibidor del proteasoma, reduce los niveles de progerina en fibroblastos de HGPS.

(A) Se observó aumento significativo de actividades del proteasoma (tripsina: Z-LRR-aminoluciferina, quimotripsina: Suc-LLVY aminoluciferina y de tipo caspasa: Z-nLPnLD-aminoluciferina) en fibroblastos de HGPS (AG01972) con respecto a fibroblastos de control (control 1: 8471 y control 2: 8498) (media $\pm$ ETM, $n = 3$). Cada experimento se realizó en células del mismo nivel de pase. La luminiscencia se determina como unidades relativas de luz (URL).

(B) Paneles superiores, evaluación por transferencia de Western de progerina y tubulina en lisados completos de fibroblastos de HGPS sin tratar (Ctrl) o tratados con MG132 10 μ M o DMSO durante 3, 6, 24 y 48 h), Paneles inferiores, las bandas de progerina, descritas en el panel superior, se cuantificaron mediante el programa informático ImageJ y los niveles de expresión de progerina se normalizaron a los valores de células de control. ($n = 6 \pm$ ETM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, experimental frente al control (células tratadas con DMSO).

(C) Evaluación por transferencia de Western de progerina, actina y GAPDH en lisados completos de fibroblastos de HGPS tratados durante 48 h con DMSO (Ctrl) o MG132 10 μ M, MG115, MG262, bortezomib (BTZ) o carfilzomib (CFZ). Imagen invertida.

(D) Actividades del proteasoma (tripsina: Z-LRR-aminoluciferina, quimotripsina: Suc-LLVY aminoluciferina y de tipo caspasa: Z-nLPnLD-aminoluciferina) en fibroblastos de HGPS (AG01972, AG11498 y 5968) tras 24 h de tratamiento con MG132 (media $\pm$ ETM, $n = 3$). La luminiscencia se determina como unidades relativas de luz (URL). C = Células de control tratadas con DMSO durante 24 h.

Figura 2. La eliminación de progerina se debe parcialmente a inducción de autofagia.

(A) Se cuantificaron las bandas específicas de progerina y GAPDH de la transferencia de Western mediante el programa informático ImageJ y los niveles de expresión de progerina se normalizaron a los valores de GAPDH. ($n = 6 \pm$ ETM). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, experimental frente al control (células tratadas con DMSO). Niveles de progerina en lisados completos de, respectivamente, fibroblastos de HGPS sin tratar (Ctrl) o tratados con DMSO (48 h), MG132 10 μ M (36 h y 48 h), cloroquina (48 h) (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M o 50 μ M) o tanto MG132 10 μ M como cloroquina (1 μ M, 10 μ M, 25 μ M o 50 μ M) añadidos simultáneamente (48 h).

(B) Se cuantificaron las bandas específicas de progerina y GAPDH de la transferencia de Western mediante el programa informático ImageJ y los niveles de expresión de progerina se normalizaron a los valores de GAPDH. ($n = 4 \pm$ ETM). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, experimental frente al control (células sin tratar). Niveles de progerina en lisados completos de fibroblastos de HGPS tratados (+) durante 48 h con MG132 (10 μ M), cloroquina (50 μ M), bafilomicina A1 (100 nM), inhibidor de caspasa-6 Z-VEID-FMK (50 μ M) o leptomicina B (20 ng/ml).

Figura 3. MG132 reduce los transcritos de progerina y la expresión proteínica de factor de corte y empalme SRSF-1.

(A) Regulación por disminución de transcritos de progerina en respuesta a MG 132. Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de progerina en fibroblastos de HGPS tratados con MG132 10 μ M con respecto a células tratadas con DMSO (control) (media $\pm$ ETM, $n = 3$). *** $P < 0,001$.

(B) Paneles superiores, MG132 reduce la expresión del factor de corte y empalme SRSF-1. Evaluación por transferencia de Western de lamina A/C, progerina, actina, SRSF-1, LC3B-I y LC3B-II en lisados completos de fibroblastos de HGPS tratados con DMSO (-) (control), MG132 (10 μ M), cloroquina (50 μ M), bafilomicina A1 (100 nM) o inhibidor universal de caspasa Z-VAD-FMK. También se realizaron tratamientos combinados, como se indica. Paneles inferiores, las bandas específicas de progerina, SRSF-1 y actina, descritas en el panel superior, se cuantificaron mediante el programa informático ImageJ. Los niveles de expresión de progerina y SRSF-1 se normalizaron a los valores de actina. (media $\pm$ ETM, $n = 5$).

Figura 4. MG132 induce una disminución en los niveles de ARNm, pero no los niveles de proteína de lamina A/C.

(A) MG132 reduce los niveles de transcrito de lamina A y lamina C. Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de lamina A y lamina C en fibroblastos de HGPS tratados con MG132 10 μ M (media $\pm$ ETM, $n = 3$).

(B) Los niveles de proteína tanto de lamina A como de C se aumentaron tras tratamiento de los fibroblastos de HGPS con MG132 (10 μ M). Se muestra una transferencia Western representativa y la media de los valores de 3 experimentos diferentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, experimental frente al control (células tratadas con DMSO).

Figura 5. MG132 mejora las anomalías a la forma nuclear en líneas de células de HGPS.

El porcentaje de núcleos normales (núcleos con forma ovalada lisa) y núcleos anómalos (núcleos con vesículas, forma irregular o múltiples pliegues) se calculó por recuento enmascarado manual. Se muestra una imagen representativa y la media de los valores de 3 experimentos diferentes. * $P < 0,05$.

5 **Figura 6. MG132 reduce los niveles de progerina en MSC y VSMC derivadas de iPS del paciente.**

La viabilidad de fibroblastos de HGPS, iPS-MSC derivadas de HGPS o iPS-VSMC se midió a las 24 h después del tratamiento con MG132 a las concentraciones indicadas usando ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo. Los resultados se presentan como el porcentaje de viabilidad de células tratadas con MG132 con respecto a células no tratadas.

10 **Figura 7. MG132 reduce los niveles de progerina en músculo esquelético de ratones *Lmna*^{G609G/G609G}.**

(A) Las bandas específicas de lamina A, progerina, lamina C y SRSF-1, correspondientes a músculo izquierdo tratado con DMSO (-) y músculo derecho tratado con 1 µg/kg de MG132 (+), se cuantificaron mediante el programa informático ImageJ y sus niveles de expresión se normalizaron a los valores de GAPDH.

(B) La misma cuantificación que en (A) tras tratamiento con 10 µg/kg. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, células tratadas con MG132 frente a células sin tratar.

20 **Figura 8. Los inhibidores del proteasoma reducen los niveles de SRSF1 en dos líneas celulares de adenocarcinoma humano cultivadas.**

Las dos líneas celulares se incubaron durante 24 h con 3 concentraciones de inhibidores del proteasoma diluidos en DMSO.

Se depositaron 20 µg de extractos proteínicos totales en cada carril.

La cantidad de SRSF1 después de 24 h de incubación con los inhibidores del proteasoma se expresó en porcentaje de la cantidad de SRSF1 en células de control incubadas con vehículo DMSO únicamente y con respecto a actina (zonas negras) o GAPDH (zonas grises).

(A) HTC116, adenocarcinoma de colon

(B) PANC-1, adenocarcinoma de páncreas.

30 **Figura 9. Efecto beneficioso de MG132 en el modelo de OPMD de *Drosophila*.**

(A) Se determinó la toxicidad de MG132 suministrada a larvas transfiriendo 80 larvas del primer estadio de tipo silvestre en viales que contenían 5 ml de medio instantáneo de *Drosophila* reconstituido con concentraciones crecientes de fármaco en DMSO, o DMSO en solitario. El gráfico muestra el porcentaje de moscas que alcanzan la edad adulta a 25 °C.

(B) Cuantificación de moscas que expresan PABPN1-17ala (*Act88F-PABPN1-17ala/+*) que muestran defectos en la posición de las alas, a las que se ha suministrado DMSO en solitario o tres concentraciones diferentes de MG132, a 25 °C. Todas las concentraciones provocaron un número disminuido de moscas con postura anómala de las alas. Se indican los números de moscas puntuadas. *** valor de $p < 0,001$ y ** valor de $p < 0,01$ usando la prueba de la ji al cuadrado.

45 **Ejemplo 1: Eliminación eficaz de progerina mediante inducción de autofagia y regulación por disminución de SRSF-1 en tratamiento con MG132 en síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford**

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Fibroblastos dérmicos humanos (fibroblastos establecidos a partir de una biopsia de piel) de sujetos de control (8498: niños de 1 años de edad, 8471: hombres de 60 años de edad, 731C: hombres de 96 años de edad) y un paciente que portaba la mutación de HGPS p.Gly608Gly (5968: niñas de 5 años edad) se han preparado y almacenado de acuerdo con la normativa del Biological Resource Center, (CRB TAC), Department of Medical Genetics, Timone Hospital of Marseille (A. Robaglia-Schlupp y K. Bertaux). Fibroblastos de HGPS (AG01972: niñas de 14 años de edad, AG11498: niños de 14 años de edad) se obtuvieron del Coriell Cell Repository. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies) complementado con suero bovino fetal al 15 % (Life Technologies), L-glutamina 2 mM (Life Technologies) y penicilina IX-estreptomina (Life Technologies) a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO₂. Los fibroblastos se cultivaron en presencia o ausencia de MG132 (474790. Merck Chemical LTD), MG115 (SCP0005. Sigma), MG262 (1-120-200. R&D Systems), bortezomib (S1013. Euromedex), carfilzomib (S2853. Euromedex), difosfato de cloroquina cristalino (C6628. Sigma), bafilomicina A1 (B1793. Sigma), inhibidor de caspasa-6 Z-VEID-FMK (FMK006. R&D Systems), inhibidor universal de caspasa Z-VAD-FMK (FMK001.R&D Systems) y leptomicina B (L2913. Sigma).

65 **Transfección de ARNip**

Para la atenuación de SRSF-1, células de HGPS se transfectaron con ARNip 10 nM usando INTERFERin (Polyplus Transfection). Las células de HGPS se sembraron el día antes de la transfección a 100 000-200 000 células en recipiente de cultivo de 6 pocillos. Se diluyeron 22 pmoles de ARNip en 200 µl de medio DMEM sin suero, mezclado con 8 µl de reactivo INTERFERin. Los tubos se agitaron con vórtice 10 s y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de transfección se añadió a las células en suero que contenía medio DMED. El medio se cambió después de 4 horas y las células se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 48 horas. El ARNip de SRSF-1 (AM16708) se adquirió de Thermo Fisher Scientific.

Anticuerpos

Los anticuerpos usados en el estudio incluyeron: un anticuerpo policlonal de conejo antilamina A/C (SC-20681, usado a dilución 1:1000 para los análisis de transferencia de Western y a 1:200 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo monoclonal de ratón antiprogerina (sc-81611 usado a dilución 1:1000 para los análisis de transferencia de Western y a 1:200 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo policlonal de conejo anti-PML (sc-9863-R usado a 1:200 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PML (sc-966 usado a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo policlonal de cabra anti-SP100 (sc-16328 usado a 1:50 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HP1 (2HP-1H5-AS usado a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Euromedex); un anticuerpo policlonal de conejo anti-ATRX (sc-15408 usado a 1:50 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anti-DAXX (ab32140 usado a 1:50 para marcaje de inmunofluorescencia. Abcam); un anticuerpo policlonal de conejo anti-CBP (06-297 usado a 1:200 para marcaje de inmunofluorescencia. Upstate); un anticuerpo de ratón antiubiquitina (PW8805 usado a 1:10 para marcaje de inmunofluorescencia. Enzo); un anticuerpo monoclonal de ratón anticonjugados mono- y poliubiquitinilados (FK2, usado a 1:1000 para los análisis de transferencia de Western. Enzo); un anticuerpo policlonal de conejo antifibrilarina (ab5821 usado a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Abcam); un anticuerpo policlonal de cabra antilamina B1/B2 (sc6217 usado a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo policlonal de cabra antiemerina (sc-8086 usado a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Santa Cruz Biotechnology, Inc.); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-26S (65144 usado a 1:1 para marcaje de inmunofluorescencia. Progen Biotechnic.); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Nup153 (ab93310, usado a 1:10 para marcaje de inmunofluorescencia. Abcam); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-p53 (ab26, usado a 1:200 para marcaje de inmunofluorescencia. Abcam); un anticuerpo policlonal de conejo anti-p62 (ab37024, usado a 1:1000 para los análisis de transferencia de Western y a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Abcam); un anticuerpo policlonal de conejo anti-LC3B (n.º 2775, usado a 1:1000 para los análisis de transferencia de Western y a 1:400 para marcaje de inmunofluorescencia. Cell Signaling); un anticuerpo policlonal de conejo anti-SQSTM1/p62 (n.º 5114, usado a 1:1000 para los análisis de transferencia de Western y a 1:100 para marcaje de inmunofluorescencia. Cell Signaling); un anticuerpo policlonal de conejo antilamina C (BP4505, usado a 1:200 para marcaje de inmunofluorescencia. Acris Antibodies. GmbH); un anticuerpo monoclonal de conejo anti-SRSF1 (ab129108, usado a 1:1000 para los análisis de transferencia de Western. Abcam); un anticuerpo monoclonal de ratón antigliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (MAB374, usado a 1:10 000 para los análisis de transferencia de Western. Merck Millipore); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-α-tubulina (T6074, usado a 1:10 000 para los análisis de transferencia de Western. Sigma) o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (AC-40, usado a 1:10 000 para los análisis de transferencia de Western. Sigma); un anticuerpo policlonal de conejo anti-Sumo2/3 (ab-3742, usado a 1:1000 para los análisis de transferencia de Western. Abcam).

Microscopia de fluorescencia

Células recogidas por centrifugación se extendieron en portaobjetos recubiertos con polilisina por centrifugación (300 rpm durante 5 minutos) con un cytospin (Shandon). Las células entonces se fijaron a temperatura ambiente durante 10 minutos en un 2 % (p/v) de paraformaldehído en PBS pH 7,2. Los portaobjetos se almacenaron a -80 °C antes de su uso. Las células se permeabilizaron usando 100 µl de tampón de permeabilización (Triton X-100 al 0,5 %, NaCl 50 mM, sacarosa 300 mM, HEPES 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM) durante 3 minutos a TA. La unión no específica del anticuerpo se bloqueó con un 3 % de seroalbúmina bovina en PBS (p/v) (PBS-BSA) durante 30 minutos. Las células permeabilizadas se incubaron con los anticuerpos primarios durante 3 h a 37 °C. Después de lavarlas, las células entonces se incubaron con anticuerpos secundarios (A11001, A11058, Life Technologies; 1/400) durante 20 minutos a 37 °C. Los núcleos se tiñeron con DAPI (50 ng/ml) diluido en Vectashield (Abcys) durante 10 minutos a TA. Las muestras se fijaron en 4 % paraformaldehído durante 5 min. Las células teñidas se observaron en un microscopio de imágenes Axioplan 2 (Carl Zeiss) o se examinaron a través de un microscopio invertido Nikon fijado a un sistema de barrido confocal láser (Leica). Todos los anticuerpos se ensayaron en reacciones de tinción individuales para su especificidad y rendimiento. Los controles sin anticuerpo primario fueron todos negativos.

Cuantificación de morfología nuclear anómala

Fibroblastos de tres pacientes con HGPS (AG01972, AG11498, 5968) y dos individuos normales (8471, 8498) se cultivaron con medio DMEM que contenía MG132 10 µM o el mismo volumen de vehículo (DMSO, 0,025 % v/v) durante 48 h. Las células se tiñeron para lamina A/C o DAPI y se examinaron por microscopia de fluorescencia con un microscopio de imágenes Axioplan 2 (Carl Zeiss). Para la cuantificación de la morfología nuclear anómala, el

porcentaje de núcleos normales (núcleos con forma ovalada lisa) y núcleos anómalos (núcleos con vesículas, forma irregular o múltiples pliegues) se calculó por recuento enmascarado manual. Se seleccionaron aleatoriamente al menos 200 núcleos de fibroblastos para cada línea celular y se examinaron en dos experimentos independientes. Los resultados se expresan gráficamente como el promedio del porcentaje de los núcleos totales contados.

5

Aislamiento de ARN, transcripción inversa y PCR en tiempo real

Se aisló el ARN total usando el kit de extracción RNeasy plus (Qiagen, Valencia, CA). Se retrotranscribió 1 µg de ARN usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se realizó amplificación por PCR en tiempo real con la mezcla fundamental de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems) en un LightCycler 480 (Roche, Alemania) usando cebadores prediseñados para GAPDH (Hs00266705_g1), progerina (F: ACTGCAGCAGCTCGGGG (SEQ ID NO: 3) R: TCTGGGGGCTCTGGGC (SEQ ID NO: 4) y sonda: CGCTGAGTACAACCT (SEQ ID NO: 5)), lamina A (F: TCTTCTGCCTCCAGTGTACG (SEQ ID NO: 6) R: AGTTCTGGGGGCTCTGGGT (SEQ ID NO: 7) y sonda: ACTGCAGCTACCG (SEQ ID NO: 8)) y lamina C (F: CAACTCCACTGGGGAAGAAGTG (SEQ ID NO: 9) R: CGGCGGCTACCACTCAC (SEQ ID NO: 10) y sonda: ATGCGCAAGCTGGTG (SEQ ID NO: 11)) (Applied Biosystems) usando el programa: incubación UNG a 50 °C durante 2 minutos, desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de amplificación: desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos e hibridación a 60 °C durante 1 minuto. Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Se usaron valores de ciclo umbral (Ct) para calcular la expresión relativa de ARNm mediante el método de cuantificación relativa de $2^{-\Delta\Delta^{CT}}$ con normalización a la expresión de GAPDH.

20

Transferencia de Western

Se extrajeron las proteínas totales de fibroblastos en 200 µl de tampón de lisis celular NP40 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenía cóctel inhibidor de proteasa e de fosfatasa (Thermo Scientific). Como alternativa, las células se lisaron con urea (urea 8 M, ditiotretol 5 mM, NaCl 150 mM, Tris-Cl 50 mM pH 7,5, cóctel inhibidor de proteasa y fosfatasa (Thermo Scientific)). Las células se sonicaron dos veces (30 segundos cada vez), se incubaron a 4 °C durante 30 minutos y después se centrifugaron a 10 000 g durante 10 minutos. La concentración de proteína se evaluó con la técnica de ácido bicinonínico (kit de ensayo de proteína BCA de Pierce), se mide la absorbancia a 562 nm usando Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se cargaron cantidades iguales de proteínas (40 µg) en gel de Tris-glicina al 10 % (Criterion™ XT gel premoledado) usando tampón de procesamiento XT Tricina (Biorad, EE. UU.). Tras la electroforesis, los geles se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa o membranas de poli(fluoruro de vinilideno) Immobilon-FL (Millipore), se bloquearon en tampón de bloqueo Odyssey diluido 1:1 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron durante una noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente con diversos anticuerpos primarios. Las transferencias se lavaron con tampón TBS-T [Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05 %] y se incubaron con 1:10 000 de anticuerpo secundario de burro anticabra conjugado con IR-Dye 800 o anticuerpos secundarios antirratón conjugados con IR-Dye 700 (LI-COR Biosciences) en tampón de bloqueo Odyssey (LI-COR Biosciences). Para la detección de IR-Dye 800 e IR-Dye 700, se usó un sistema de imágenes de infrarrojo Odyssey (LI-COR Biosciences). GAPDH, α -tubulina o β -actina se usó como control de carga de proteína celular total.

40

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se realizó usando el kit de inmunoprecipitación de proteína G Dynabeads (Invitrogen). Se añadieron 5 µg de anticuerpo monoclonal de ratón antiprogerina (Abcam) a 50 µl (1,5 mg) de Dynabeads y se rotaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y el complejo de microesferas-anticuerpos se lavó en 200 µl de PBS con Tween-20 que contenía N-etilmaleimida 5 mM (NEM, Thermo Scientific). El sobrenadante se retiró y las Dynabeads se incubaron con 200 µl de lisado celular (200 µg de proteína) extraído usando tampón de lisis celular NP40 (Invitrogen) que contenía proteasa, cóctel inhibidor de fosfatasa (Thermo Scientific) y NEM 5 mM, los tubos se rotaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las microesferas se lavaron 3 veces de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas se eluyeron con 20 µl de tampón de elución que contenía NEM 5 mM. Se realizó SDS/PAGE e inmunotransferencia como se describe anteriormente.

50

Ensayos de actividades del proteasoma

Las actividades del proteasoma se determinaron en células de HGPS y de control usando el sistema de ensayo celular de 3 sustratos Proteasome-Glo™ (Promega) que permite medir la actividad de tipo quimotripsina, de tipo tripsina o de tipo caspasa asociada con el complejo del proteasoma en células cultivadas. Los reactivos celulares de Proteasome-Glo™ contienen cada uno un sustrato luminogénico específico del proteasoma. Estos sustratos peptídicos son Suc-LLVY amino-luciferina (succinil-leucina-leucina-valina-tirosina-aminoluciferina), Z-LRR-aminoluciferina (Z-leucina-arginina-arginina-aminoluciferina) y Z-nLPnLD-aminoluciferina (Z-norleucina-prolina-norleucina-aspartato-aminoluciferina) para las actividades de tipo quimotripsina, de tipo tripsina y de tipo caspasa, respectivamente. Las células (10 000 células/pocillo) se cultivaron en 100 µl/pocillos en una placa de 96 pocillos a 37 °C, 5 % de CO₂. La placa se dejó equilibrar a 22 °C antes de añadir 100 µl/pocillo de sustrato y reactivo de detección de luciferina. Los contenidos de los pocillos se mezclaron a 700 rpm usando un agitador de placas durante 2 minutos y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de la escisión por el proteasoma, se libera el sustrato para la luciferasa (aminoluciferina), permitiendo que la reacción de luciferasa prosiga y produzca luz. La luminiscencia se

65

determina como unidades relativas de luz (URL) usando un sistema de detección GloMax-Multi: luminómetro (Promega, EE. UU.).

Medición de senescencia

La senescencia se midió con un kit de ensayo Beta-Glo (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La intensidad de luminiscencia se determinó como unidades relativas de luz (URL) usando un sistema de detección GloMax-Multi: luminómetro (Promega, EE. UU.).

Ensayos de viabilidad y citotoxicidad

La viabilidad y la citotoxicidad se midieron con un ensayo de citotoxicidad combinado MultiTox-Fluor (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo MultiTox-Fluor mide simultáneamente dos actividades de proteasa: una es un marcador de viabilidad celular usando un sustrato fluorogénico, peptídico y permanente en las células (glicil-fenilalanilamino fluorocumarina; GF-AFC), y la otra es un marcador de citotoxicidad (bisalanil-alanil-fenilalanil-rodamina 110; bis-AAF-R110). Las proteasas de células vivas y muertas producen diferentes productos, AFC y R110, que tienen diferente espectros de excitación y emisión, permitiéndoles detectarse simultáneamente. Los resultados se proporcionan en unidades relativas de fluorescencia (URF) medidas usando un sistema de detección GloMax-Multi: luminómetro (Promega, EE. UU.). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Ensayo de proliferación

Se midió la tasa de proliferación celular con un ensayo de proliferación celular de una solución acuosa CellTiter 96 (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia se controló con un sistema de detección GloMax-Multi: luminómetro (Promega, EE. UU.).

Reprogramación de fibroblastos

La generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) por reprogramación se realizó usando fibroblastos aislados de biopsias de pacientes con HGPS realizadas en el Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (13-8243) o proporcionadas por el Coriell Institute (Camden, EE. UU.) (AG01972). Las líneas celulares se reprogramaron en iPSC usando el método original de Yamanaka basado en transfección mediada por retrovirus de cuatro factores de transcripción, concretamente Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (41). Las líneas de iPSC se amplificaron hasta el 15.º pase antes de la diferenciación.

Cultivo y diferenciación de células madre pluripotentes

Se cultivaron iPSC de HGPS en fibroblastos de ratón STO, se inactivaron con 10 mg/ml de mitomicina C, se sembraron a 30 000/cm² y se cultivaron como se describe previamente (42). Para la diferenciación, las iPSC se diferenciaron en células madre mesenquimatosas (MSC-iPSC) usando protocolos dirigidos para la diferenciación publicados previamente (43-45). Se obtuvieron VSMC de iPSC por separación mediante clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) de células CD31+ (46).

Ratones

El modelo de ratón de inserción (*Lmna*^{G609G/G609G}) que porta la mutación c.1827C>T (p.Gly609Gly) en el gen *Lmna* endógeno, correspondiente a la mutación de HGPS humano c.1824C>T (p.Gly609Gly) se ha descrito previamente (31). Se inyectó MG132 (1 o 10 µg/kg de peso corporal) bajo anestesia con isoflurano en el músculo gastrocnemio derecho de ratones de inserción homocigóticos de 8 meses de edad (*Lmna*^{G609G/G609G}) 3 veces por semana durante 2 semanas. El músculo contralateral sirvió como control (DMSO). MG132 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y después se diluyó en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril para inyección intramuscular. Ni el vehículo en solitario ni el tratamiento con MG132 produjeron ningún daño aparente o respuestas a agresión en los ratones. Los experimentos en animales se han realizado en cumplimiento de las directrices europeas sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio (directiva EU 2010/63/EU) y de acuerdo con las recomendaciones proporcionadas por la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del French national Institute for Health and Medical Research (INSERM) y el comité de ética de Aix-Marseille University.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático GraphPad Prism. Se ensayaron diferencias entre grupos usando la prueba de la *t* de Student bilateral usando GraphPad Prism. En todos los casos se supuso que los datos experimentales cumplían los requisitos de la prueba de la *t* (distribución normal y varianza similar); en aquellos casos donde la suposición de la prueba de la *t* no era válida, se usó un método estadístico no paramétrico (prueba de Mann-Whitney). Un valor de P menor de 0,05 se consideró significativo. Las barras de error indican el error típico de la media.

RESULTADOS

Identificación de PML-NB de tipo hebra como biomarcadores novedosos en líneas celulares de HGPS

El rasgo distintivo clásico de las células de HGPS es la acumulación de progerina, por lo tanto, los autores de la invención investigaron la localización subcelular de progerina en fibroblastos de tres pacientes afectados con HGPS (AG11498, AG01972, 5968). La inmunotinción reveló una amplia acumulación de puntos destacados intranucleoplasmáticos de progerina y agregados fibrosos a pases posteriores en cultivo (datos no mostrados).

Como se ha propuesto que los PML-NB funcionan como sitios de secuestro de proteínas mal plegadas marcadas para dirigirse a la degradación en el proteasoma (47) y se han implicado en el control de la senescencia celular (48), los autores de la invención plantearon la hipótesis de que estos orgánulos podrían estar implicados en la acumulación o degradación de progerina. Los autores de la invención exploraron la localización de la proteína PML en fibroblastos de tres pacientes afectados con HGPS (AG 11498, AG01972, 5968) y fibroblastos de dos sujetos sanos (8471, 8498). En los pases iniciales (pases 9-15), la distribución de la proteína PML era similar en pacientes y controles, apareciendo los PML-NB como estructuras destacadas clásicas (10-30 cuerpos por célula de 0,5 µm de diámetro). En pases posteriores (pases 16-26), el número de PML-NB de tipo esférico o hebra inusuales aumentaba en los núcleos de HGPS, relativamente a la duplicación celular en cultivo. Por el contrario, los PML-NB anómalos se detectaban muy infrecuentemente en fibroblastos de control normales, en cultivos de edad similar o mayor (pases 29-33) (datos no mostrados).

Los autores de la invención entonces tuvieron acceso a la composición de PML-NB. La doble inmunotinción con anticuerpo anti-PML y anticuerpos contra componentes clásicos de PML-NB (SP100, HP1, DAXX, CBP y ATRX) realizada en fibroblastos de HGPS en pase posterior, mostró que dichas estructuras tienen una composición similar a la de PML-NB convencionales y pueden tener funciones similares (datos no mostrados).

Por lo tanto, los PML-NB de tipo hebra pueden considerarse biomarcadores novedosos en líneas celulares de HGPS.

Los PML-NB son orgánulos de acumulación de progerina en núcleos de fibroblastos de HGPS

Para evaluar una posible correlación entre la presencia de estructuras de PML de tipo hebra y la de progerina, los autores de la invención realizaron doble inmunotinción con anticuerpos anti-PML y antiprogerina sobre fibroblastos de HGPS. De forma interesante, la progerina se colocaliza con PML. Usando microscopia confocal, los autores de la invención mostraron que los PML-NB contienen progerina (datos no mostrados).

Para determinar si otras proteínas residentes en la lámina nuclear, además de la progerina, tienen la capacidad de dirigirse a los PML-NB, los autores de la invención ensayaron la localización subcelular de las laminas A, C, B1, B2, Nup-153 y emerina. Entre las proteínas exploradas, únicamente las laminas de tipo B (B1 y B2) también estaban incluidas dentro de estructuras de PML-NB esféricas o de tipo hebra. Las proyecciones de los planos confocales y la visualización 3D de PML dentro del núcleo indican que los PML-NB de tipo hebra están dentro del nucleoplasma (datos no mostrados). Además, la calreticulina, que se localiza en la luz del retículo endoplasmático o la envuelta nuclear, nunca se ha observado dentro de los PML-NB (datos no mostrados). Esto sugiere que los PML-NB no corresponden a una invaginación de la envuelta nuclear en que puede anclarse la progerina, las laminas de tipo B o la emerina.

MG132, un inhibidor del proteasoma, disminuye los niveles de progerina en células de HGPS

A diferencia del citosol, donde tres sistemas proteolíticos complementarios principales median la degradación proteínica, es decir, autofagia, el sistema endopeptidásico de ubiquitina (UPS) y caspasas, en núcleos de células eucariotas únicamente funcionan el UPS y las caspasas. Se cree que la degradación proteínica mediada por el proteasoma nuclear se produce dentro de distintos focos nucleoplasmáticos (47). Estos subdominios nucleares proteolíticos representan un subconjunto de los PML-NB donde la ubiquitina, los proteasomas y los conjugados de SUMO se concentran (49-52). La presencia de ubiquitina y el proteasoma de 26S conjuntamente con la progerina en las estructuras de PML de tipo hebra, respalda fuertemente que podrían estar implicados en la degradación de proteínas y, en particular, progerina mediante el UPS.

Para evaluar si los niveles de actividad del proteasoma podrían incluir en la acumulación de progerina en células de HGPS, los autores de la invención midieron, usando sustratos fluorogénicos específicos, las tres distintas actividades catalíticas del proteasoma: actividad de quimiotripsina, tripsina y de tipo caspasa. Las células de HGPS muestran actividades aumentadas de las tres actividades enzimáticas del proteasoma en comparación con sujetos sanos de edad similar o mayor (figura 1A). Esto indica que el sistema UPS puede alcanzar un punto de saturación en que se excede la capacidad de degradar agregados de progerina. De hecho, dado que los fibroblastos de pacientes con HGPS presentan ROS elevado (53), la agresión oxidativa podría dar lugar a saturación del proteasoma resultante de una cantidad excesiva de proteínas mal plegadas, dañadas oxidativamente y ubiquitinadas. Se ha descrito previamente una disminución significativa en la capacidad de degradación de proteínas de los proteasomas en fibroblastos de HGPS; un alteración que se produce, en parte, como consecuencia de un número disminuido de

subunidades requeridas para ensamblar el complejo proteolítico, así como altos niveles de ROS y proteínas oxidadas (54). En conjunto, estos resultados indican que la progerina queda atrapada dentro de los PML-NB y no se degrada de forma natural a través del sistema endopeptidásico de ubiquitina (UPS).

- 5 Para determinar si los inhibidores del proteasoma incluyen en el nivel de progerina, los autores de la invención realizaron un tratamiento de evolución temporal con MG132 10 μ M sobre líneas celulares de HGPS y se investigaron los niveles de progerina por transferencia de Western. Inesperadamente, MG132 indujo una disminución de los niveles de progerina desde 6 h hasta 48 h del tratamiento con MG132. Cuando se normalizaba con un control de tubulina, la cuantificación de proteína por transferencia de Western revelaba una reducción de -31 %, 58 % y 65 % en las cantidades de progerina a las 6 h, 24 h y 48 h, respectivamente, en células de HGPS tratadas con MG132 en comparación con células de HGPS tratadas con DMSO (figura 1B).

Los inhibidores del proteasoma aldehído peptídico (MG132) y boronato peptídico (MG262), pero no otros análogos de boronato (bortezomib y carfilzomib) provocan eliminación de progerina mientras muestras diferente inhibición en la actividad enzimática del proteasoma

- Para confirmar o descartar la implicación de la inhibición del proteasoma en la eliminación de la progerina, los autores de la invención ensayaron varios inhibidores del proteasoma en las mismas condiciones. MG115 (Z-Leu-Leu-nVal-al), otro inhibidor de aldehído del proteasoma, que inicialmente se creía menos potente que MG132, se descubrió que tenía la misma eficacia en suprimir la acumulación de progerina (figura 1C). El análogo de boronato MG262 (Z-Leu-Leu-Leu-boronato) era menos eficaz a pesar de su mayor afinidad por los sitios activos del proteasoma. MG262 es más potente que el aldehído MG132 (55), y los autores de la invención, por tanto, esperaban que MG262 fuera eficaz a menores concentraciones que MG132 para conseguir el mismo efecto. Sin embargo, los autores de la invención descubrieron que MG262 inducía eliminación de progerina en células de HGPS únicamente a dosis equivalentes a las de MG132 (datos no mostrados). Estos hallazgos son coherentes con la acción diferencial conocida de MG132 y MG262 sobre las actividades enzimáticas de caspasa y del proteasoma (56).

- Los autores de la invención a continuación ensayaron el efecto de bortezomib y carfilzomib, dos inhibidores del proteasoma aprobados por la FDA (tratamiento de mieloma múltiple), sobre la eliminación de progerina. A diferencia de los aldehídos MG132 y MG115, estas dos moléculas no inducen eliminación de progerina ya que la expresión de progerina se mantiene como en los controles de HGPS (figura 1C y datos adicionales no mostrados). Esta ineficacia está relacionada probablemente con distinto efecto sobre las actividades enzimáticas del proteasoma en líneas celulares de HGPS (figura 1D). Sin embargo, estos hallazgos sugieren que el efecto de MG132 sobre la eliminación de progerina no está mediada únicamente por su acción conocida sobre el proteasoma.

La eliminación de progerina se debe parcialmente a inducción de autofagia

- Además del sistema endopeptidásico de ubiquitina, otra ruta principal para la degradación intracelular de proteínas es la ruta de autofagia-lisosómica. La disminución observada de progerina tras la inhibición del proteasoma planteó la cuestión de la manera en que se produce esta eliminación y sugiere además que la progerina podría ser un sustrato para la degradación autofágica, especialmente porque se ha mostrado que la inhibición del proteasoma provocaba una potenciación compensatoria de la autofagia (57-59). Para evaluar si el proceso de macroautofagia estaba implicado en la eliminación de progerina potenciada por MG132, los autores de la invención inhibieron la autofagia usando cloroquina, un agente lisosómico que altera directamente el pH ácido de los lisosomas, o bafilomicina A1, un inhibidor de la bomba de protones lisosómica. El tratamiento de MG132 de fibroblastos de HGPS expuestos a con alta dosis de cloroquina o bafilomicina A1 inhibió parcialmente el efecto de MG132 e indujo reexpresión parcial de progerina (figura 2), lo que sugiere que la eliminación aumentada de progerina observada con tratamiento con MG132 está mediada en parte por la ruta autofágica-lisosómica. Sorprendentemente, el tratamiento con cloroquina o bafilomicina A1 en solitario a altas dosis también causaba niveles de expresión reducidos de progerina (figura 2). De hecho, se ha informado de que la inhibición de autofagia da lugar a actividades aumentadas del proteasoma y regulación por aumento de las subunidades del proteasoma en cáncer de colon humano cultivado (60). Sin embargo, las tres actividades del proteasoma no se modifican tras el tratamiento de células de HGPS con estos dos inhibidores. Estos hallazgos sugieren que la activación del proteasoma no está implicado en la reducción de los niveles de progerina inducidos por cloroquina o bafilomicina A1. Se usó LC3B para evaluar el nivel de autofagia ya que la conversión de LC3-I en LC3-II por lipidación proporciona un indicador de actividad autofágica. Como cabía esperar, los niveles de LC3B-II se aumentan después de tratamiento con MG132, simultáneamente con la disminución de los niveles de progerina (figura 2A). La reexpresión incompleta de progerina después del bloqueo simultáneo de UPS y autofagia sugiere que la eficacia de MG132 sobre la eliminación de progerina está mediada, además de por autofagia, por otra actividad proteolítica simultánea.

- La caspasa-6 está ampliamente considerada responsable de la escisión de las laminas A y C durante la apoptosis. La lamina A/C, pero también la progerina muestran un sitio de escisión por caspasa 6 VEID conservado (61-64) ubicado en la región conectora no helicoidal L12 en la posición 227-230. Para investigar la implicación de la caspasa-6 en la eliminación de progerina inducida por MG132, los autores de la invención trataron células de HGPS durante 48 h con una combinación de MG132 e inhibidor de caspasa-6. De nuevo, el nivel de progerina permaneció por debajo del control de HGPS en presencia o ausencia de cloroquina (figura 2B). De lo contrario, como la progerina tiene una señal

de exportación nuclear rica en leucina (NES), se ensayó una posible exportación de progerina mediada por CRM1 al citoplasma usando leptomicina B, que inhibe la exportación nuclear dependiente de CRM1 de proteínas que contienen una NES rica en leucina (65). Resultó que la leptomicina B no inhibe la eliminación de progerina inducida por MG132. Como la progerina no puede degradarse en el nucleoplasma por el proteasoma cuando se inhibe por MG132, su eliminación, por tanto, podría explicarse por su degradación mediante una ruta alternativa, o mediante regulación por disminución de proteína neosintetizada o mediante una descarga insensible a leptomicina B de progerina nucleoplasmática. De hecho, la salida al citoplasma a través interrupciones de la envuelta nuclear de complejos nucleares macromoleculares o que contienen PML ya se ha mostrado en laminopatías (66).

10 **La progerina se acumula en vacuolas autofágicas tras inhibición del proteasoma usando MG132**

Se ha informado de que MG132 puede dar lugar a que las proteínas componentes de los PML-NB se transloquen al nucleolo [35,36]. Otros hallazgos recientes han ilustrado una relación dinámica entre el nucleolo y los PML-NB [37-39]. Para investigar la localización subcelular de la progerina tras el tratamiento con MG132, los autores de la invención realizaron una inmunofluorescencia indirecta de evolución temporal usando progerina y anticuerpos contra PML en líneas celulares de HGPS tratadas con MG132 (10 µM) durante 6 h y 24 h. El tratamiento de 24 h con MG132 induce la formación de focos intranucleares grandes de progerina y PML (datos no mostrados). Sea en fibroblastos de sujetos sanos o los de pacientes con HGPS, los análisis usando anticuerpos contra fibrilarina, que está localizada en el componente fibrilar denso del nucleolo, mostraron solapamiento con PML y emerina (datos no mostrados). Se ha informado de que p53 está localizado con proteasomas inactivados en regiones intranucleolares distintas de los compartimentos de producción de ribosomas cuando las células se trataban con MG132 (67). Estas observaciones son coherentes con nuestros resultados, ya que también se observó p53 localizado en el nucleolo. En las mismas condiciones, los autores de la invención han mostrado que las laminas B1/B2, la subunidad del proteasoma de 26S y la ubiquitina se colocan con PML en el nucleolo. Por lo tanto, el nucleolo podría funcionar como un sitio de secuestro alternativo que inmoviliza y almacena temporalmente la progerina acumulada cuando se bloquea la degradación dependiente del proteasoma, ya que los autores de la invención detectaron PML y LC3B colocados en el citosol tras tratamiento de 24 h con MG132 (datos no mostrados). Mientras, durante este periodo de tratamiento, la progerina permanecía principalmente localizada dentro del nucleolo (datos no mostrados), después de 48 h, se detectaban agregados de progerina en el citosol donde los autores de la invención demostraron su colocación con LC3B (datos no mostrados). Para investigar adicionalmente el tipo de agregados citosólicos que contienen progerina, los autores de la invención exploraron otros marcadores de vacuolas autofágicas tales como p62, un sustrato de autofagia conocido y LAMP-2, una proteína de membrana lisosómica. El marcaje por doble inmunofluorescencia con anticuerpos contra progerina y p62 o LAMP-2 confirmó que la progerina citosólica se acumulaba en vesículas positivas para p62 y LAMP-2 después de 48 h de exposición a MG132 de líneas celulares de HGPS. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la progerina se acumula en vacuolas autofágicas tras tratamiento con MG132 y, por tanto, experimenta degradación autofágica en el citoplasma.

MG132 regula por disminución el corte y empalme del ARNm aberrante de prelamina A

Como el bloqueo de todas las rutas principales de degradación no pudo restaurar el nivel de progerina en comparación con células de control de HGPS, los autores de la invención evaluaron además si MG132 podía tener un efecto a nivel transcripcional sobre las laminas y la progerina. Por tanto, los autores de la invención realizaron ensayos cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (qRT-PCR) para cuantificar los niveles de transcrito de progerina en células de HGPS tratadas con MG132 y de control. Como se muestra en la figura 3A, el tratamiento con MG132 casi extinguió la expresión de ARNm de progerina de una manera dependiente del tiempo, lo que indica su efecto doble sobre la progerina tanto a nivel de proteína como a nivel transcripcional.

Se ha mostrado previamente una función reguladora de un subconjunto de proteínas ricas en serina-arginina (SR), incluyendo el factor de corte y empalme 1 rico en serina-arginina (SRSF-1) sobre el reconocimiento del sitio de corte y empalme 5' (5'SS) del exón 11 de *LMNA* y la producción de lamina A y progerina a partir de alelos de *LMNA* mutados c.1824C>T (32). Además, se ha mostrado que la estimulación de linfocitos T con MG132 induce activamente la degradación de SRSF-1 y que la caspasa-3 contribuye a la regulación de la expresión de proteína SRSF-1 durante la activación de linfocitos T (68). Dada la reexpresión parcial de progerina en presencia de inhibidores de autofagia y el nivel de expresión disminuido simultáneo de ARNm de progerina después de tratamiento con MG132, los autores de la invención plantearon la hipótesis de que el efecto de MG132 también podría estar mediado por una disminución de la expresión de SRSF-1 y, por lo tanto, el corte y empalme del preARNm de progerina y la producción de progerina. De forma interesante, los autores de la invención demuestran que 48 h de tratamiento de fibroblastos de HGPS con MG132 provocaba una disminución significativa de los niveles de SRSF-1 simultáneamente con la disminución de los niveles de progerina (figura 3B). Para excluir que tras la adición de MG132, la progerina pudiera quedar insoluble y no extraerse completamente de los agregados, los autores de la invención solubilizaron las células con urea. Este experimento muestra que la progerina reaparece después de 72 h de tratamiento. Por tanto, un efecto a largo plazo sobre la eliminación de progerina puede requerir el retratamiento después de 48 h. En vías de explorar si los mecanismos que implican caspasas desempeñan una función en la expresión de SRSF-1, los autores de la invención añadieron el inhibidor universal de caspasa (VAD) durante el tratamiento de las células de HGPS y observaron un rescate de la expresión de proteína SRSF-1, simultáneamente con un aumento de progerina que alcanza ligeramente los niveles de control. También es de gran interés apreciar que se observaba mayor reexpresión de progerina usando

una combinación de MG132, inhibidor universal de caspasa y cloroquina. De forma interesante, los autores de la invención observaron que los inhibidores de autofagia (cloroquina y bafilomicina A1) también puede disminuir los niveles de SRSF-1, que podrían explicar la disminución de los niveles de progerina observados tras su tratamiento. El efecto de la bafilomicina A1 sobre la reducción de los niveles de SRSF-1 ya se ha descrito, de hecho, en linfocitos T

activados (68). Para entender mejor la implicación de SRSF-1 en la regulación de la expresión de progerina, los autores de la invención trataron células de HGPS con ARN interferentes pequeños (ARNip) para reducir transitoriamente el contenido celular de SRSF-1. Los resultados presentados en la figura 5d muestran que la atenuación por ARNip de SRSF-1 reduce enormemente los niveles de progerina, lo que evidencia la importante función de este factor de corte y empalme en la eliminación de progerina inducida por MG132.

Tomados conjuntamente, los resultados indica que la inducción de autofagia, las caspasas y los mecanismos de corte y empalme mediante la extinción de SRSF1 desempeñan funciones convergentes hacia la eliminación de progerina bajo tratamiento con MG132.

Como SRSF1 está implicado en el control del cambio de corte y empalme de lamina A/progerina, los autores de la invención plantearon la hipótesis de que MG132 modula la expresión de transcrito de lamina A. Para ensayar esta hipótesis, los autores de la invención usaron qRT-PCR para explorar los niveles de ARNm sobre células de HGPS después de tratamiento con MG132. Los análisis de qRT-PCR de evolución temporal de MG132 revelaron una disminución significativa de transcritos de lamina A, mientras que observaba una disminución mucho menos pronunciada de niveles de transcrito de lamina C (figura 4A). La reducción observada de ARNm de lamina A/C instigó a los autores de la invención a evaluar sus niveles de proteína correspondientes tras la inhibición del proteasoma. Como se muestra en la figura 4B, los autores de la invención descubrieron que tanto los niveles de proteína lamina A como los de C se aumentaban durante 48 h de tratamiento con MG132.

MG132 reduce los niveles de progerina en MSC y VSMC derivadas de iPS del paciente

Para determinar si MG132 también influye en el nivel de progerina en otros linajes celulares, los autores de la invención generaron iPSC a partir de fibroblastos de pacientes con HGPS. Células madre mesenquimatosas (MSC) y células de músculo liso vascular (VSMC) derivadas de iPSC de HGPS presentaban las anomalías habitualmente descritas de fibroblastos de HGPS, concretamente, pérdida de capacidades de proliferación, senescencia prematura y vesiculación nuclear (69, 70). Los autores de la invención realizaron inmunotinción de VSMC tratadas con MG132 con anticuerpo contra progerina.

Las VSMC tratadas con MG132 dieron lugar a una reducción de progerina significativamente empezando a 1,25 μ M (datos no mostrados). En paralelo, los autores de la invención investigaron los niveles de progerina y SRSF-1 tras tratamiento con MG132 y compararon fibroblastos de HGPS, iPS-MSC e iPS-VSMC. Esto reveló que, en todas líneas celulares ensayadas, los niveles de progerina y SRSF-1 se disminuían por tratamiento con MG132 (datos no mostrados). La eliminación de progerina observada no está ligada a apoptosis o muerte celular aumentada, como es el caso para los otros inhibidores del proteasoma aprobados por la FDA, ya que el ensayo de viabilidad mostró que las dosis usadas en este estudio no inducen mortalidad significativa en fibroblastos de HGPS, iPS-MSC e iPS-VSMC (figura 6), lo que indica una toxicidad muy baja y un fuerte potencial de MG132 como agente terapéutico para progeria.

MG132 reduce los niveles de progerina en músculo de ratones *Lmna*^{G609G/G609G}.

Como MG132 induce una eliminación casi completa de progerina en diversas líneas celulares, fue de interés investigar su efecto *in vivo*. Los autores de la invención, por lo tanto, ensayaron si la inyección intramuscular de MG132 también podría potenciar la eliminación de progerina en nuestro modelo de ratón de inserción (*Lmna*^{G609G/G609G}) que porta la mutación c.1827C>T (p.Gly609Gly) en el gen *Lmna* endógeno (31), correspondiente a la mutación c.1824C>T (p.Gly608Gly) en HGPS humano. Como se muestra en la figura 7, 1 μ g/kg de tratamiento con MG132 induce una disminución significativa del nivel de progerina en el músculo tratado en comparación con el músculo colateral sin tratar. En estas condiciones, se observó un pequeño aumento en lamina A y una disminución de lamina C aunque estos cambios no son significativos. A 10 μ g/kg de peso corporal, la inyección de MG132 también provoca una disminución significativa de los niveles de progerina, pero está acompañada por una disminución en lamina C. Sin embargo, los niveles de lamina A permanecen constantes o aumentan ligeramente, lo que debe compensar la disminución de lamina C como se muestra previamente en ratones *Lmna*^{LAO/LAO} que eran sanos, a pesar de una ausencia completa de lamina C (71).

Estos datos proporcionan evidencias de que en fibroblastos de pacientes con HGPS, la progerina se secuestra en PML-NB, donde están ubicados el proteasoma y las proteínas ubiquitinadas. La inhibición del proteasoma usando MG132 induce tanto reducción mediada por caspasa de los niveles de expresión de SRSF-1 como degradación de progerina inducida por autofagia que se produce después de traslocación nucleolar de progerina y su posterior exportación al citosol.

Los resultados presentados en este documento proporcionan una estrategia alentadora para tratar a niños afectados con progeria, basándose en la eliminación de progerina tras tratamiento con MG132. La especificidad observada sobre progerina, reservando las laminas de tipo A, respalda adicionalmente la idea de que aparte de la progeria típica,

enfermedades asociadas con deficiencia de prelamina A podrían beneficiarse del mismo tratamiento. Finalmente, considerando la actividad de los inhibidores del proteasoma de la familia de MG aldehído (MG132 y MG115 en particular) sobre la regulación por disminución de SRSF-1, esta familia de moléculas podría tener impactos beneficiosos sobre el envejecimiento fisiológico durante el que se acumula progerina, así como sobre enfermedades que implican la activación de sitios críticos de corte y empalme usados por SRSF-1 o enfermedades que muestran sobreexpresión de SRSF1 tales como algunos cánceres.

Ejemplo 2: Inhibidores del proteasoma regulan por disminución SRSF-1 en líneas celulares de adenocarcinoma humano

Material y métodos

Cultivos celulares

Seis líneas celulares de adenocarcinoma humano (pulmón: A549, HCC827; colon: HCT116, HT-29; páncreas: PANC-1, Mis PaCa-2) se obtuvieron de la ATCC, se cultivaron según lo requerido y se amplificaron (pases 50 a 60) para obtener viales que contenían 5×10^5 a 10^6 células/vial que se congelaron en DMSO y se almacenaron a -80°C antes de uso adicional. La viabilidad celular se comprobó como se describe anteriormente.

Tratamiento con inhibidor del proteasoma

MG132 (474790. Merck Chemical LTD), MG262 (1-120-200. R&D Systems) y bortezomib (S1013. Euromedex) se incubaron durante 24 h a 3 concentraciones, 0,1, 1 y 10 μM en DMSO. Las células de control se incubaron en vehículo DMSO únicamente.

Anticuerpos

Los anticuerpos contra SRSF1, lamina A/C, progerina, actina y GAPDH (usados como controles de carga) se han descrito en el ejemplo 1.

La transferencia de Western y los protocolos de análisis de imágenes se han detallado en el ejemplo 1 anterior

RESULTADOS

Todas líneas celulares de adenocarcinoma estudiadas expresaban SRSF-1, con una banda principal de ~ 32 kDa correspondiente a la isoforma ASF2 (cuya intensidad se midió) y dos bandas minoritarias, siendo la de ~ 28 kDa la isoforma ASF1 de SRSF-1 y siendo la banda de ~ 60 kDa probablemente un dímero. Cuando se depositaron 40 μg de proteínas, la intensidad de la banda de SRSF-1 fue dos veces la intensidad medida en los carriles que contenían 20 μg de proteínas depositadas.

El vehículo DMSO aumentó la cantidad de SRSF-1 (figura 8). MG262, MG132 y bortezomib indujeron una disminución en la cantidad de SRSF-1, de -20 % a -77 %, mostraron un efecto de respuesta a la dosis, aumentando la eficacia inhibidora de bortezomib a MG132 después MG262. Además, incluso en el mismo intervalo, los datos fueron diferentes dependiendo del control de carga de las cargas usado, actina o GAPDH.

Todos los estudios en líneas celulares evidenciaron diversas cantidades de lamina A/C, pero nunca expresaron progerina.

Estos resultados confirmaron los obtenidos en células de HGPS usando MG132 y MG262 con respecto a SRSF1, mientras que bortezomib mostraba un efecto diferente en células de HGPS y en células cancerosas.

Ejemplo 3: El inhibidor del proteasoma MG132 tiene un efecto positivo sobre distrofia muscular oculofaríngea (OPMD) en el modelo de *Drosophila*

Introducción

La distrofia muscular oculofaríngea (OPMD) es una distrofia muscular autosómica dominante, de aparición tardía que habitualmente empieza en la cincuentena o sesentena, y se caracteriza por caída progresiva del párpado (ptosis), dificultades al tragar (disfagia) y debilidad proximal de las extremidades. La OPMD es una enfermedad infrecuente (1/100 000 en Europa), con una distribución mundial; es la distrofia muscular más común en los judíos de Bukhara (1/600) y en Quebec (1/1000) (revisiones: (72, 73)). No hay tratamiento farmacológico para esta enfermedad actualmente; puede realizarse cirugía para mejorar la capacidad de tragar y para levantar la caída de los párpados.

El gen responsable de OPMD se ha identificado como el gen que codifica la proteína de unión nuclear 1 a poli(A) (PABPN1). En pacientes con OPMD, *PABPN1* tiene una expansión de una repetición de GCG que codifica un tramo de polialanina ubicado en el extremo N de la proteína (74). La expansión de polialanina es moderada ya que hay 10

alaninas presentes en la proteína normal, y se expanden hasta 12 a 17 alaninas en las formas mutantes de la proteína.

Un rasgo distintivo patológico de OPMD es inclusiones nucleares en fibras musculares, que están compuestas de filamentos tubulares y contienen PABPN1 insoluble mutante, así como Hsp70, ubiquitina y subunidades del proteasoma (75-78). Varias proteínas de unión al ARN y las metil transferasas de arginina de tipo I, PRMT1 y PRMT3, conocidas por metilar PABPN1, también se reclutan en las inclusiones nucleares (78-80). Las expansiones de polialanina en PABPN1 inducen mal plegamiento y agregación en inclusiones que resultan de un recambio más lento de la proteína mutante.

PABPN1 tiene una función en la poliadenilación nuclear, una reacción de procesamiento del ARNm que da lugar a la formación de la cola de poli(A) en el extremo 3' de los ARNm. PABPN1 se une a las colas de poli(A) nacientes durante esta reacción y tiene dos funciones: estimulación de la poli(A) polimerasa, la enzima que sintetiza la cola de poli(A), y control de la longitud de la cola de poli(A) (81-84). PABPN1 también está implicado en el control de las colas de poli(A) de ARNm citoplasmático en embriones iniciales (81), en la descomposición de ARN poli(A) o exportación desde el núcleo (85), en la regulación de elección alternativa de sitio de poli(A) (86, 87) y en el recambio de ARN no codificantes largos (ARNncl) (88).

Se ha desarrollado un modelo en *Drosophila* de OPMD en que se expresa específicamente PABPN1 de mamífero expandido con alanina (PABPN1-17ala) en músculos de *Drosophila* (89, 90). Estos modelos recapitulan las características de la enfermedad, concretamente debilidad muscular progresiva y degeneración, y formación de agregados nucleares de PABPN1. La relevancia de los modelos de *Drosophila* se han validado por el hecho de que los mecanismos moleculares identificados como participantes en OPMD en *Drosophila* se han confirmado en biopsias de pacientes con OPMD (91, 91). Los modelos de *Drosophila* han sido útiles en identificar fármacos activos potenciales para OPMD, en particular fármacos antiagregación (92).

Materiales y métodos

Se preparó alimento complementado con fármaco de la siguiente manera. Se reconstituyó medio instantáneo de *Drosophila* (Carolina Biological Supply Company) en cada vial con una solución de levadura al 1 % en agua, complementada con concentraciones crecientes del fármaco solubilizado en DMSO (dimetilsulfóxido), o DMSO en solitario. MG132 se adquirió de Santa Cruz Biotechnology (SC-201270). Cada vial contenía 5 ml o 2,5 ml de medio reconstituido, para criar larvas o adultos, respectivamente. Los individuos se alimentaron con el fármaco desde los estadios larvarios. Se transfirieron de 70 a 80 larvas del primer estadio por vial y se desarrollaron en el mismo vial hasta la edad adulta; los adultos se transfirieron a un nuevo vial con la misma concentración de fármaco. Para determinar la toxicidad del fármaco, se transfirieron 80 larvas del primer estadio a viales que contenían medio complementado con fármaco o DMSO en solitario. Los individuos que alcanzaban la edad adulta se puntuaban. Se cuantificó la postura anómala de las alas recogiendo machos adultos en el nacimientos, combinando cinco machos por vial y puntuando la posición anómala de las alas cada día por observación directa de las moscas a través de los viales, sin anestesia.

Resultados

Los análisis transcriptómicos han mostrado una desregulación general del sistema endopeptidásico de ubiquitina que está conservado en modelos de *Drosophila* y ratón de OPMD y en biopsias de pacientes (20). Además, la actividad del proteasoma está regulada por aumento en músculos, en el modelo de ratón de OPMD y esto se correlaciona con la atrofia muscular (93). Estos resultados llevaron a los autores de la invención a proponer que la desregulación de UPS podría participar en OPMD mediante degradación aumentada de proteínas, que daría lugar a atrofia muscular. Los autores de la invención, por tanto, ensayaron si reducir la actividad del proteasoma usando MG132 podría ser beneficioso para OPMD en el modelo de *Drosophila*. Los autores de la invención usaron el modelo de *Drosophila* en que PABPN1-17ala se expresa de forma constitutiva en músculos de vuelo indirectos del adulto a partir del transgén *Act88F-PABPN1-17ala* (90), para ensayar el efecto de MG132 *in vivo*. Se administró MG132 por vía oral en el alimento a tres concentraciones de 400, 500 y 600 μ M desde los estadios larvarios. Los ensayos de supervivencia mostraron que MG132 600 μ M (en DMSO al 0,2 %) en el medio de la mosca no es perjudicial para la viabilidad (figura 9A). La expresión de PABPN1-17ala en los músculos de vuelo indirectos da lugar a una postura anómala de las alas, resultante de la función muscular afectada y la degeneración muscular (89). Los defectos posturales de las alas se registraron desde el día 3 hasta el día 11 de la edad adulta. El efecto de MG132 se cuantificó registrando el número de moscas que expresan Act88F-PABPN1-17ala con postura anómala de las alas. Las tres concentraciones de MG132 mostraron un efecto beneficioso ya que provocaban una disminución significativa en el número de moscas con postura anómala de las alas en comparación con DMSO en solitario (figura 9B). Por lo tanto, un inhibidor del proteasoma, MG132, mejoró una miopatía genética, OPMD, caracterizada por la acumulación nuclear de agregados de proteínas tóxicas.

Referencias

1. R. C. Hennekam, Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. American journal of medical genetics. Parte A 140, 2603-2624 (2006).
2. M. A. Merideth *et al.*, Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. The New England journal

of medicine 358, 592-604 (2008).

3. A. De Sandre-Giovannoli *et al.*, Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055 (2003).

4. M. Eriksson *et al.*, Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298 (2003).

5. P. Cau *et al.*, Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in cell & developmental biology*, (2014).

6. P. Scaffidi, T. Misteli, Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312, 1059-1063 (2006).

7. D. McClintock *et al.*, The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PloS one* 2, e1269 (2007).

8. H. Takeuchi, T. M. Runger, Longwave UV Light Induces the Aging-Associated Progerin. *J Invest Dermatol* 7, 71 (2013).

9. M. Hosseini *et al.*, Premature aging features rescue by inhibition of NADPH oxidase activity in XPC deficient mice. *Journal of Investigative Dermatology* 135, 1108-1118 (2015).

10. M. Hosseini, K. Ezzedine, A. Taieb, H. R. Rezvani, Oxidative and Energy Metabolism as Potential Clues for Clinical Heterogeneity in Nucleotide Excision Repair Disorders. *J Invest Dermatol* 135, 341-351 (2015).

11. K. Cao *et al.*, Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest* 121, 2833-2844 (2011).

12. P. Scaffidi, T. Misteli, Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nature cell biology* 10, 452-459 (2008).

13. J. Espada *et al.*, Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *The Journal of cell biology* 181, 27-35 (2008).

14. C. D. Ragnauth *et al.*, Prelamin A Acts to Accelerate Smooth Muscle Cell Senescence and Is a Novel Biomarker of Human Vascular Aging. *Circulation* 121, 2200-2210 (2010).

15. M. Olive *et al.*, Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2301-2309 (2010).

16. F. J. Blanco, C. Bernabeu, The Splicing Factor SRSF1 as a Marker for Endothelial Senescence. *Front Physiol* 3, 54 (2012).

17. H.-J. Jung *et al.*, Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E423-E431 (2012).

18. X. Nissan *et al.*, Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA. *Cell reports* 2, 1-9 (2012).

19. J. C. Kovacic, P. Moreno, V. Hachinski, E. G. Nabel, V. Fuster, Cellular senescence, vascular disease, and aging: Parte 1 de una revisión de 2 partes. *Circulation* 123, 1650-1660 (2011).

20. Y. Takamori, T. Wakabayashi, T. Mori, J. Kosaka, H. Yamada, Organization and cellular arrangement of two neurogenic regions in the adult ferret (*Mustela putorius furo*) brain. *The Journal of comparative neurology* 522, 1818-1838 (2014).

21. H.-M. Gao, H. Zhou, J.-S. Hong, NADPH oxidases: novel therapeutic targets for neurodegenerative diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* 33, 295-303 (2012).

22. P. B. Campos, B. S. Paulsen, S. K. Rehen, Accelerating neuronal aging in *in vitro* model brain disorders: a focus on reactive oxygen species. *Frontiers in aging neuroscience* 6, 292 (2014).

23. A. Barascu *et al.*, Oxydative stress alters nuclear shape through lamins dysregulation: a route to senescence. *Nucleus (Austin, Tex.)* 3, 411-417 (2012).

24. L. B. Gordon *et al.*, Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16666-16671 (2012).

25. J. Couzin-Frankel, *Medicine*. Drug trial offers uncertain start in race to save children with progeria. *Science* 337, 1594-1595 (2012).

26. S. A. Holstein, R. J. Hohl, Is there a future for prenyltransferase inhibitors in cancer therapy? *Current Opinion in Pharmacology* 12, 704-709 (2012).

27. Y. Lin, Y. Zheng, Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 1-20 (2015).

28. E. T. Efueta, K. Keyomarsi, Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer research* 66, 1040-1051 (2006).

29. S. G. Young, S. H. Yang, B. S. Davies, H. J. Jung, L. G. Fong, Targeting protein prenylation in progeria. *Science translational medicine* 5, 171ps173 (2013).

30. P. Scaffidi, T. Misteli, Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11, 440-445 (2005).

31. F. G. Osorio *et al.*, Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Science translational medicine* 3, 106ra107 (2011).

32. I. C. Lopez-Mejia *et al.*, A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Human molecular genetics* 20, 4540-4555 (2011).

33. K. Cao *et al.*, Rapamycin Reverses Cellular Phenotypes and Enhances Mutant Protein Clearance in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells. *Science translational medicine* 3, 89ra58 (2011).

34. V. Cenni *et al.*, Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria. *Eur J Histochem* 55, e36 (2011).

35. Z. Dou *et al.*, Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527, 105-109 (2015).

36. A. von Mikecz, The nuclear ubiquitin-proteasome system. *Journal of cell science* 119, 1977-1984 (2006).

37. Q. S. Padiath *et al.*, Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature genetics* 38, 1114-1123 (2006).
38. F. G. Osorio *et al.*, Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-kappaB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes & development* 26, 2311-2324 (2012).
- 5 39. C. A. Ascoli, G. G. Maul, Identification of a novel nuclear domain. *The Journal of cell biology* 112, 785-795 (1991).
40. S. Das, A. R. Krainer, Emerging Functions of SRSF1, Splicing Factor and Oncoprotein, in *RNA Metabolism and Cancer*. *Mol Cancer Res* 12, 1195-1204 (2014).
41. K. Takahashi *et al.*, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872 (2007).
- 10 42. L. Aubry *et al.*, Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons *in vitro* and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16707-16712 (2008).
43. K. Giraud-Triboulet *et al.*, Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiological genomics* 43, 77-86 (2011).
- 15 44. H. Guenou *et al.*, Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745-1753 (2009).
45. X. Nissan *et al.*, Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 14861-14866 (2011).
- 20 46. S. Levenberg, L. S. Ferreira, L. Chen-Konak, T. P. Kraehenbuehl, R. Langer, Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nature protocols* 5, 1115-1126 (2010).
47. T. D. Rockel, D. Stuhlmann, A. von Mikecz, Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *Journal of cell science* 118, 5231-5242 (2005).
- 25 48. G. Ferbeyre, PML a target of translocations in APL is a regulator of cellular senescence. *Leukemia* 16, 1918-1926 (2002).
49. R. P. Fabunmi, W. C. Wigley, P. J. Thomas, G. N. DeMartino, Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *Journal of cell science* 114, 29-36 (2001).
- 30 50. V. Lallemand-Breitenbach *et al.*, Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *The Journal of experimental medicine* 193, 1361-1371 (2001).
51. M. Lafarga *et al.*, Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Molecular biology of the cell* 13, 2771-2782 (2002).
- 35 52. V. Lallemand-Breitenbach *et al.*, Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nature cell biology* 10, 547-555 (2008).
53. S. A. Richards, J. Muter, P. Ritchie, G. Lattanzi, C. J. Hutchison, The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine. *Human molecular genetics* 20, 3997-4004 (2011).
- 40 54. G. Viteri, Y. W. Chung, E. R. Stadtman, Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mechanisms of ageing and development* 131, 2-8 (2010).
55. J. Adams *et al.*, Potent and selective inhibitors of the proteasome: Dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8, 333-338 (1998).
- 45 56. S. Meiners *et al.*, Nontoxic proteasome inhibition activates a protective antioxidant defense response in endothelial cells. *Free radical biology & medicine* 40, 2232-2241 (2006).
57. T. Pan *et al.*, Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiology of disease* 32, 16-25 (2008).
58. W. X. Ding *et al.*, Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology* 171, 513-524 (2007).
- 50 59. V. I. Korolchuk, F. M. Menzies, D. C. Rubinsztein, Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS letters* 584, 1393-1398 (2010).
60. X. J. Wang *et al.*, A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy* 9, 1500-1508 (2013).
61. T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, E. S. Alnemri, Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer research* 55, 2737-2742 (1995).
- 55 62. K. Orth, A. M. Chinnaiyan, M. Garg, C. J. Froelich, V. M. Dixit, The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *The Journal of biological chemistry* 271, 16443-16446 (1996).
63. E. A. Slee, C. Adrain, S. J. Martin, Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 7320-7326 (2001).
- 60 64. A. Takahashi *et al.*, Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8395-8400 (1996).
65. M. Fukuda *et al.*, CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-311 (1997).
66. W. H. De Vos *et al.*, Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular

- compartmentalization in laminopathies. *Human molecular genetics* 20, 4175-4186 (2011).
67. T. Kruger, U. Scheer, p53 localizes to intranucleolar regions distinct from the ribosome production compartments. *Journal of cell science* 123, 1203-1208 (2010).
68. V. R. Moulton, A. R. Gillooly, G. C. Tsokos, Ubiquitination Regulates Expression of the Serine/Arginine-rich Splicing Factor 1 (SRSF1) in Normal and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) T Cells. *The Journal of biological chemistry* 289, 4126-4134 (2014).
69. X. Nissan *et al.*, Unique preservation of neural cells in Hutchinson-Gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA. *Cell reports* 2, 1-9 (2012).
70. J. Zhang *et al.*, A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell stem cell* 8, 31-45 (2011).
71. C. Coffinier *et al.*, Direct synthesis of lamin A, bypassing prelamin A processing, causes misshapen nuclei in fibroblasts but no detectable pathology in mice. *The Journal of biological chemistry* 285, 20818-20826 (2010).
72. Abu-Baker, G. A. Rouleau, Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 1772, 173-185 (2007).
73. J. E. Davies, Z. Berger, D. C. Rubinsztein, Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1457-1462 (2006).
74. Brais *et al.*, Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18, 164-167 (1998).
75. Abu-Baker *et al.*, Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 12, 2609-2623 (2003).
76. Y. P. Bao, S. Sarkar, E. Uyama, D. C. Rubinsztein, Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Journal of medical genetics* 41, 47-51 (2004).
77. Calado *et al.*, Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein II aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2321-2328. (2000).
78. J. P. Tavanetz *et al.*, Hsp70 chaperones and type I PRMTs are sequestered at intranuclear inclusions caused by polyalanine expansions in PABPN1. *PloS one* 4, e6418 (2009).
79. L. P. Corbeil-Girard *et al.*, PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiology of disease* 18, 551-567 (2005).
80. X. Fan *et al.*, HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J Neurol Sci* 30, 244-251 (2003).
81. Benoit *et al.*, An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell* 9, 511-522 (2005).
82. B. Benoit *et al.*, The *Drosophila* poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout *Drosophila* development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 27, 3771-3778 (1999).
83. Y. Kerwitz *et al.*, Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *The EMBO journal* 22, 3705-3714 (2003).
84. U. Kuhn *et al.*, Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *The Journal of biological chemistry* 284, 22803-22814 (2009).
85. L. H. Apponi *et al.*, Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Human molecular genetics* 19, 1058-1065 (2010).
86. de Klerk *et al.*, Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 40, 9089-9101 (2012).
87. M. Jenal *et al.*, The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 149, 538-553 (2012).
88. Y. B. Beaulieu, C. L. Kleinman, A. M. Landry-Voyer, J. Majewski, F. Bachand, Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* 8, e1003078 (2012).
89. Chartier, B. Benoit, M. Simonelig, A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *The EMBO journal* 25, 2253-2262 (2006).
90. Chartier *et al.*, Mitochondrial dysfunction reveals the role of mRNA poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS genetics* 11, e1005092 (2015).
91. S. Y. Anvar *et al.*, Dereglulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet Muscle* 1, 15 (2011).
92. N. Barbezier *et al.*, Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 3, 35-49 (2011).
93. Trollet *et al.*, Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Human molecular genetics* 19, 2191-2207 (2010).

Listado de secuencias

<110> A completar

	<120> Inhibidores del proteasoma para tratar trastornos de envejecimiento prematuro	
	<130> BCT160002QT	
5	<160> 19	
	<170> PatentIn versión 3.5	
10	<210> 1 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> oligonucleótido de antisentido	
	<400> 1 gctaccactc acgtggtggt gatgg	25
20	<210> 2 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido de antisentido	
30	<400> 2 gggtccaccc acctgggctc ctgag	25
	<210> 3 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador directo de progerina	
40	<400> 3 actgcagcag ctcgagg	17
45	<210> 4 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador inverso de progerina	
50	<400> 4 tctgggggct ctgggc	16
55	<210> 5 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> sonda de progerina	
	<400> 5 cgctgagtac aacct	15
65	<210> 6 <211> 21	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador directo de lamina A	
	<400> 6	
	tcttctgcct ccagtgtcac g	21
10	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador inverso de lamina A	
	<400> 7	
20	agttctgggg gctctgggt	19
	<210> 8	
	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> sonda de lamina A	
	<400> 8	
30	actcgagct accg	14
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo de lamina C	
40	<400> 9	
	caactccact ggggaagaag tg	22
	<210> 10	
	<211> 17	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de lamina C	
50	<400> 10	
	cggcggtac cactcac	17
	<210> 11	
55	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> sonda de lamina C	
	<400> 11	
	atgcgcaagc tgggtg	15
65	<210> 12	
	<211> 9	

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> poliarginina

 <400> 12

 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5
 10
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido líder de antenapedia

 <400> 13
 20
 Lys Lys Trp Lys Met Arg Arg Asn Gln Phe Trp Val Lys Val Gln Arg
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 14
 <211> 27
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido de unión a Bcl-2
 30
 <400> 14

 Lys Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met
 1 5 10 15

 Ser Asp Glu Phe Glu Gly Ser Phe Lys Gly Leu
 20 25
 35
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> secuencia tat

 <400> 15

 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5
 45
 <210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> buforina

<400> 16

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento peptídico del virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV)-11 Rex

<400> 17

Thr Arg Arg Gln Arg Thr Arg Arg Ala Arg Arg Asn Arg
1 5 10

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de traslocación de membrana lipídica

<400> 18

Lys Lys Ala Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro

1

5

10

15

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> penetratina

<400> 20

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Gly Gly

REIVINDICACIONES

1. Un tripéptido modificado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado de:

- síndromes progeroides;
- distrofia muscular oculofaríngea; y,
- cánceres humanos que sobreexpresan el protoncogén SRSF1, seleccionados de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de piel;

en el que dicho tripéptido modificado se selecciona de Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Leu-Leu-nVal-al (MG115), Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (MG262) o Z-Leu-Leu-Phe-al (MG110).

2. El tripéptido modificado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho trastorno es un síndrome progeroide elegido de síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de progeria atípica, dermatopatía restrictiva, síndrome de progeria de Nestor-Guillermo, síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de Rothmund-Thomson, síndrome de Cockayne, xerodermia pigmentosa y tricotiodistrofia.

3. El tripéptido modificado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho tripéptido modificado está comprendido en una composición farmacéutica formulada para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular.

4. El tripéptido modificado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho tripéptido modificado se usa en combinación con al menos otro fármaco elegido de agentes antiinflamatorios; oligonucleótido de antisentido de la SEQ ID NO: 1, oligonucleótido de antisentido de la SEQ ID NO: 2, inhibidores de aminobisfosfonato de la farnesil-pirofosfato sintasa, inhibidores de estatina de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de NOX1; activadores de chaperona o de su actividad ATPasa; activadores de autofagia, sales de litio, espermidina, inhibidores de la cinasa de Rho, inhibidores de Rho y mezclas de los mismos.

5. El tripéptido modificado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho tripéptido modificado o sus sales farmacéuticamente aceptables se usan en combinación con al menos otro fármaco elegido de quimioterapia o inmunoterapia.

6. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno seleccionado de:

- síndromes progeroides; o,
- distrofia muscular oculofaríngea; o
- cánceres humanos que sobreexpresan el protoncogén SRSF1, seleccionados de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer colorrectal y cáncer de piel,

en la que dicha composición farmacéutica comprende un tripéptido modificado seleccionado de Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Leu-Leu-nVal-al (MG115), Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (MG262) o Z-Leu-Leu-Phe-al (MG110), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, combinado con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación mantenida.

7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho trastorno es un síndrome progeroide elegido de síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, síndrome de progeria atípica, dermatopatía restrictiva, síndrome de progeria de Nestor-Guillermo, síndrome de Werner, síndrome de Bloom, síndrome de Rothmund-Thomson, síndrome de Cockayne, xerodermia pigmentosa y tricotiodistrofia.

8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en la que dicho tripéptido modificado se formula para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular.

9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que es una formulación inyectable.

10. Una composición dermatológica para su uso en la prevención y/o la atenuación del envejecimiento de la piel, comprendiendo dicha composición un tripéptido modificado seleccionado de Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132), Z-Leu-Leu-nVal-al (MG115), Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (MG262) o Z-Leu-Leu-Phe-al (MG110), o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que dicha composición dermatológica se formula para administración tópica.

11. Un uso cosmético de tripéptido modificado o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para atenuar el

envejecimiento fisiológico de la piel, en el que dicho tripéptido modificado se selecciona de Z-Leu-Leu-Leu-al (MG 132), Z-Leu-Leu-nVal-al (MG115), Z-Leu-Leu-Leu-B(OH)₂ (MG262) o Z-Leu-Leu-Phe-al (MG110), o sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 5 12. El uso cosmético de la reivindicación 11, para reducir las arrugas, las líneas finas y/o para prevenir el adelgazamiento de la piel y/o un aspecto de piel reblandecida y seca.

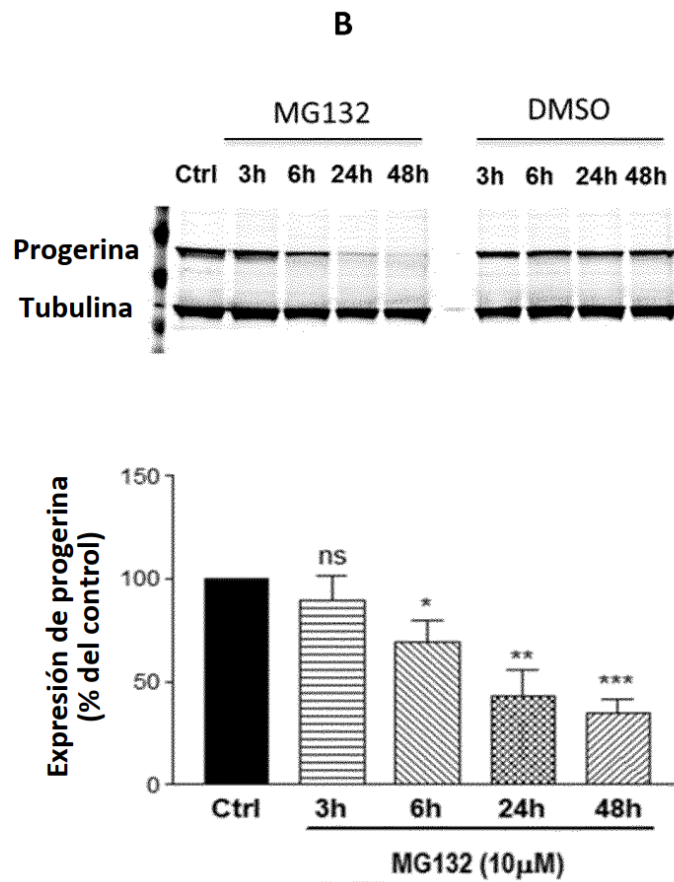
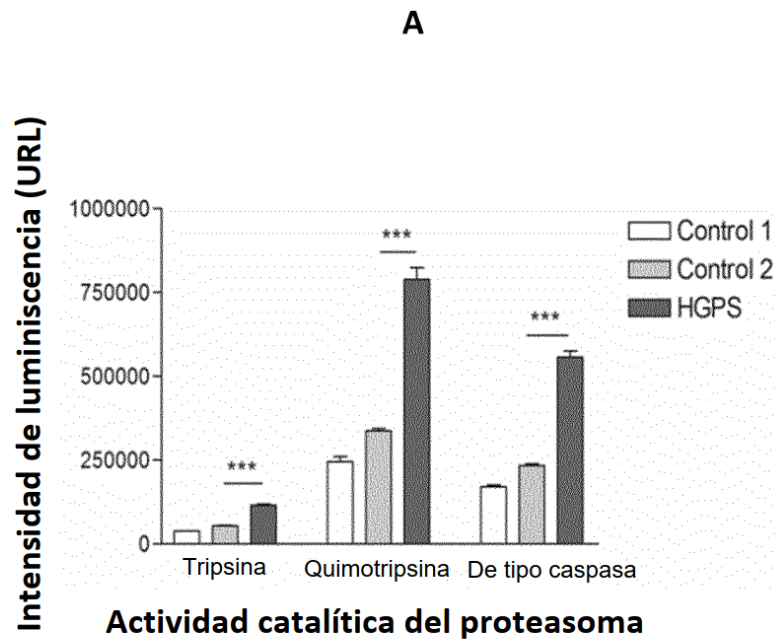


Figura 1

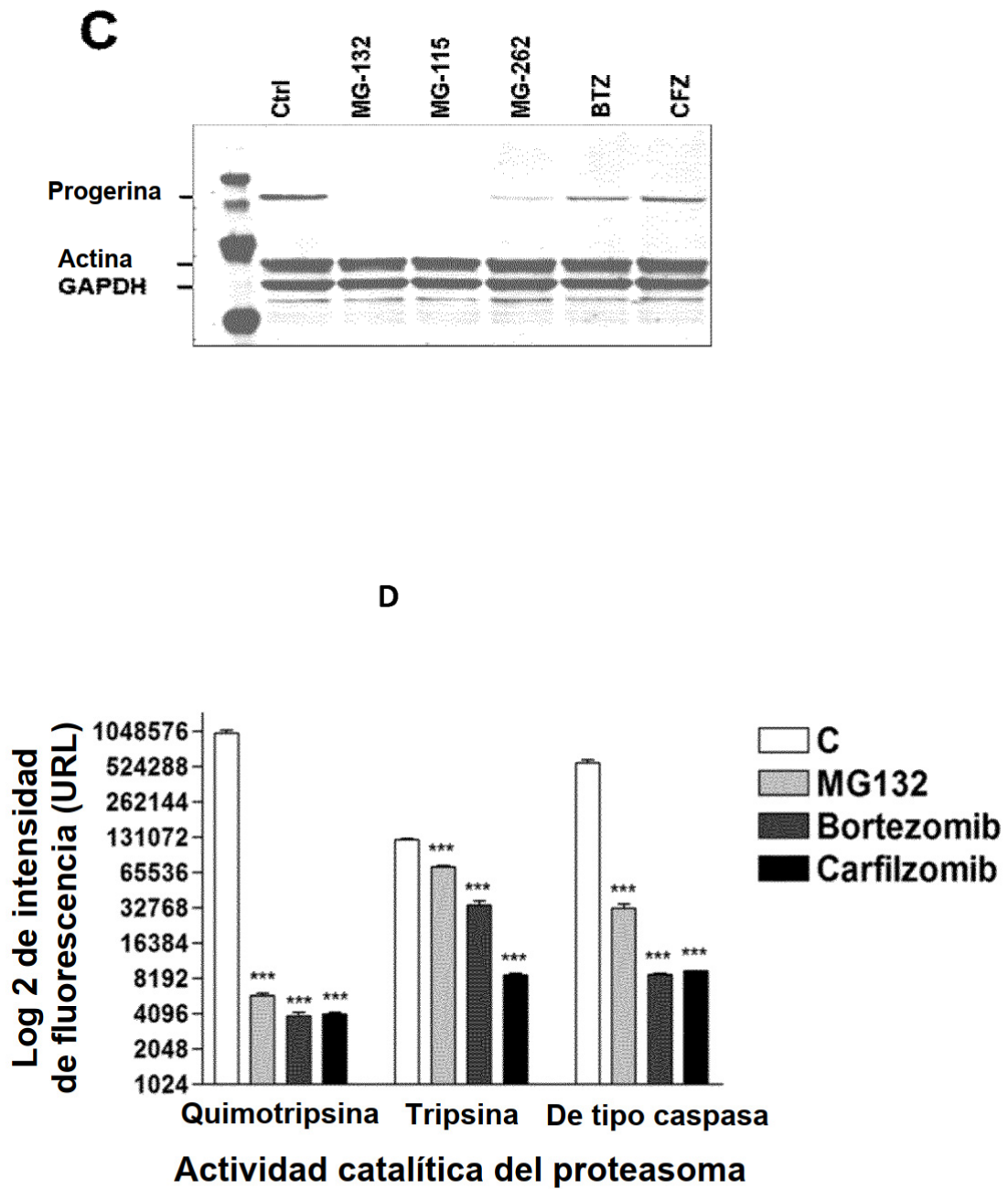
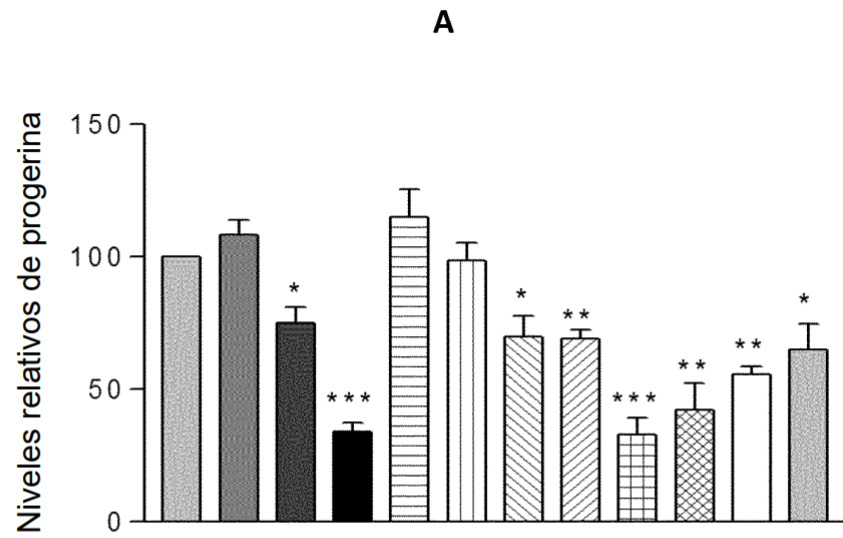


Figura 1



B

MG132	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Cloroquina	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Bafilomicina A1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Inhibidor de caspasa-6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Leptomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

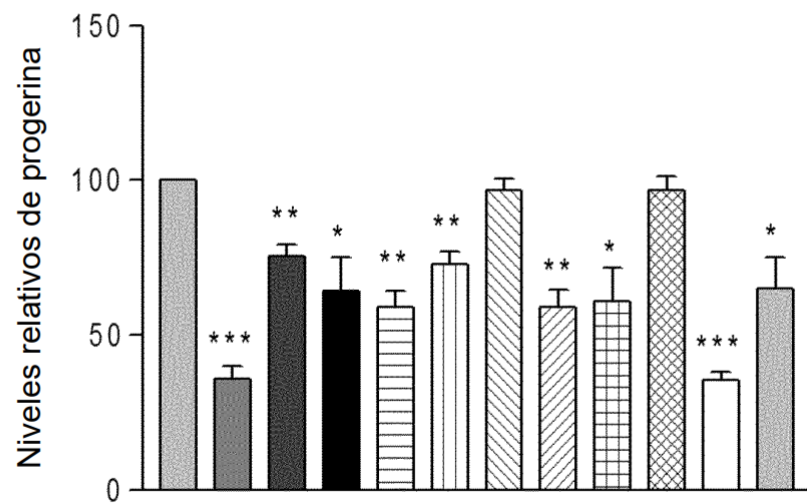
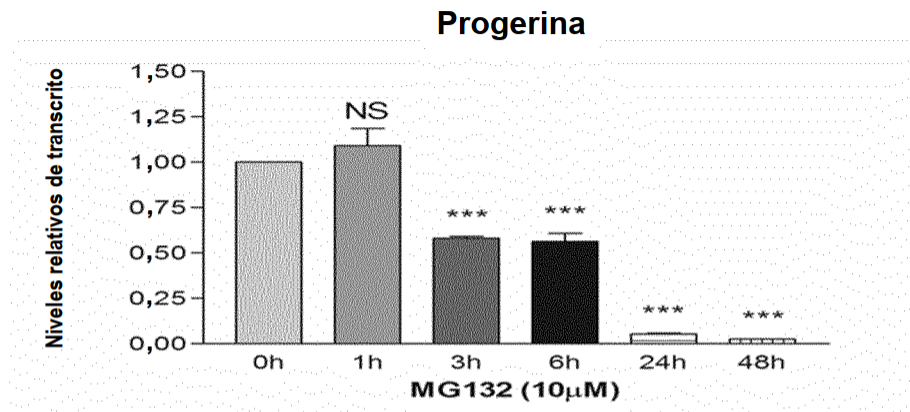


Figura 2

A



B

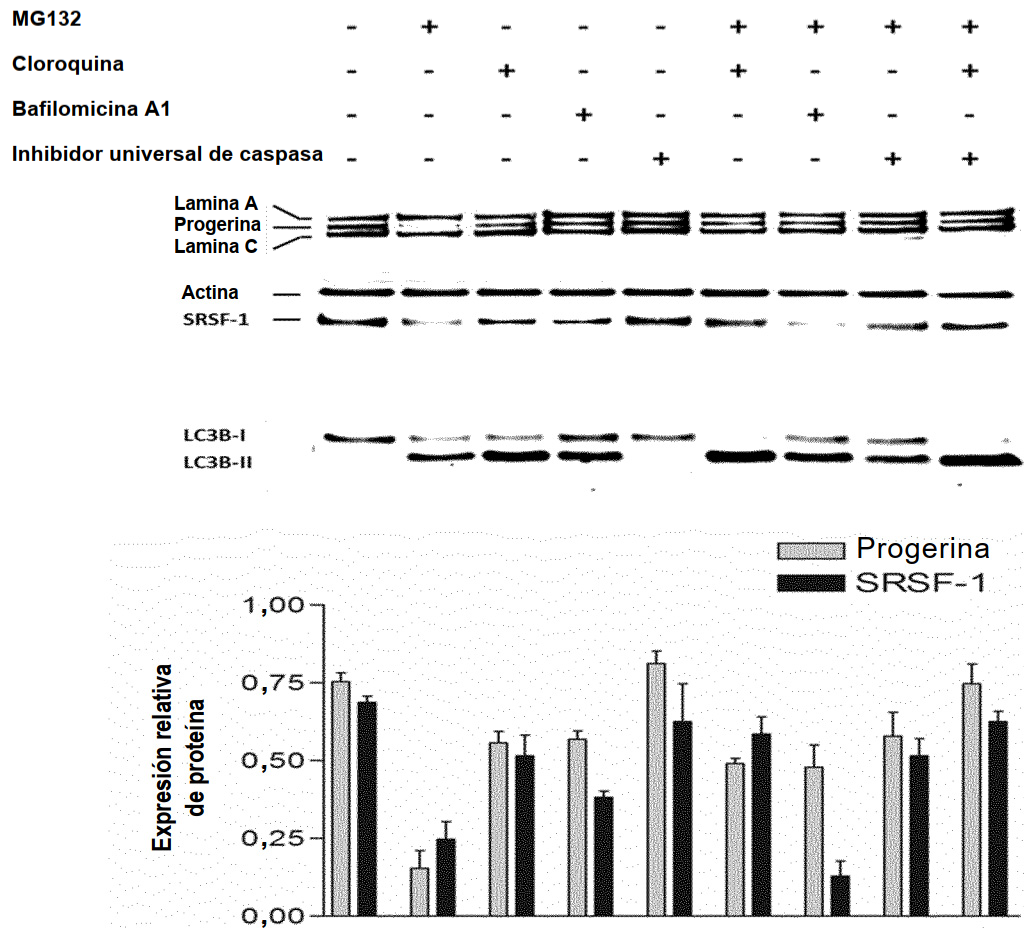
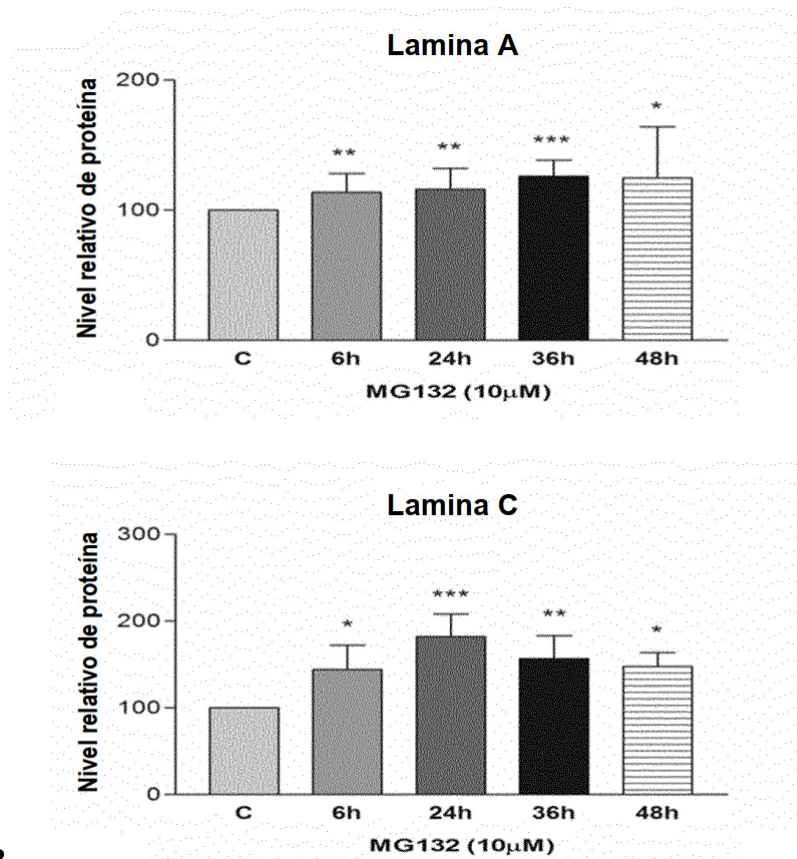
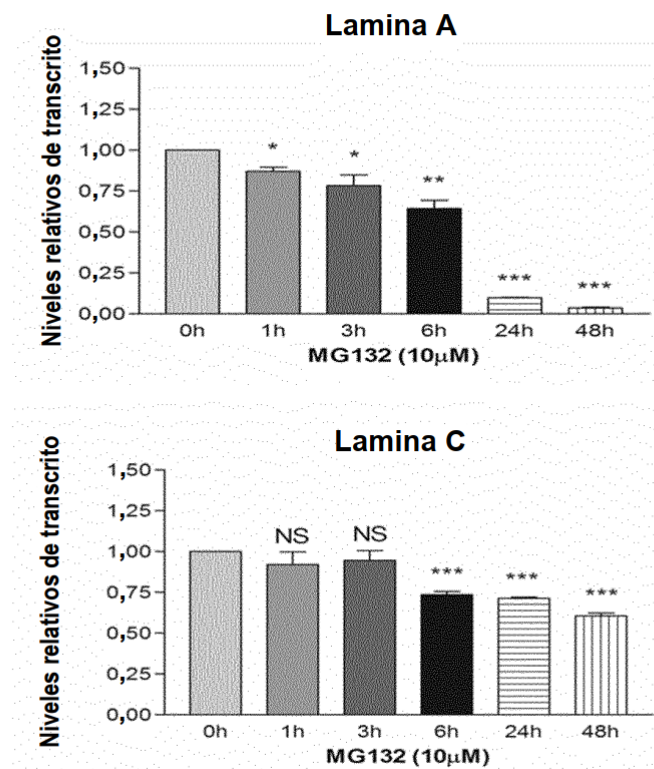


Figura 3

A



B

Figura 4

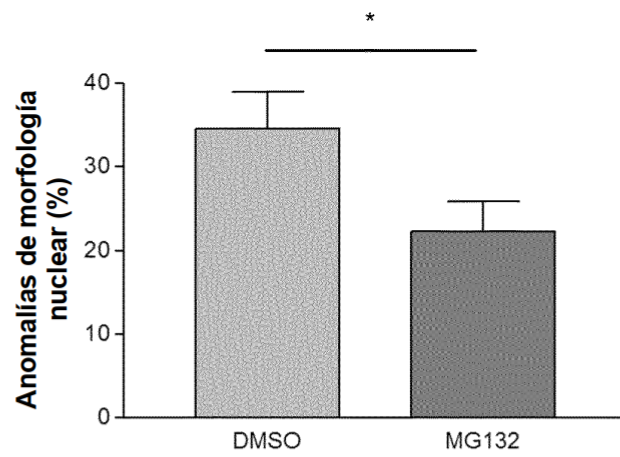


Figura 5

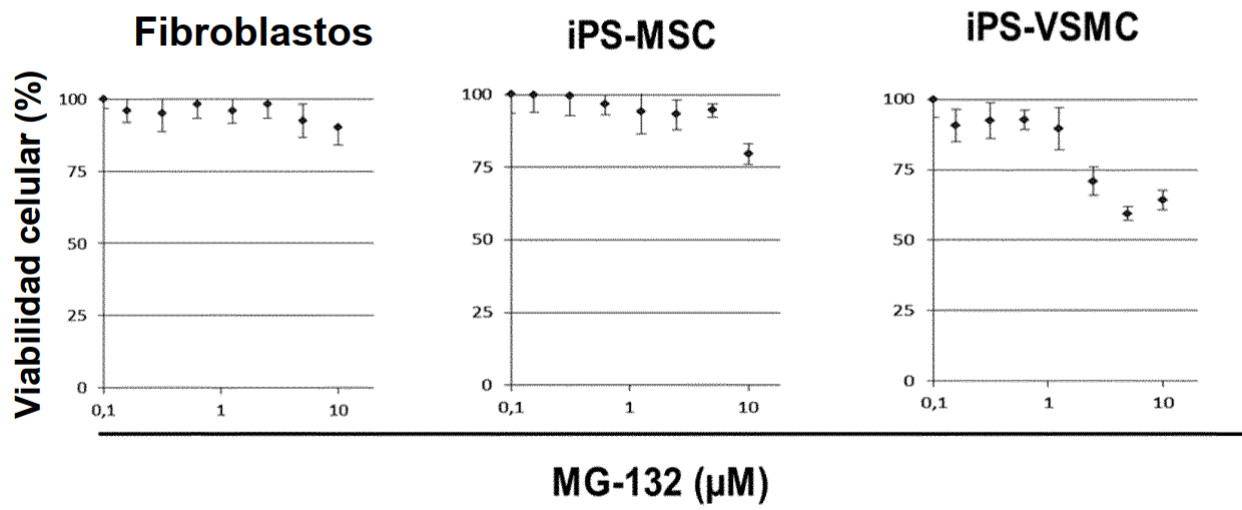
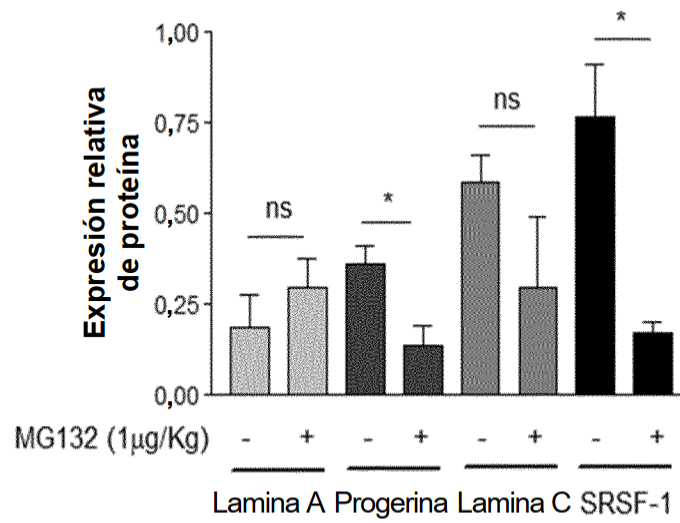


Figura 6

A



B

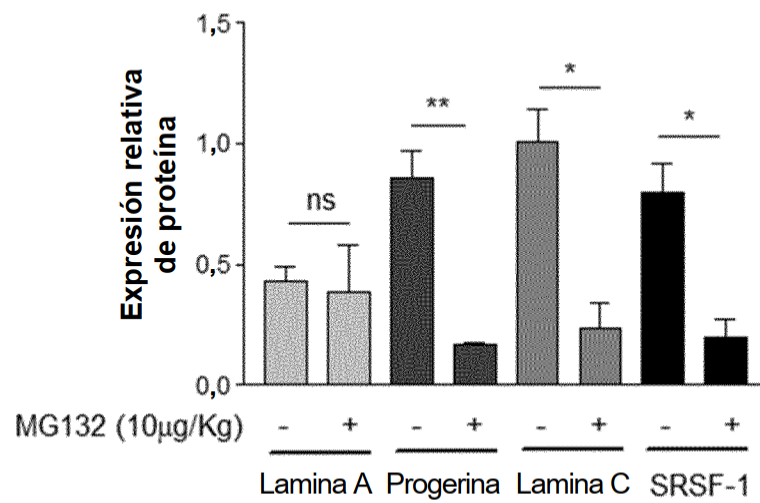


Figura 7

Figura 8

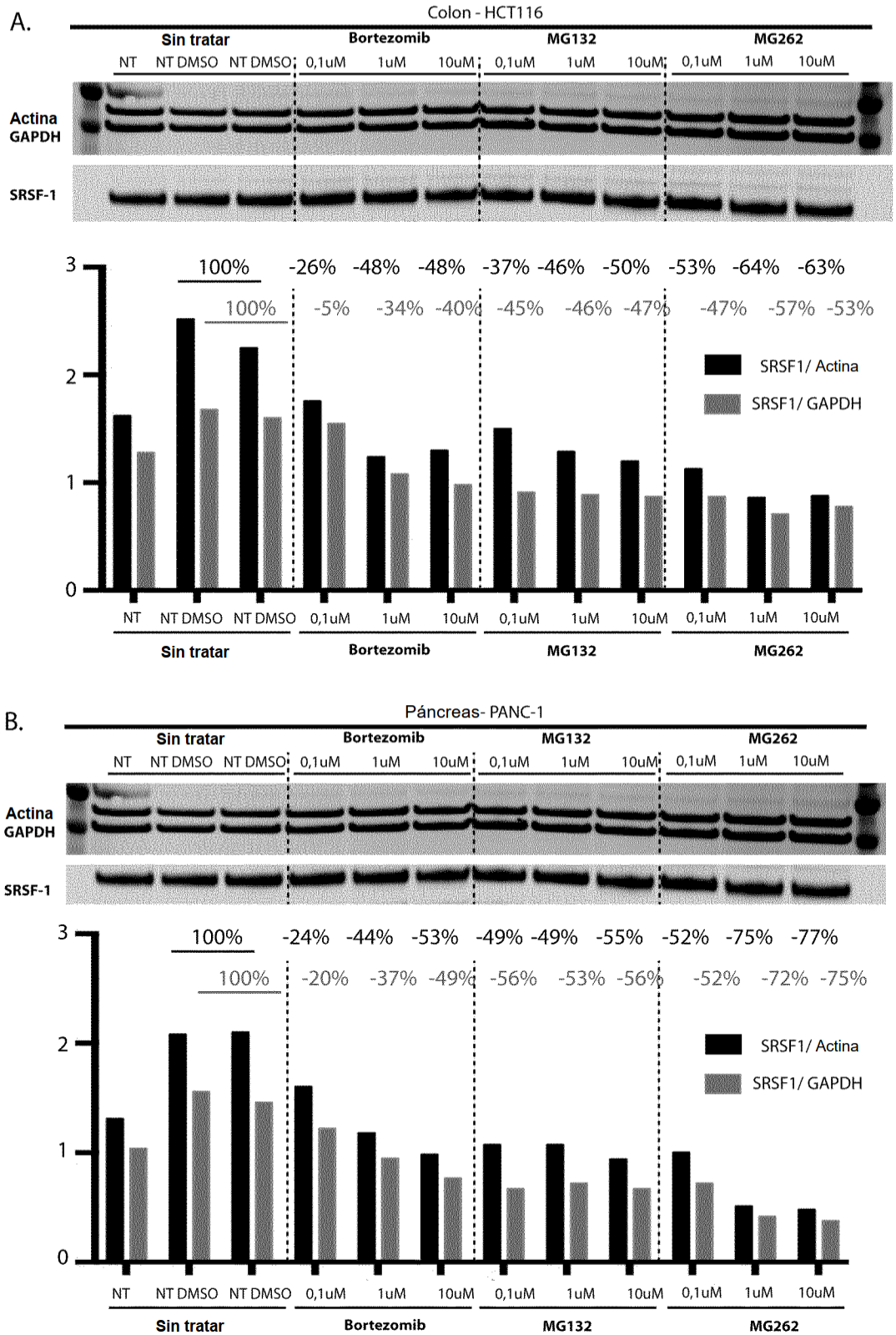
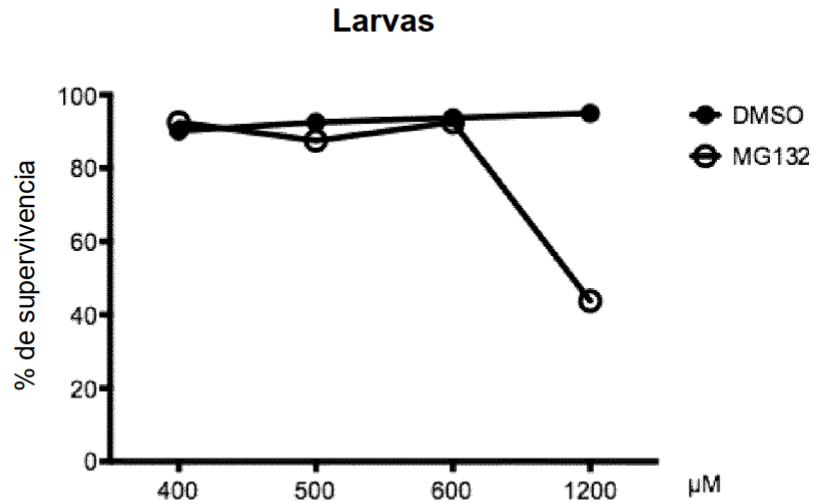


Figura 9

A



B

