

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 048**

21 Número de solicitud: 201930825

51 Int. Cl.:

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/4188** (2006.01)

**A61K 31/51** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**24.09.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.03.2021**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (91.8%)**

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid (Madrid) ES y**

**CONSORCIO DENTRO DE INVESTIGACIÓN**

**BIOMÉDICA EN RED DEL ÁREA DE**

**ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS M.P.**

**(8.2%)**

72 Inventor/es:

**LUCAS LOZANO, José Javier;**

**PICÓ DEL PINO, Sara;**

**PARRAS RODRÍGUEZ, Alberto y**

**SANTOS GALINDO, María**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **USO COMBINADO DE BIOTINA Y TIAMINA EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

57 Resumen:

Uso combinado de biotina y tiamina en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

La presente invención se refiere al uso de una combinación de vitaminas, más concretamente se refiere al uso combinado de biotina y tiamina, para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Más concretamente, la presente invención describe que el tratamiento con una combinación de biotina y tiamina es capaz de mejorar los síntomas neurológicos, de neuroimagen y de espectroscopía, asociados a la enfermedad de Huntington.

**ES 2 814 048 A1**

## DESCRIPCIÓN

### Uso combinado de biotina y tiamina en el tratamiento de la enfermedad de Huntington

5 La presente invención se engloba en el campo de la medicina y la farmacia, y se refiere al uso de una combinación de vitaminas, más concretamente se refiere al uso combinado de biotina y tiamina en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Huntington (EH).

#### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo hereditario caracterizado por una marcada atrofia del estriado (St) y síntomas motores prominentes causados por una repetición de trinucleótidos CAG dentro de la región codificante del  
15 exón 1 del gen de la Huntingtina (Htt) en el cromosoma 4 humano, dando lugar a un segmento de poliglutamina (poliQ) autoagregante en la región N-terminal de la proteína Huntingtina, que conduce a una acumulación de dicha proteína estructuralmente cambiada y modificada y de fragmentos de la misma, en el cerebro y otros órganos o células a lo largo del tiempo. Además de la toxicidad de la PoliQ, también hay evidencias  
20 de toxicidad inducida por la molécula de ARNm de Htt con la expansión CAG.

Los síntomas clínicos de la enfermedad de Huntington avanzan de una manera predecible, iniciándose con cambios de humor o problemas cognitivos seguidos de marcha inestable y problemas motores, como consecuencia de una muerte neuronal  
25 progresiva de distintas áreas del cerebro, que se manifiesta con más virulencia en las neuronas espinosas de tamaño medio del cuerpo estriado y que determina la aparición de la descoordinación motora y los clásicos movimientos tipo "corea". Con el tiempo, se deterioran en mayor medida las capacidades físicas, con problemas manifiestos de coordinación del movimiento en combinación con un mayor declive de las características  
30 mentales y problemas psiquiátricos y del comportamiento.

Los síntomas pueden variar significativamente y está bien documentado que la edad de aparición se correlaciona inversamente con el número de repeticiones de CAG en el gen de la htt modificado, corroborando el papel causativo de la Huntingtina modificada.

35

No existe cura o prevención para la EH, ni hay una forma conocida de detener el empeoramiento de la enfermedad. La esperanza de vida media es de aproximadamente veinte años desde la primera manifestación clínica. El objetivo del tratamiento es retrasar y reducir los síntomas y ayudar a la persona que padece la enfermedad a valerse por sí misma durante el mayor tiempo posible.

Estudios en modelos murinos de EH generados por modificación genética han demostrado que los fenotipos similares a la EH pueden resolverse si se elimina la expresión del gen de la huntingtina mutante, incluso en estadios avanzados de la enfermedad (Yamamoto et al. Cell. 2000,101: 57-66; Díaz-Hernández et al. J. Neurosci., 2005, 25: 9773-9781). En este sentido, la terapia génica es una importante vía en la búsqueda de un posible tratamiento de la enfermedad. Así, la introducción de diferentes constructos génicos, a nivel celular, para inhibir la transcripción o traducción de la proteína mutada, incluso sustituir el gen defectuoso por uno nuevo, mediante terapia génica, ha dado buenos resultados en modelos animales murinos de la patología, pero por desgracia dichos ensayos no están proporcionando los mismos resultados en humanos, ya que dicha terapia no está siendo efectiva en los mismos, por lo tanto dicha estrategia sigue estando lejos de ser una estrategia efectiva para su aplicación en humanos (Tabrizi SJ. et al. N Engl J Med. 2019;380(24):2307-2316).

La terapia farmacológica es la más utilizada para aliviar los síntomas de los sujetos que padecen Huntington. En este sentido, la tetrabenazina se utiliza para el tratamiento sintomático de trastornos de movimiento hiperkinéticos, tales como la enfermedad de Huntington, el hemibalismo, la corea senil, tics, la discinesia tardía y el síndrome de Tourette. El principal efecto farmacológico de la tetrabenazina consiste en reducir el suministro de monoaminas (por ejemplo, dopamina, serotonina y norepinefrina) en el sistema nervioso central mediante la inhibición de la isoforma 2 del transportador vesicular de monoamina humano (hVMAT2). El fármaco también bloquea los receptores de la dopamina postsinápticos. La tetrabenazina es un fármaco eficaz y seguro para el tratamiento de diversos trastornos de movimiento hiperkinéticos y, a diferencia de los agentes neurolépticos típicos, no se ha demostrado que provoque discinesia tardía. No obstante, la tetrabenazina sí muestra una serie de efectos secundarios relacionados con la dosis, incluyendo depresiones, parkinsonismo, somnolencia, nerviosismo o ansiedad, insomnio y, en casos excepcionales, síndrome neuroléptico maligno.

35

La solicitud de patente internacional WO2006053067 describe el uso de una combinación de amantidina y tetrabenazina para el tratamiento de trastornos hiperkinéticos y, en particular, de la enfermedad de Huntington. Hay un efecto secundario grave de este medicamento tetrabenazina, que desencadena o empeora la depresión y otros trastornos psiquiátricos.

A pesar de que en los últimos años se han hecho grandes progresos en cuanto al conocimiento de la etiología, genética y fisiopatología de la EH, las terapias existentes en la actualidad son de tipo paliativo y, además, presentan múltiples efectos secundarios. La ausencia de fármacos que actúen evitando o bien retrasando significativamente el desarrollo de este tipo de enfermedades hace que se requieran nuevas terapias alternativas que permitan disminuir de manera eficaz la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevas terapias capaces de evitar o retrasar el desarrollo de la EH.

15

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han observado que la administración de una combinación a base de vitaminas, preferiblemente una combinación de biotina y tiamina, es capaz de mejorar los síntomas motores y reducir las alteraciones estriatales, particularmente reduciendo la atrofia del estriado y aumentando los niveles de fosfocreatina, asociados a la enfermedad de Huntington.

Así, en primer lugar, los inventores han observado que las proteínas de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática (CPEB; *Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins*), más concretamente las proteínas CPEB1 y CPEB4, encargadas de regular la traducción de numerosos mRNAs mediante la modificación de su cola de poli(A) presentan una expresión alterada en el estriado de sujetos que padecen EH respecto de sujetos control sanos (**Ejemplo 1**). La alteración en los niveles de dichas proteínas propició el análisis del nivel de poliadenilación del transcriptoma en muestras tisulares de estriado de modelos murinos de la EH que muestran alteraciones similares en los niveles de CPEB1 y CPEB4 (**Ejemplo 2**). Dicho análisis puso de manifiesto que uno de los genes que mostraban un mayor acortamiento de la cola de poli(A) es el gen *SLC19A3* que codifica para un transportador de tiamina, concretamente para el transportador ThTr2 (**Ejemplo 3**). Un acortamiento de la cola de poli(A) correlaciona con un menor nivel de traducción del ARNm y, por tanto, un menor nivel de

35

la proteína, lo cual hizo sospechar un déficit del transportador ThTr2 (SLC19A3) en los sujetos con la EH. De hecho, esto se corroboró en muestras cerebrales de estriado de sujetos con la EH, donde se observó una disminución del transportador de tiamina SLC19A3 (**Ejemplo 3**).

5

En el cerebro, el transportador de tiamina SLC19A3 se localiza fundamentalmente en los vasos sanguíneos y en las neuronas y, tal y como se observa en el **Ejemplo 3**, los inventores han detectado una disminución de tiamina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de sujetos con la EH. Dicha bajada se observa fundamentalmente en la forma monofosfato de la tiamina (TMP) que es la mayoritaria en LCR. En el interior de las células y tejidos, en cambio, la forma mayoritaria es el pirofosfato de tiamina (TPP) que es la que tiene un papel biológico como cofactor de múltiples enzimas metabólicas y los inventores han observado una disminución del porcentaje de TPP en homogeneizados de muestras tisulares de estriado de sujetos con EH.

10  
15

Es conocido que los sujetos que padecen la enfermedad de los ganglios basales sensibles a biotina-tiamina (BTBGD) presentan mutaciones en el gen *SLC19A3*, haciendo que la proteína codificada por dicho gen no cumpla adecuadamente su función disminuyendo la absorción de tiamina en las células, con graves consecuencias para la salud de los individuos afectados, tales como cuadros de encefalopatía (letargia, estupor,...), trastornos del movimiento, dificultades en el habla o pérdida de la misma, dificultades en la deglución, crisis epilépticas, etc. Estos síntomas responden característicamente al tratamiento con biotina y tiamina a altas dosis, de ahí el nombre que se le dio a esta forma de la enfermedad.

20  
25

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los inventores han descubierto una disminución de los niveles proteicos de SLC19A3 en el estriado de sujetos con EH, así como la disminución de los niveles de tiamina en el líquido cefalorraquídeo (total y TMP) y en el cerebro de dichos sujetos con EH (TPP). Estos resultados hicieron sospechar a los inventores de que la administración de una combinación de vitaminas a base de tiamina y biotina, mejoraría la sintomatología de la EH, ya que los sujetos que padecen la BTBGD responden favorablemente a la administración de tiamina y biotina, pues esta última aumenta la expresión del transportador. Así, tal y como se observa en el **Ejemplo 4**, la administración combinada de tiamina y biotina en modelos murinos de EH mejoran la sintomatología de la enfermedad y atenúan alteraciones morfológicas y metabólicas

30  
35

del estriado tales como la atrofia y el aumento de fosfocreatina, que también se asocian a la enfermedad. Por lo tanto, la invención se relaciona con el uso de una combinación de tiamina y biotina para el tratamiento de la EH. Este descubrimiento abre una nueva ventana terapéutica para el tratamiento de esta patología no antes contemplado en el estado de la técnica.

También son objeto de la invención composiciones que comprenden una combinación de tiamina y biotina para uso en el tratamiento de la EH. Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para tratar a un sujeto que padece EH, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de tiamina y biotina a dicho sujeto.

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una composición, preferiblemente una composición farmacéutica que comprende una concentración terapéuticamente efectiva de biotina y tiamina para su uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Huntington. De aquí en adelante, a este primer aspecto de la invención se le denominará como composición para su uso de la invención.

El término "composición", "composición farmacéutica", o "medicamento", utilizados indistintamente a lo largo del documento, se refiere a cualquier sustancia o combinación de sustancias, usadas para la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre o los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, a una composición capaz de prevenir y/o tratar la EH. La composición farmacéutica de la invención se puede usar sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratamiento", "tratar" o "que trata", se refiere a: (a) la prevención de la aparición de la enfermedad o dolencia en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o dolencia pero al que todavía no se le ha diagnosticado; (b) la inhibición de la enfermedad o dolencia, es decir, la interrupción de su desarrollo; (c) el alivio o la mejoría de la enfermedad o dolencia, es decir, la inducción de la regresión de la enfermedad o dolencia; o (d) la curación de la enfermedad o dolencia, es decir, la interrupción de su desarrollo o progresión. La población de sujetos tratados mediante la composición de la invención incluye aquellos sujetos que padecen la dolencia o enfermedad no deseable,

así como los sujetos en riesgo de desarrollo de la dolencia o enfermedad.

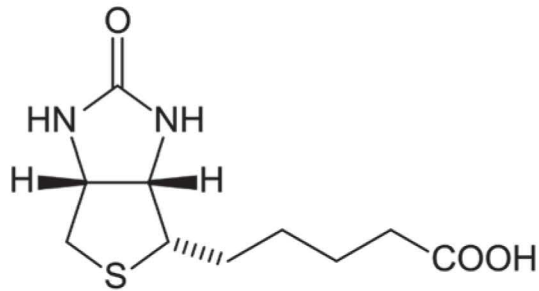
Los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente para referirse a una dolencia en un sujeto o individuo.

5

En la presente invención, los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" o "individuo" se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, entre otros, animales de granja y domésticos, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad o raza, que padezca la EH.

La biotina (Fórmula I), también conocida como vitamina H, vitamina B7 o vitamina B8, es una vitamina hidrosoluble que se encuentra de forma natural en muchos alimentos, tales como vísceras, huevos y ciertas verduras. En mamíferos, la biotina actúa como cofactor para cuatro carboxilasas del metabolismo implicadas en varias etapas clave del metabolismo de energía, incluyendo piruvato carboxilasa (neoglucogénesis), 3-metilcrotonil CoA y propionil CoA carboxilasas (catabolismo de ciertos aminoácidos que suministran al ciclo de Krebs metabolitos intermedios), y acetil CoA carboxilasa (síntesis de ácidos grasos). En consecuencia, el mecanismo de acción de la biotina puede verse como un potenciador de la producción de energía para el cerebro (ATP). Hay evidencias de que la biotina también es capaz de regular la expresión génica a través de mecanismos independientes de su función como grupo protésico de carboxilasas como, por ejemplo, la regulación de la transcripción del gen *SLC19A3*. La biotina está compuesta de un anillo ureido (imidazolinico) fusionado con un anillo tetrahidrotiofeno. Un ácido valérico sustituido se une a uno de los átomos de carbono del anillo tetrahidrotiofeno. Hay tres formas de biotina: biotina libre, biocitina (e-biotina-L-Lisina) y dos sulfóxidos L y D de la biotina. El número CAS de la biotina es 58-85-5.

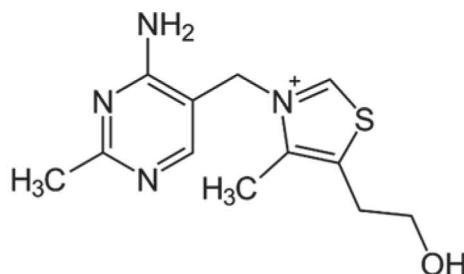
30



Fórmula I: Biotina

A efectos de la presente invención, el término "biotina", "vitamina H", "vitamina B7" o "vitamina B8", se refiere al compuesto biotina en sí mismo, a cualquiera de sus sales y/o sus derivados, que presentan la misma funcionalidad biológica que la biotina.

La tiamina (Fórmula II), también conocida como vitamina B1 o aneurina, es una vitamina hidrosoluble e insoluble en alcohol, que se encuentra de forma natural en muchos alimentos, tales como carne de vacuno, pollo, cereales, nueces y habichuelas. Los vegetales aportan tiamina libre mientras que las carnes aportan mayoritariamente difosfato de tiamina (TDP, también denominada pirofosfato de tiamina o TPP). La absorción ocurre en el intestino delgado (yeyuno, íleon) siendo favorecida por la presencia de vitamina C y ácido fólico, pero inhibida por la presencia de etanol (alcohol etílico). Es necesaria en la dieta diaria de la mayor parte de los vertebrados y de algunos microorganismos. Su carencia en el organismo humano provoca enfermedades como el beriberi y el síndrome de Korsakoff. La forma mayoritaria y biológicamente activa de la tiamina es la TDP que actúa como cofactor de numerosas enzimas metabólicas. El número CAS de la tiamina es 59-43-8.



Fórmula II: Tiamina

A efectos de la presente invención, el término "tiamina" o "vitamina B1" se refiere al



compuesto de tiamina en sí mismo, a cualquiera de sus sales y/o sus derivados, que presentan la misma funcionalidad biológica que la tiamina.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa aquí, se refiere a la cantidad de un compuesto o compuestos que, cuando se administra(n), es suficiente para prevenir el desarrollo de, o aliviar en cierto grado, uno o más de los síntomas de la enfermedad a la que se dirige. La dosis particular de cada compuesto administrado según esta invención será por supuesto determinada por las condiciones particulares que rodean el caso, incluyendo el compuesto administrado, la ruta de administración, la condición particular que se está tratando, así como consideraciones tales como la edad, peso y sexo del sujeto tratado.

Como es bien conocido en la técnica, las cantidades terapéuticamente eficaces para uso en seres humanos también pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, una dosis para humanos puede formularse para alcanzar una concentración que se ha encontrado que es efectiva en animales. Las cantidades e intervalos de dosis se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles del compuesto administrado efectivos para la indicación clínica particular que se está tratando. Esto proporcionará un régimen terapéutico acorde con la gravedad del estado de enfermedad del individuo. Así, ajustar la dosis para lograr la máxima eficacia en humanos está dentro de las capacidades del experto en la materia. El artículo de Reagan-Shaw S. "*Dose translation from animal to human studies revisited*". FASEB J 2007, 22:659-661, proporciona los factores de conversión estándar utilizados para convertir mg/kg a mg/m<sup>2</sup>. El artículo también explica que esta conversión es la base para convertir la dosis en una primera especie animal en una segunda especie animal (traducción de dosis alométrica). Por lo tanto, la dosis animal (DA) en mg/kg se puede convertir en dosis equivalente humana (DEH) en mg/kg utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{DEH (mg/kg)} = \text{DA (mg/kg)} \times \frac{\text{Animal } Km}{\text{Humano } Km}$$

donde el factor *Km* para cada especie se muestra en la **Tabla 1** (datos extraídos de Reagan-Shaw S. "*Dose translation from animal to human studies revisited*". FASEB J 2007, 22:659-661).

**Tabla 1.** Factor *Km* para la conversión de DA a DEH.

<b>Especies</b>		<b>Factor <i>Km</i></b>
Humano	Adulto	37
	Niño	25
Babuino		20
Perro		20
Mono		12
Conejo		12
Conejillo de Indias		8
Rata		6
Hamster		5
Ratón		3

5 Utilizando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, se puede planificar un régimen de tratamiento terapéutico eficaz que no cause una toxicidad sustancial y, sin embargo, sea eficaz para tratar los síntomas clínicos demostrados por un sujeto que padece EH en particular. Esta planificación debe implicar la elección cuidadosa del compuesto activo considerando factores como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del sujeto, la presencia y la gravedad de los efectos secundarios adversos, el modo de administración preferido y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

15 En una realización preferida, la concentración de biotina en la composición de la invención comprende al menos 0,40 mg/kg/día. En una realización más preferida, la concentración de biotina en la composición de la invención se selecciona de la lista que consiste en: al menos 0,40 mg/kg/día, al menos 1 mg/kg/día, al menos 1,5 mg/kg/día, al menos 2 mg/kg/día, al menos 2,5 mg/kg/día, al menos 3 mg/kg/día, al menos 3,5 mg/kg/día, al menos 4 mg/kg/día, al menos 4,5 mg/kg/día y al menos 5 mg/kg/día.

20 En otra realización preferida, la concentración de tiamina en la composición de la invención comprende al menos 2 mg/kg/día. En una realización más preferida, la concentración de tiamina en la composición de la invención se selecciona de la lista que consiste en: al menos 2 mg/kg/día, al menos 2,5 mg/kg/día, al menos 3 mg/kg/día, al menos 4 mg/kg/día, al menos 5 mg/kg/día, al menos 10 mg/kg/día, al menos 15 mg/kg/día, al menos 20 mg/kg/día, al menos 25 mg/kg/día, al menos 30 mg/kg/día, al menos 35 mg/kg/día, al menos 40 mg/kg/día, al menos 45 mg/kg/día, al menos 50

mg/kg/día, al menos 55 mg/kg/día, al menos 60 mg/kg/día, al menos 65 mg/kg/día, al menos 70 mg/kg/día, al menos 75 mg/kg/día, al menos 80 mg/kg/día, al menos 85 mg/kg/día, al menos 90 mg/kg/día, al menos 95 mg/kg/día y al menos 100 mg/kg/día.

- 5 En otra realización más preferida, la composición para su uso de la invención, comprende además al menos un excipiente y/o vehículo farmacológicamente aceptable.

En la presente invención, el término "excipiente" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente  
10 invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de proporcionar consistencia o de contribuir con sabores que la hagan más agradable. Así, los excipientes pueden tener la función de mantener cohesionados los componentes, tales como almidones, azúcares o celulosas, una función edulcorante, una función colorante, una función de protección frente a los medicamentos tal como el  
15 aislamiento del aire y/o la humedad, la función de rellenar un comprimido, cápsula u otra forma de presentación tal como, por ejemplo, fosfato de calcio dibásico, una función de desintegración para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir ningún otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como el material incluido en las formas  
20 galénicas, se añade a los ingredientes activos o sus asociaciones para facilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades fisicoquímicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas.

25 Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular  
30 por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y variaciones gramaticales de los mismos, en lo que se refiere a composiciones, soportes, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente e indican que los materiales son susceptibles de ser administrados a un sujeto sin la  
35 producción de efectos fisiológicos indeseables.

En otra realización más preferida, los principios activos que forman parte de la composición para su uso de la invención, esto es, la biotina y la tiamina, se encuentran adaptados para su administración por separado, simultánea o secuencial, o por  
5 yuxtaposición, por cualquier vía de administración conveniente, tanto en composiciones separadas o combinadas.

Por el término "principio activo" se entiende aquella sustancia o molécula que es biológicamente activa. También se conoce por "principio farmacéuticamente activo" o  
10 del inglés API (*Active Pharmaceutical Ingredient*).

Se entiende por "administración separada" a la administración individual de cada uno de los principios activos de la composición de la invención. Dicha administración individual de cada principio activo puede ser simultánea o secuencial. Se entiende que la  
15 administración separada es "simultánea" cuando la administración de los principios activos se realiza en el mismo momento en el tiempo. Por el contrario, se entiende que la administración separada es "secuencial", cuando la administración de los principios activos se realiza a distintos momentos en el tiempo, es decir, primero se administra un principio activo y a continuación se administra el otro. Así, en una realización particular,  
20 la administración de biotina es anterior a la administración de tiamina o viceversa.

Se entiende por "administración yuxtapuesta" a la administración conjunta de ambos principios activos, es decir, la biotina y la tiamina son administradas juntas en una única composición, que es administrada al sujeto.  
25

La composición de la invención, así como los principios activos que la conforman pueden administrarse por cualquier vía o ruta de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen, sin limitarse a, vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea, vía intratecal, vía intraventricular, vía oral, vía enteral y  
30 vía parenteral (intravenosa). En una realización particular, la composición de la invención y/o los principios activos que la conforman, se administran por vía oral o vía parenteral, más preferiblemente, vía oral. Así, tanto la composición de la invención, como los principios activos que la conforman estarán formulados de forma adecuada a la vía de administración elegida, como por ejemplo, en una forma farmacéutica de  
35 administración sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos,

supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.) o líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.), preferiblemente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración simple de dosis precisas.

5

En otra realización preferida, la composición para su uso de la invención se administra repetidamente a un sujeto que padece EH.

En otra realización más preferida, la composición para su uso de la invención puede comprender adicionalmente al menos un principio activo adicional a los mencionados anteriormente.

10

En una realización más preferida, el principio activo adicional que forma parte de la composición para su uso de la invención se selecciona de la lista que consiste en:

15

tetrabenazina, haloperidol, clorpromazina, risperidona, quetiapina, amantadina, levetiracetam, clonazepam, citalopram, escitalopram, fluoxetina, sertralina, quetiapina, risperidona, olanzapina, valproato, carbamazepina, lamotrigina y/o cualquiera de sus combinaciones.

20

En otro aspecto, la presente invención también proporciona métodos para prevenir y/o tratar la EH que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la invención, a un sujeto que lo necesite, tal y como se ha descrito previamente a lo largo del presente documento.

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**FIG. 1.** Análisis de los niveles de las proteínas de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática 1, 2, 3 y 4 (CPEB1 a 4) a nivel de proteína mediante Western blot (**A**, **B**

35

y **E**) y de ARNm mediante qRT-PCR (**C** y **D**) en el estriado de: sujetos que padecen EH (HD) y sujetos control (CTRL) (**A**) (**C**), ratones R6/1 y ratones control (CTRL) (**B**) (**D**), ratones zQ175 y ratones control (CTRL) (**E**). Los gráficos de barras muestran la media  $\pm$  s.e.m.

5 **FIG. 2.** Cromatografía de Poli(U). (**A**) Porcentaje de genes cuyos transcritos presentan colas de poli(A) acortadas, alargadas o inalteradas en el estriado (St) de ratones R6/1. (**B**) Análisis de ontología génica de los ARNm con cambios en su cola de poli(A) en St de R6/1. (**C**) Diagrama de Venn de los transcritos con poli(A) alterada implicados en enfermedades neurodegenerativas. (**D**) Porcentaje de transcritos con secuencias CPE  
10 en su 3' UTR en función del estado de su cola de poli(A) en ratones R6/1.

**FIG. 3.** Niveles proteicos y de mRNA de proteínas y genes que muestran acortamiento de la cola de poli(A) en ratones R6/1. Western Blot de las proteínas AUTS2, ROCK1 y KTN1 en el estriado de: (**A**) ratones R6/1 y ratones control (CTRL) y (**B**) sujetos que padecen EH (HD) y sujetos control (CTRL). A la derecha de cada panel también se  
15 muestran los niveles de mRNA obtenidos mediante RT-PCR para cada uno de los genes que codifican para las proteínas mencionadas.

**FIG. 4.** Análisis de la expresión génica y proteica de SLC19A3 y de tiamina en sujetos con EH. (**A**) Niveles de proteína y ARNm de SLC19A3 en el estriado y corteza de sujetos con EH (HD) y sujetos control (CTRL). (**B**) Fotografías de inmunohistoquímicas donde  
20 se muestra la inmunolocalización de SLC19A3 en secciones de estriado (St) y corteza (Cx) de sujetos con EH (HD) y de sujetos control sanos (CTRL). (**C**) Concentración de pirofosfato de tiamina (TPP), monofosfato de tiamina (TMP) y tiamina-libre, así como la suma de las tres (total) en líquido cefalorraquídeo (CSF) y concentración de tiamina total en sangre de sujetos control sanos (CTRL) y sujetos con EH (HD). (**D**) Porcentaje de las  
25 formas de tiamina: pirofosfato de tiamina (TPP), monofosfato de tiamina (TMP) y tiamina-libre en estriado de sujetos control sanos (CTRL) y sujetos con EH. Los gráficos de barras muestran la media  $\pm$  s.e.m.

**FIG. 5.** Niveles de tiamina en modelos murinos de EH. (**A**) Concentración de monofosfato de tiamina (TMP) en líquido cefalorraquídeo (LCR) y concentración de  
30 tiamina total en sangre de ratones control (CTRL) y R6/1 y ratones control (CTRL) y zQ175. (**B**) Porcentaje de las formas de tiamina: pirofosfato de tiamina (TPP), monofosfato de tiamina (TMP) y tiamina-libre en estriado de ratones control (CTRL) y R6/1 y ratones control (CTRL) y zQ175. Los gráficos de barras muestran la media  $\pm$  s.e.m.

35 **FIG. 6.** Análisis fenotípico de ratones R6/1 tratados con tiamina, biotina o ambas.

Porcentaje de **(A)** distancia recorrida en el test de campo abierto a las 13 semanas y **(B)** tiempo que tardan en caer en la prueba Rotarod a las 18 semanas los ratones R6/1 sin tratar (H<sub>2</sub>O) o tratados con biotina (Bio) o tiamina (Tia) con respecto a los ratones WT sin tratar (H<sub>2</sub>O) o tratados con biotina (Bio) o tiamina (Tia). **(C)** Porcentaje de tiempo que tardan en caer en la prueba Rotarod a las 18 semanas los ratones R6/1 sin tratar (H<sub>2</sub>O) o tratados con biotina y tiamina (T+B) con respecto a los ratones WT sin tratar (H<sub>2</sub>O) o tratados con biotina y tiamina (T+B).

**FIG. 7.** Análisis de resonancia magnética de ratones zQ175 tratados con tiamina y biotina. Análisis mediante resonancia magnética del volumen del estriado de ratones zQ175 y WT a las edades de **(A)** 4 meses (pretratamiento) y **(B)** 7 meses en condiciones control (H<sub>2</sub>O) o tratados con biotina y tiamina (B+T). **(C)** Niveles de fosfocreatina en estriado de ratones zQ175 sin tratar (H<sub>2</sub>O) o tratados con biotina y tiamina (B+T), con respecto a los ratones WT sin tratar (H<sub>2</sub>O) analizados mediante espectroscopía de resonancia magnética (MRS).

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

## Materiales y Métodos

### Muestras de tejido humano

Las muestras de cerebro de sujetos que padecen EH y de los controles sanos, fueron proporcionadas por el Instituto de Neuropatología del Banco de Cerebro (HUBICO-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, España), el Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid, España) y el Netherlands Brain Bank (Amsterdam, Países Bajos). El consentimiento informado por escrito para la extracción del cerebro después de la muerte para fines de diagnóstico e investigación se obtuvo de donantes de cerebro y/o familiares cercanos. Las muestras de sangre y los líquidos cefalorraquídeos fueron proporcionados por el Biobanco del Hospital Universitario Ramón y Cajal tras consentimiento informado por parte de los sujetos estudiados.

## Ratones

Se usaron dos modelos de ratones: (1) ratones R6/1 que expresan el exón-1-Htt humano como un transgén y que tienen un fondo genético B6CBAF1 (Mangiarini et al., Cell. 1996;87(3):493-506) y (2) ratones zQ175 con *knock-in* heterocigotos de una pista CAG expandida en el exón 1 del gen Htt y que tienen un fondo genético C57BL/6J (Menalled et al., PLoS One. 2012;7(12):e49838). Se emplearon como animales control (CTRL) o *wild-type* (WT) los hermanos de camada no transgénicos (B6CBAF1 para R6/1 y C57BL/6J para zQ175). Los ratones se alojaron con genotipos mezclados en un número de cuatro por jaula y con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h con inicio de luz a las 08:00. Todos los ratones se mantuvieron en la instalación de animales del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Los protocolos de alojamiento y mantenimiento de animales siguieron las pautas de las autoridades locales. Los experimentos con animales se realizaron bajo los protocolos (P15/P16/P18/P22) aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Utilización de Animales del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Comité de Ética de Experimentación Animal del CBM, CEEA-CBM) y Comunidad de Madrid PROEX 293/15.

El tratamiento a base de tiamina y/o biotina se administró por vía oral en el agua de bebida, sirviendo como control del tratamiento ratones con agua de bebida normal y como control del genotipo los hermanos de camada no transgénicos.

En el caso de los ratones R6/1 el tratamiento comenzó a las 3 semanas de vida, justo tras el destete. El tratamiento con biotina consistió en una dosis de 10 mg/kg/día, el tratamiento con tiamina se inició con una dosis de 200 mg/kg/día que se disminuyó a 50 mg/kg/día a partir de las 18 semanas, y el tratamiento combinado con tiamina y biotina consistió en una dosis de 5 mg/kg/día de biotina + 100 mg/kg/día tiamina, que se redujo a 25 mg/kg/día a la edad de 18 semanas. Los distintos tratamientos se mantuvieron hasta el sacrificio, mediante dislocación cervical, a la edad de 7-8 meses, teniendo por lo tanto el tratamiento una duración total aproximada de 32 semanas. La razón para disminuir las dosis de tiamina a partir de la semana 18 es que, en un grupo piloto de ratones en los que no se redujo la dosis, se detectó a partir de las 24 semanas de edad una posible toxicidad en los ratones R6/1 evidenciada por un aumento del volumen de bebida consumida y de las micciones, dichos efectos dejaron de observarse reduciendo



la concentración de tiamina a la cuarta parte de la concentración inicial, a partir de las 18 semanas de tratamiento.

5 En el caso de los ratones zQ175, el tratamiento combinado con tiamina y biotina consistió en una dosis de 5 mg/kg/día de biotina + 100 mg/kg/día tiamina con una duración de 3 a 6 meses hasta el sacrificio, mediante dislocación cervical, a la edad de 7 meses.

10 En todos los casos, el número de animales incluidos en cada grupo aparece mencionado en cada ejemplo.

#### Análisis de ontología génica

15 Se analizaron los ARNm co-inmunoprecipitados de CPEB4 de células RWP-1 a partir de las tablas publicadas en Ortiz-Zapater et al. (Nat Med. 2011;18(1):83-90) y transcritos con cambios en la longitud de la cola poli(A) (ver apartado "Cromatografía PoliU") en el estriado de ratones R6/1 sintomáticos (con incremento expresado en número de veces el valor inicial, "fold change" o "fc"  $\leq -2$  o  $\geq 2$ ) con DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (*Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics*; LIB) empleando la anotación 20 de la ruta KEGG (Huang da et al., Nucleic Acids Res. 2009;37(1):1-13).

#### Análisis de secuencias de los elementos de poliadenilación citoplásmica (CPE)

25 Los CPE son los elementos mejor caracterizados que regulan la poliadenilación citoplásmica de los ARNm. Las secuencias 3'UTR (región no traducida) de los conjuntos de genes cuya poli(A) se encuentra acortada, alargada o inalterada en ratones R6/1 (en base a un "fc"  $\leq -1,5$  o  $\geq 1,5$ ) se extrajeron de Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) y se detectó la incidencia de CPE canónicas y funcionales utilizando el algoritmo descrito en Pique et al. (Cell. 2008;132(3):434-48) (<http://genome.crg.es/CPE/>).

30

#### Western blot

35 Las muestras del cerebro humano se almacenaron a -80 °C y se trituraron con un mortero en un ambiente congelado con nitrógeno líquido para evitar la descongelación de las muestras, dando como resultado polvo de tejido. Las muestras de cerebro murino

se diseccionaron rápidamente tras su muerte en una placa helada y las diferentes estructuras se almacenaron a -80°C.

Los extractos de los cerebros humanos y murinos se prepararon homogeneizando las muestras de cerebro en un tampón de extracción enfriado con hielo (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, NaF 20 mM, Triton X-100 al 1%, ortovanadato de sodio 1 mM, ácido okadaico 1  $\mu$ M, Pirofosfato sódico 5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 30 mM, EDTA 5 mM, inhibidores de la proteasa (Complete, Roche, Cat. No 11697498001)). Los homogeneizados se centrifugaron a 15000 g durante 15 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante resultante y se determinó el contenido de proteína mediante el ensayo de Bradford empleando el kit Quick Start (Bio-Rad, 500-0203). 10 y 20  $\mu$ g de proteína total fueron sometidos a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,45  $\mu$ m, GE Healthcare Life Sciences, 10600002) y se bloquearon en TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, Tween 20 al 0.1%, suplementado con 5% de leche en polvo desnatada). Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario en TBS-T suplementado con 5% de leche en polvo desnatada, se lavaron con TBS-T y luego se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario, revelándose utilizando el kit de detección ECL (PerkinElmer, NEL105001EA). Las imágenes se escanearon con densitómetro (Bio-Rad, GS-900) y se cuantificaron con Image Lab 5.2 (Bio-Rad).

Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios generados en conejo: CPEB1 (1: 350, Santacruz, sc-33193); CPEB2 (1: 1000, Abcam, ab51069); CPEB3 (1: 1000, Abcam, ab10883); CPEB4 (1: 1000, Abcam, ab83009); AUTS2 (1: 750, Sigma, HPA000390); KTN1 (1: 1000, Proteintech, Cat. 19841-1-AP); ROCK1 (1: 1000, Abcam, ab45171); SLC19A3 (1: 1000, Sigma, HPA038898); vinculina (1: 1000, Abcam, ab129002); así como anti- $\beta$ -actina generada en ratón (1: 25000, Sigma, A2228).

Los anticuerpos secundarios utilizados han sido: IgG anti-conejo o anti-ratón conjugado con HRP (1: 2000, DAKO, P0447 para ratón y P0448 para conejo).

#### Cromatografía Poli(U)

Tras el sacrificio de los ratones control WT y R6/1 (n = 4) por dislocación cervical a la edad de 7-8 meses, se diseccionó el cuerpo estriado rápidamente en una placa enfriada

con hielo y se sumergió en RNAlater helado (Sigma, R0901). A continuación, los estriados fueron homogeneizados y el ARN total se purificó con Ultraspec (Biotecx, BL-10050), se congeló y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

5 La fracción de ARN con poli(A) se purificó por cromatografía de poli(U). La poli(U)-agarosa (Sigma, p8563) se disolvió en 35 ml/g de tampón de expansión (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 1 M), se incubó durante la noche a temperatura ambiente y se cargó en la columna de cromatografía. Se almacenó una alícuota de ARN total a -80 °C ("Entrada") y el resto fue incubado con tampón de muestra (Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5,  
 10 EDTA 1 mM, SDS al 1%) durante 5 min a 65 °C y enfriado posteriormente en hielo. A continuación, se añadió tampón de unión (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5; NaCl 0,7 M; EDTA 10 mM; formamida al 25% [v/v]) y la muestra se cargó en la columna de cromatografía de poli(U)-agarosa (Mobitec, M1002s) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en agitación. Posteriormente, la columna se lavó tres veces a 25 °C y  
 15 seis veces a 55 °C con tampón de lavado (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 10 mM, 25% [v/v] formamida). Los lavados llevados a cabo a 55 °C se recogieron y se almacenaron a -80 °C ("WASH" o "fracción de cola de poli(A) corta"). El poli(A) ARN restante ("ELUTED" o "fracción de cola de poli(A) larga") se eluyó con tampón de elución (HEPES 0,05 M, pH 7, EDTA 10 mM, 90% [v/v] formamida) a 55 °C y se almacenó a -  
 20 80 °C.

El ARN de las dos fracciones de poli(A), la fracción de cola de poli(A) corta y la fracción de cola de poli(A) larga, se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol, 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 20 µg de glucógeno (Sigma, G1767). Las  
 25 muestras se incubaron a -20 °C durante 20 min y se centrifugaron 15 min a 14000 g a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 750 µl de etanol y se centrifugó a 14000 g y 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se retiró y el precipitado se secó al aire durante 5 min. Los ARNs se resuspendieron en 300 µl de agua libre de nucleasas y se les añadió 300 µl de ácido fenol: cloroformo (5: 1). Las muestras se  
 30 agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 g y 4 °C.

La cuantificación del ARN se realizó mediante el fluorímetro Qubit utilizando el kit de ensayo Qubit ARN Hs (Thermo-Fisher Scientific, Q32852). El control de calidad de la integridad del ARN se realizó con Agilent Bioanalyzer 2100, utilizando el ARN Nano  
 35 Assay (Agilent Technologies 5067-1511) y el ARN Pico Assay (Agilent Technologies

5067-1513).

La preparación de la biblioteca de ADNc y su amplificación se llevó a cabo con el kit WTA2 utilizando una plantilla de 2 a 5 ng de ARN total y siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). El ADNc se amplificó durante 22 ciclos y se purificó utilizando el kit de purificación PureLink Quick PCR (Invitrogen, K310001). La cuantificación del ADNc amplificado se realizó en un Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific), y 8 µg del ADNc de cada muestra se fragmentaron y se marcaron con el kit de ensayo GeneChip Mapping 250K Nsp (Affymetrix, 900753) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La hibridación se realizó utilizando el kit GeneAtlas Hyb, Wash and Stain para los arrays 3 'IVT. Las muestras listas para hibridar se desnaturalizaron a 96 °C durante 10 minutos antes de su incubación en un array de ratón MG-430 PM (Affymetrix, 901570) y la hibridación se realizó durante 16 horas a 45 °C en el horno de hibridación GeneAtlas (Affymetrix, 00-0331). Transcurrido dicho tiempo, se procedió al lavado y tinción en la GeneAtlas Fluidics Station (Affymetrix, 00-0079), siguiendo la secuencia de comandos específica para arrays de ratón MG-430 PM. Finalmente, los arrays se escanearon con el GeneAtlas Scanner (Affymetrix) usando parámetros predeterminados, y la generación de archivos CEL para su análisis bioinformático se realizó con el software GeneAtlas (Affymetrix).

El procesamiento de los arrays se realizó utilizando R (R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, 2014) y Bioconductor (Gentleman et al., Genome Biol. 2004;5, R80). Los archivos CEL sin procesar se normalizaron utilizando la corrección de fondo de RMA y el resumen se generó tal y como se indica en Irizarry RA. et al. (Stat Appl Genet Mol Biol. 2003;2:Article1). Se realizaron controles de calidad estándar para identificar muestras anormales, tal y como se indica en Gentleman R. et al, 2005 (Springer, New York) con respecto a: (a) artefactos espaciales en el proceso de hibridación (imágenes de escaneo y pseudo-imágenes de modelos de nivel de sonda); (b) intensidades dependientes de las diferencias entre chips (gráficos MvA); (c) calidad de ARN (gráfica de digestión de ARN); y (d) niveles de intensidad global (diagrama de caja de distribuciones de intensidad de registro de coincidencia perfecta antes y después de la normalización y gráficos RLE). La anotación de la sonda se realizó utilizando la

información disponible en la página web de Affymetrix (<https://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) utilizando la versión na35.

Los valores de expresión se ajustaron para sesgos técnicos como se describe en Eklund y Szallasi (Genome Biol. 2008;9, R26) usando un modelo lineal e implementado con el paquete de R "limma" (Ritchie et al., Nucleic Acids Res. 2015;43, e47). Para cada réplica biológica, el cambio en el valor log<sub>2</sub> se calculó entre las muestras "WASH" y "ELUTED" y se usó para encontrar diferencias significativas entre ratones control WT y R6/1. La expresión diferencial se realizó utilizando un modelo lineal con los mecanismos de fluidica y los lotes de amplificación como covariables. Valores de "fold change" ≤ -1.5 en al menos una sonda significan que la cola de poli(A) se acorta en el transcrito de dicho gen en los ratones R6/1, ≥ 1.5 en al menos una sonda significa que se alarga y los valores intermedios significan que no hay cambios. Si el mismo transcrito mostraba resultados opuestos para diferentes sondas, se consideraba que no había cambiado.

15

PCR cuantitativa en tiempo real

La cuantificación se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando un termociclador CFX 384 Real Time System C1000 (Bio-Rad) en combinación con SsoFast Eva Green (Bio-Rad, CN 172-5204) y se utilizaron 0,25 μM de cada par de oligonucleótidos cebadores. Los datos fueron analizados por el software GenEx 5.3.7 (Multid análisis AB). Los niveles de ARNm se normalizaron primero en relación con el ARN total y luego respecto a la expresión de los siguientes genes: subunidad del ribosoma 18S, β-Actina, GAPDH y β-Tubulina.

25

**Tabla 2.** Cebadores humanos

<b>CPEB1</b>	<b>Directo</b>	5'-ggcagccatcttgaacga-3'	SEQ ID NO: 1
	<b>Inverso</b>	5'-aagtcacacgaccagaacca-3'	SEQ ID NO: 2
<b>CPEB2</b>	<b>Directo</b>	5'-gcctcataaagcagaaagcaa-3'	SEQ ID NO: 3
	<b>Inverso</b>	5'-agcatcaatgagtgctgaa-3'	SEQ ID NO: 4
<b>CPEB3</b>	<b>Directo</b>	5'-gaacgctactctagaaaggtgttg-3'	SEQ ID NO: 5
	<b>Inverso</b>	5'-cgaaagctggcagtgatct-3'	SEQ ID NO: 6
<b>CPEB4</b>	<b>Directo</b>	5'-cactgtttccaatggaagatgg-3'	SEQ ID NO: 7
	<b>Inverso</b>	5'-ggtgaaccaggccactatg-3'	SEQ ID NO: 8
<b>AUTS2</b>	<b>Directo</b>	5'-gaagcggagagagtccacct-3'	SEQ ID NO: 9
	<b>Inverso</b>	5'-tcctgaggcttaagtgctacatc-3'	SEQ ID NO: 10

<b>ROCK1</b>	<b>Directo</b>	5'-tcccctcgaacgctttctac-3'	SEQ ID NO: 11
	<b>Inverso</b>	5'-tgtatttttgaccactttccgga-3'	SEQ ID NO: 12
<b>KTN1</b>	<b>Directo</b>	5'-atttcagaaagagagaaagaaataagtgg-3'	SEQ ID NO: 13
	<b>Inverso</b>	5'-tgttcaactgcatccttcaaaga-3'	SEQ ID NO: 14
<b>SLC19A3</b>	<b>Directo</b>	5'-agttcctggatttaccctactg-3'	SEQ ID NO: 15
	<b>Inverso</b>	5'-ggttctgagggtctcatcatgg-3'	SEQ ID NO: 16
<b>18S</b>	<b>Directo</b>	5'-atccattggagggaagtc-3'	SEQ ID NO: 17
	<b>Inverso</b>	5'-gctccaagatccaactacg-3'	SEQ ID NO: 18
<b><math>\beta</math>-TUBULINA</b>	<b>Directo</b>	5'-cttttggaatggatcccca-3'	SEQ ID NO: 19
	<b>Inverso</b>	5'-gactgccatctgaggcca-3'	SEQ ID NO: 20

Para la amplificación de los genes GAPDH (qA-01-0101S) y  $\beta$ -ACTIN (qA-01-0104S) se utilizaron cebadores comerciales obtenidos de Tataa biocenter (Vestec, República Checa).

5

**Tabla 3.** Cebadores de ratón.

<b>Cpeb1</b>	<b>Directo</b>	5'-ttatctgcagctcacaacctg-3'	SEQ ID NO: 21
	<b>Inverso</b>	5'-gcaaaagtactgaagcagacct-3'	SEQ ID NO: 22
<b>Cpeb2</b>	<b>Directo</b>	5'-ctgcagcagaggaactcgta-3'	SEQ ID NO: 23
	<b>Inverso</b>	5'-ggttgctccaaggagactgt-3'	SEQ ID NO: 24
<b>Cpeb3</b>	<b>Directo</b>	5'-aaaaccagccccagtct-3'	SEQ ID NO: 25
	<b>Inverso</b>	5'-gcttggggatctctgagga-3'	SEQ ID NO: 26
<b>Cpeb4</b>	<b>Directo</b>	5'-caaacttattttccacaaaagg-3'	SEQ ID NO: 27
	<b>Inverso</b>	5'-catcaatgagagcctgaacaga-3'	SEQ ID NO: 28
<b>Auts2</b>	<b>Directo</b>	5'-cctccaggccctagtctctt-3'	SEQ ID NO: 29
	<b>Inverso</b>	5'-aaggggtcccagtaggatgt-3'	SEQ ID NO: 30
<b>Rock1</b>	<b>Directo</b>	5'-gatcccaaactcggaagtga-3'	SEQ ID NO: 31
	<b>Inverso</b>	5'-tcataaaccagggcatcca-3'	SEQ ID NO: 32
<b>Ktn1</b>	<b>Directo</b>	5'-ttaaagctgaagtgcagaaattg-3'	SEQ ID NO: 33
	<b>Inverso</b>	5'-acctcatgtgcggtagcag-3'	SEQ ID NO: 34
<b>Slc19a3</b>	<b>Directo</b>	5'-gagcagtagaggccatagcaa-3'	SEQ ID NO: 35
	<b>Inverso</b>	5'-ccttcagatagcccactgaga-3'	SEQ ID NO: 36
<b>18s</b>	<b>Directo</b>	5'-ctcaacacgggaaacctcac-3'	SEQ ID NO: 37
	<b>Inverso</b>	5'-cgctccaccaactaagaacg-3'	SEQ ID NO: 38
<b>Gapdh</b>	<b>Directo</b>	5'-ctcccactctccacctcg-3'	SEQ ID NO: 39
	<b>Inverso</b>	5'-cataccaggaaatgagcttgacaa-3'	SEQ ID NO: 40
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	<b>Directo</b>	5'-ctaaggccaacctgaaaag-3'	SEQ ID NO: 41
	<b>Inverso</b>	5'-accagaggcatcacaggaca-3'	SEQ ID NO: 42

<b><i>β-Tubulina</i></b>	<b>Directo</b>	5'-gacctatcatggggacagtga-3'	SEQ ID NO: 43
	<b>Inverso</b>	5'-cggctctgggaacatagttt-3'	SEQ ID NO: 44

Inmunohistoquímica

Las muestras de cerebro humano (corteza y estriado), se fijaron con formalina (4%, 24 h), y se embebieron en parafina. Las secciones (5 µm de espesor) se montaron en portaobjetos de tejido superfrost-plus y se desparafinaron. La actividad peroxidasa se detuvo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en metanol durante 30 minutos, seguido del desenmascaramiento de epítomos con tampón citrato 10 mM pH 6,0 calentado al microondas durante 15 minutos.

10

Las secciones se sumergieron durante 1 hora en solución de bloqueo (PBS suplementado con 0,5% de suero bovino fetal, 0,3% de Triton X-100 y 1% de BSA) y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo anti-SLC19A3 generado en conejo (Sigma, HPA038898) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Después de lavar, se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado contra conejo y luego con el complejo de avidina-biotina usando el kit Elite Vectastain (Vector Laboratories, PK-6101). Las reacciones de cromógeno se realizaron con diaminobenzidina (SIGMAFAST DAB, Sigma, D4293) durante 10 minutos y a continuación las secciones se deshidrataron y se cubrieron con DePeX (Serva). Se capturaron imágenes usando un microscopio Olympus BX41 con una cámara Olympus DP-70 (Olympus Dinamarca A/S).

20

Detección de tiamina

Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), de sangre y de los homogeneizados estriatales procedentes tanto de humano como de ratón se recogieron en un vial protegido contra la luz y se almacenaron a -80 °C. Para las muestras de estriado, el tejido congelado se homogeneizó y el contenido de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford empleando el kit Quick Start (Bio-Rad, 500-0203).

25

Para las muestras humanas, sangre y estriado de ratón, se agregaron 100 µl de tampón de extracción (Chromsystems, 37003) a 100 µl de muestra y se mezclaron durante 2 s en agitación. A continuación, se añadieron 150 µl de reactivo de precipitación (Chromsystems, 37004), y volvió a mezclarse durante 30 s en agitación. Posteriormente,

30

se centrifugaron 5 min a 10000g y se seleccionó una mezcla de derivatización de 100 µl (Chromsystems, 37005-6) en un nuevo vial de reacción al que se agregaron 50 µl del sobrenadante de las muestras para volver a mezclarse brevemente. Después, se agregaron 50 µl de tampón de neutralización (Chromsystems, 37009), 50 µl de tampón de estabilización (Chromsystems, 37007) y se dejó reposar durante 20 minutos.

Para los LCRs de ratón, se realizó una extracción directa de la cisterna magna mediante capilares. 2 µl de LCR fueron diluidos en 7 µl de suero fisiológico. Se realizó el protocolo descrito previamente escalado para un volumen de muestra de 9 en lugar de 100 µl de muestra.

A continuación, se inyectaron 50 µl en el sistema de HPLC. Se estandarizó un método cromatográfico común para el análisis de los derivados de tiamina (TPP, TMP y tiamina libre). Finalmente, calculamos los porcentajes de cada derivado de tiamina a partir de los datos en nmol/g de proteína para las muestras de estriado, mientras que para sangre total y LCR calculamos la cantidad de cada derivado de tiamina como nmol/L.

#### Campo abierto

El análisis de la actividad locomotora se realizó en cajas de Plexiglas® transparente de 27.5 cm x 27.5 cm equipadas con detectores fotoeléctricos para monitorear la actividad horizontal y vertical. Los niveles de actividad se registraron con un monitor de actividad de MED Associates (MED Associates, St. Albans, VT) y se analizaron con el software de análisis de datos del monitor de actividad de MED Associates v.5.93.773. Los ratones control WT o R6/1 se colocaron en el centro de la caja de campo abierto y se les permitió moverse libremente. Los datos se registraron individualmente para cada animal durante 15 min y se midió la distancia recorrida por el animal.

#### Rotarod

El análisis de la coordinación motora se analizó a las 18 semanas en los ratones R6/1 en un aparato *rotarod* de aceleración (Ugo Basile). Los ratones se entrenaron previamente durante dos días: Día 1: 4 rpm durante 1 minuto, cuatro repeticiones; Día 2: aceleración de 4 a 8 rpm durante 1 minuto seguido de 8 rpm constante durante 1 minuto, cuatro repeticiones. El tercer día se realizó el test con el *rotarod* ajustado en



aceleración de 4 a 40 rpm durante 5 min, cuatro repeticiones, y se midió el tiempo que tarda el ratón en caer de la barra.

### Resonancia magnética T2

5 Los animales fueron colocados en el centro de la bobina de volumen RF (radiofrecuencia) y posicionados en el imán bajo anestesia de inhalación continua a través de una mascarilla nasal. Un sensor respiratorio conectado a un sistema de monitorización (SA Instruments, Stony Brook, NY) fue colocado debajo del abdomen para monitorizar la frecuencia y profundidad de la respiración. Los ratones fueron  
10 anestesiados con un 2% de isoflurano en 1L de oxígeno en una cámara de inducción y el flujo de gas anestésico fue regulado constantemente para mantener una frecuencia respiratoria de 50+/-20 ppm. La temperatura de los animales se mantuvo aproximadamente a 37°C haciendo pasar agua caliente a través de una máquina intercambiadora de calor a la plataforma de los animales. El estado fisiológico de los  
15 animales fue monitorizado usando un sistema de compuertas para animales pequeños compatible con RMN por SA Instruments (Stony Brook, NY; <http://www.i4sa.com/>) que controlaba la frecuencia respiratoria.

Los experimentos de RMN se realizaron en un sistema Bruker Pharmascan (Bruker Medical GmbH, Ettlingen, Alemania) utilizando un imán superconductor de 7,0-T de  
20 diámetro horizontal, equipado con un resonador de jaula selectivo <sup>1</sup>H de 23 mm y un inserto de gradiente Bruker de 90 mm de diámetro (intensidad máxima 36 G/cm). Todos los datos fueron adquiridos usando un cuadro de mandos Hewlett-Packard con el software Paravision 5.1 (Bruker Medical GmbH) operando en una plataforma Linux.

Las imágenes spin-eco ponderadas en secuencia T2 (T2-W) se tomaron con una  
25 secuencia de adquisición rápida con mejora en el tiempo de relajación (RARE) en orientaciones axiales y los siguientes parámetros: TR = 3000 ms, TE = 14,7ms, RARE factor = 8, Av = 6, FOV = 2,3cm, matriz de adquisición = 256 × 256, grosor de corte = 1,00 mm sin hueco y número de cortes = 16.

### Tensor de difusión (DTI)

30 Los datos del tensor de difusión se obtuvieron con una secuencia de pulsos spin-eco, de disparo único e imagen plana (EPI) utilizando los siguientes parámetros: TR/TE 3500/40ms; una señal promedio de 4,7 esquemas de gradiente de difusión no colineal

con una ponderación de difusión de  $b = 100$  y  $1400 \text{ s/mm}^2$ , cortes de  $1 \text{ mm}$  de grosor sin hueco, campo de visión  $23 \times 23 \text{ mm}$  y matriz de adquisición =  $128 \times 128$ .

La anisotropía fraccional, la difusividad media, el trazado, los valores propios y los mapas de vectores propios se calcularon con una aplicación de software casera escrita en Matlab (R2007a).

#### Espectroscopía por resonancia magnética

El estudio de espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  se realizó en la región del estriado del hemisferio derecho. El protocolo de espectroscopía *in vivo* utilizó una Espectroscopía Espacial Resuelta en Puntos (PRESS), combinada con supresión de agua VAPOR y se emplearon los siguientes parámetros: TR =  $3000 \text{ ms}$ , TE =  $35 \text{ ms}$ , Av =  $128$ , volumen de vóxel =  $3 \text{ mm}^3$ . Antes de la adquisición se utiliza el procedimiento de calzado automático FASTMAP (Gruetter, R. Magn. Reson. Med. 1993;29: 804–811) para lograr una uniformidad óptima del campo magnético a través del volumen de vóxel. Todos los espectros de  $^1\text{H}$  fueron analizados automáticamente usando LC Model version 6.2 OR (Stephen Provencher, Oakville, ON; Canada).

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con SPSS 21.0 (SPSS® Statistic IBM®). Los datos se representan como media  $\pm$  s.e.m (error estándar de la media) con un intervalo de confianza del 95%.

La normalidad de los datos se analizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk ( $n < 50$ ) o Kolmogorov-Smirnov ( $n > 50$ ). La homogeneidad de la varianza se analizó mediante la prueba de Levente.

Para la comparación de dos grupos independientes de la prueba t-Student no pareada (datos con distribución normal), se realizaron pruebas de Mann-Whitney-Wilcoxon o Kolmogorov-Smirnov (con distribución no normal). Para comparar las mediciones dependientes, utilizamos una prueba t pareada (distribución normal) o pruebas de rango con signo de Wilcoxon (no normal). Para comparaciones múltiples, los datos con una distribución normal se analizaron mediante una prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de Tukey, Games-Howell o T de Dunnet. La importancia estadística

de los datos no paramétricos para comparaciones múltiples se determinó mediante la prueba de ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis. Las pruebas de enriquecimiento se llevaron a cabo utilizando la prueba exacta de Fisher unilateral. Se utilizó un valor crítico para la significancia de  $p < 0.05$  a lo largo del estudio.

5

## RESULTADOS

### **Ejemplo 1. Los niveles proteicos de CPEB1 y CPEB4 se encuentran alterados en la enfermedad de Huntington.**

10

Se encontró un aumento significativo estadísticamente de los niveles proteicos de CPEB1 (453%,  $p = 0.037$ ) y una disminución significativa estadísticamente de CPEB4 (83% de disminución,  $p = 0.001$ ) en el estriado post-mortem de sujetos con EH, sin cambios significativos en los niveles de CPEB2 o CPEB3 (**FIG. 1A**). Resultados equivalentes se encontraron en el estriado del modelo de ratón transgénico R6/1 (**FIG. 1B**).

15

En general, el desequilibrio de CPEB1/CPEB4 a nivel de proteína no se correlacionó con unas alteraciones correspondientes de niveles de transcritos (**FIG- 1C-D**), excepto por el aumento de los niveles de ARNm de CPEB1 en el estriado de ratones R6/1 (**FIG. 1C**).

20

En los ratones *knock-in* zQ175, modelo murino de progresión lenta de la enfermedad, solo la disminución de los niveles de CPEB4 alcanzó una significación estadística (**FIG. 1E**), lo que sugiere que los cambios en CPEB4 podrían preceder a los cambios en CPEB1.

25

### **Ejemplo 2. Análisis de la poliadenilación de genes asociados a la enfermedad de Huntington.**

30

Para detectar los posibles cambios en la longitud de la cola poli(A) en el transcriptoma de los ratones R6/1 respecto de los ratones control, se llevó a cabo una cromatografía en columna de poli(U) seguida de un análisis de chips genéticos.

35

Los resultados pusieron de manifiesto que en el estriado de ratones R6/1, la longitud de

la cola de poli(A) está aumentada en los transcritos de un 8,6% del genoma y disminuida en los de un 8,7% (**FIG. 2A**).

Posteriormente, el análisis de la ontología génica (KEGG Pathway) en los 1.467 genes con un cambio absoluto de poli(A) (f.c.; *fold change*) por encima de 2 (**FIG. 2B**) produjo cuatro términos con Benjamini  $<1,5e-1$ ; entre ellos: EH, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD) y contracción del músculo cardíaco. Así, estos resultados indican que la poliadenilación alterada puede contribuir a la patogénesis no solo en la EH, sino también en otras patologías neurodegenerativas, tales como AD y PD, ya que muchos de los genes mutados en formas familiares de AD/tauopatías, PD o esclerosis lateral amiotrófica, tales como los genes *Psen1*, *Mapt*, *Snca*, *LrrK2*, *Pink1*, *Dj1* y *Sod1*, junto con el gen *Htt*, mostraron poliadenilación alterada (**FIG. 2C**).

Para corroborar que los cambios observados en la poliadenilación podrían atribuirse a una función alterada de las proteínas CPEBs, se analizó el enriquecimiento potencial de los genes con secuencias de CPE en sus 3'UTRs. De hecho, este fue el caso para los transcritos con la cola poli(A) acortada (**FIG. 2D**). Además, el 93% de los genes con acortamiento más extremo (f.c.  $<-4.0$ ) de su cola de poli(A) albergan secuencias de CPE en sus 3'UTRs (**Tabla 4**).

20

**Tabla 4.** Genes que presentan un mayor acortamiento (f.c.  $<-4,0$ ) de su cola de poli(A).

Fold-change	Símbolo	Nombre del gen	Nº de CPEs
-5,4	<i>Auts2</i>	<i>Autism susceptibility candidate 2</i>	2
-5,3	<i>Akap10</i>	<i>A kinase (PRKA) anchor protein 10</i>	1
-5,0	<i>Zfp518a</i>	<i>Zinc finger protein 518A</i>	5
-5,0	<i>Tcf12</i>	<i>Transcription factor 12</i>	2
-4,9	<i>Zw10</i>	<i>Zw10 kinetochore protein</i>	0
-4,9	<i>Rock1</i>	<i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1</i>	4
-4,9	<i>Spcs1</i>	<i>Signal peptidase complex subunit 1</i>	2
-4,7	<i>Lax1</i>	<i>Lymphocyte transmembrane adaptor 1</i>	1
-4,6	<i>Memo1</i>	<i>Mediator of cell motility 1</i>	2
-4,5	<i>Ktn1</i>	<i>Kinectin 1</i>	3

Fold-change	Símbolo	Nombre del gen	Nº de CPEs
-4,3	<i>Tfrc</i>	<i>Transferrin receptor</i>	2
-4,2	<i>Nmd3</i>	<i>NMD3 homolog (S. cerevisiae)</i>	3
-4,1	<i>Slc19a3</i>	<i>Solute carrier family 19, member 3</i>	3

Se espera que la poliadenilación disminuida se refleje en niveles de proteína también disminuidos. Así, los resultados obtenidos confirman una gran disminución en los niveles de la proteína *Auts2* (el gen que presenta el mayor grado de deadenilación,  $fc=-5.4$ ; **Tabla 4**) tanto en el tejido estriatal de ratones R6/1 (**FIG. 3A**) como en el de sujetos que padecen EH (**FIG. 3B**), a pesar de presentar un nivel transcripcional inalterado. Se encontraron resultados similares para otros genes con una deadenilación de  $f.c.<-4$ , tales como los genes *Rock1* y *Ktn1* (**FIG. 3A-B y Tabla 4**).

10

Por tanto, los resultados mostrados indican la existencia de un desequilibrio entre los niveles proteicos de CPEB1/CPEB4 en el estriado de sujetos con EH y en el modelo murino R6/1 de EH, así como una alteración global de la longitud de la cola poli(A) la cual afecta notablemente a genes asociados a la neurodegeneración. Además, el enriquecimiento de las secuencias de los CPE en los genes que muestran deadenilación indica que esta última podría ser secundaria a la alteración de las proteínas CPEB. Asimismo, los genes altamente deadenilados muestran una disminución en sus niveles de proteínas tanto en el modelo murino R6/1 de EH, como en el estriado de los sujetos que padecen la patología, en ausencia de cambios coincidentes en los niveles de transcritos.

20

**Ejemplo 3. Los sujetos con enfermedad de Huntington presentan en el cerebro una concentración disminuida de la proteína SLC19A3 junto con una deficiencia de los niveles de tiamina.**

25

Entre los genes con una deadenilación más prominente que se muestran en la **Tabla 4**, el gen *Slc19a3* fue particularmente interesante porque sus mutaciones causan un devastador trastorno de los ganglios basales denominado enfermedad de los ganglios basales sensibles a la biotina-tiamina que se puede revertir con una terapia basada en la administración de dichas vitaminas. Más detalladamente, el gen *Slc19a3* codifica un transportador transmembrana de tiamina (hTHTR2) y los sujetos con dicha patología

30

muestran niveles disminuidos de tiamina en el líquido cefalorraquídeo, atrofia bilateral en la cabeza del núcleo caudado y en el putamen, así como una variedad de síntomas neurológicos, incluyendo letargia, irritabilidad, distonía, espasticidad, temblor y corea, entre otros, que mejoran con un tratamiento a base de tiamina y biotina. Así, los inventores plantearon la hipótesis de que la EH podría ser en parte una deficiencia de tiamina debida a una disminución de los niveles de la proteína SLC19A3.

Para corroborar su hipótesis se procedió al análisis de la concentración proteica de SLC19A3 en las muestras cerebrales murinas y humanas.

Los niveles de la proteína SLC19A3 estaban altamente disminuidos tanto en el estriado como en el córtex de los sujetos con EH, a pesar de presentar una tendencia a niveles de transcritos aumentados (**FIG. 4A**). Esto se refleja en una fuerte disminución de la tinción inmunohistoquímica tanto en las muestras histológicas de estriado y corteza (**FIG. 4B**) que, en buena concordancia con el atlas humano de proteínas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)), reveló una localización neuronal y endotelial. Además, también se observó una disminución de los niveles de tiamina en el LCR de sujetos con EH, aunque con niveles en sangre inalterados (**FIG. 4C**). Esto encaja con la disminución de tiamina en LCR previamente observada en los sujetos que padecen BTBGD (Ortigoza-Escobar, J.D., *et al.* Brain. 2016; 139: 31-38).

En el interior celular, la tiamina se convierte en sus derivados fosforilados, tales como la tiamina monofosfato (TMP) y, más importantemente, en tiamina trifosfato (TPP), que es la forma bioactiva que actúa como cofactor para múltiples enzimas en el catabolismo de azúcares y aminoácidos. El TPP representa el 80-85% de la tiamina presente en el cerebro. Sin embargo, cuando se analizó el nivel de tiamina libre y de sus derivados fosforilados en el tejido estriatal de sujetos con EH, los resultados mostraron que el TPP representa tan solo el 60% de la suma de Tiamina libre+TMP+TPP, con un aumento concomitante en el porcentaje de tiamina libre (**FIG. 4D**), lo cual es indicativo de una disminución en la disponibilidad intracelular de tiamina.

En conjunto, estos resultados demuestran una concentración disminuida de la proteína SLC19A3 junto con una deficiencia de los niveles de tiamina en el cerebro de sujetos con EH y sugieren que los sujetos que padecen dicha patología podrían beneficiarse de una terapia a base de tiamina y/o biotina, como lo hacen los sujetos con BTBGD.

**Ejemplo 4. La administración combinada de tiamina y biotina en modelos murinos de EH mejoran los síntomas motores y la atrofia del estriado.**

5 Para probar de forma preclínica si la administración de tiamina y biotina podría ser útil en el tratamiento de EH, se analizó en primer lugar si los modelos murinos de EH ensayados: R6/1 y zQ175, presentaban también una deficiencia de tiamina, tal y como se ha demostrado en los sujetos que padecen EH. Como se observa en la **Fig. 5A**, ambos modelos de ratón mostraron niveles de tiamina inalterados en sangre y una  
10 tendencia a menores niveles de TMP en LCR. También se analizó la distribución de tiamina y de sus derivados fosforilados, TPP y TMP, en el tejido estriatal de dichos ratones frente a ratones control WT, poniéndose de manifiesto un aumento de tiamina libre (**FIG. 5B**) en ambos modelos y una disminución de TPP en los ratones R6/1 (**FIG. 5B**) al igual que sucede en las muestras de sujetos que padecen EH (**FIG. 4C y 4D**,  
15 respectivamente).

Dado que los ratones R6/1 presentan fenotipos motores desde una edad temprana, se decidió administrarles el tratamiento a base de biotina (B), tiamina (T) o una combinación de ambos (B+T) cuando finalizaron la lactancia materna (esto es, tres semanas tras el  
20 nacimiento de los ratones), y analizar el efecto de cada tratamiento sobre la hipoactividad, observada en la prueba de campo abierto a las 13 semanas de edad y sobre el déficit de coordinación motora, detectado en la prueba de *rotarod* a las 18 semanas de edad.

25 Los resultados observados ponen de manifiesto que el tratamiento con biotina o tiamina por separado, solo mostraron tendencias de mejora en algunas de las pruebas de comportamiento (**FIG. 6A-B**). Sin embargo, el tratamiento combinado de biotina y tiamina, mejoró el déficit de coordinación motora en la prueba de *rotarod* a las 18 semanas (**FIG. 6C**).

30 En comparación con el transgén de los ratones R6/1, la mutación CAG en el modelo de EH murino zQ175 heterocigótico, al estar en el gen endógeno, se parece más a la mutación que sufren los sujetos con EH; a pesar de no inducir fenotipos motores claros en el tiempo de vida del ratón. Sin embargo, es conocido que los ratones zQ175  
35 heterocigotos muestran atrofia del estriado desde edad temprana (Heikkinen, T., *et al.*

PloS one. 2012: 7, e50717) (**FIG. 7A**) y en el modelo murino zQ175 heterocigoto tratado con la terapia combinada de tiamina y biotina, descrito aquí, se observó mediante volumetría cerebral por resonancia magnética una atenuación de la atrofia sufrida por el  
5 combinado (**FIG. 7B**). Los ratones zQ175 heterocigotos también muestran un aumento de fosfocreatina en estriado detectable mediante espectroscopía de resonancia magnética (MRS) que no se observa en los ratones zQ175 heterocigotos tratados con la terapia combinada de tiamina y biotina, descrita aquí (**FIG. 7C**).

10 Por tanto, los resultados indican que los ratones con EH también muestran deficiencia de tiamina en el cerebro, y que los síntomas motores de la EH, la atrofia y el aumento de fosfocreatina estriales, mejoran con el tratamiento a base de tiamina y biotina.

En resumen, los resultados mostrados en el presente documento, demuestran que la  
15 disminución de los niveles de proteína SLC19A3 en sujetos con EH se correlaciona con una deficiencia de tiamina en el cerebro (disminución de la tiamina en el LCR y en el TPP estriatal), lo que fomenta la utilidad del tratamiento de estos sujetos con suplementos vitamínicos a base de una administración combinada de tiamina y biotina, lo cual está aún más respaldado por el hecho de que los síntomas motores, la atrofia  
20 del estriado y el aumento de fosfocreatina estriatal en modelos murinos que padecen EH mejoran con la combinación de suplementos vitamínicos a base de tiamina y biotina.



**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende biotina y tiamina para su uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Huntington.  
5
2. Composición para su uso según la reivindicación 1 donde la concentración de biotina es de al menos 0,40 mg/kg/día, y la concentración de tiamina es de al menos 2 mg/kg/día.
- 10 3. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que además comprende al menos un excipiente y/o vehículo farmacológicamente aceptable.
- 15 4. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende al menos un principio activo.
- 20 5. Composición para su uso según la reivindicación 4 donde el principio activo se selecciona de la lista que consiste en: tetrabenazina, haloperidol, clorpromazina, risperidona, quetiapina, amantadina, levetiracetam, clonazepam, citalopram, escitalopram, fluoxetina, sertralina, quetiapina, risperidona, olanzapina, valproato, carbamazepina, lamotrigina y/o cualquiera de sus combinaciones.
- 25 6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado por que se administra por cualquiera de las siguientes vías: vía oral, sublingual, parenteral, intravenosa, intraperitoneal y/o intramuscular.
- 30 7. Composición para su uso según la reivindicación 6 donde la vía de administración es la vía oral.
- 35 8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los compuestos de dichas composiciones se formulan o administran juntos, por separado o secuencialmente.
9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde dicha composición se administra repetidamente a un sujeto.

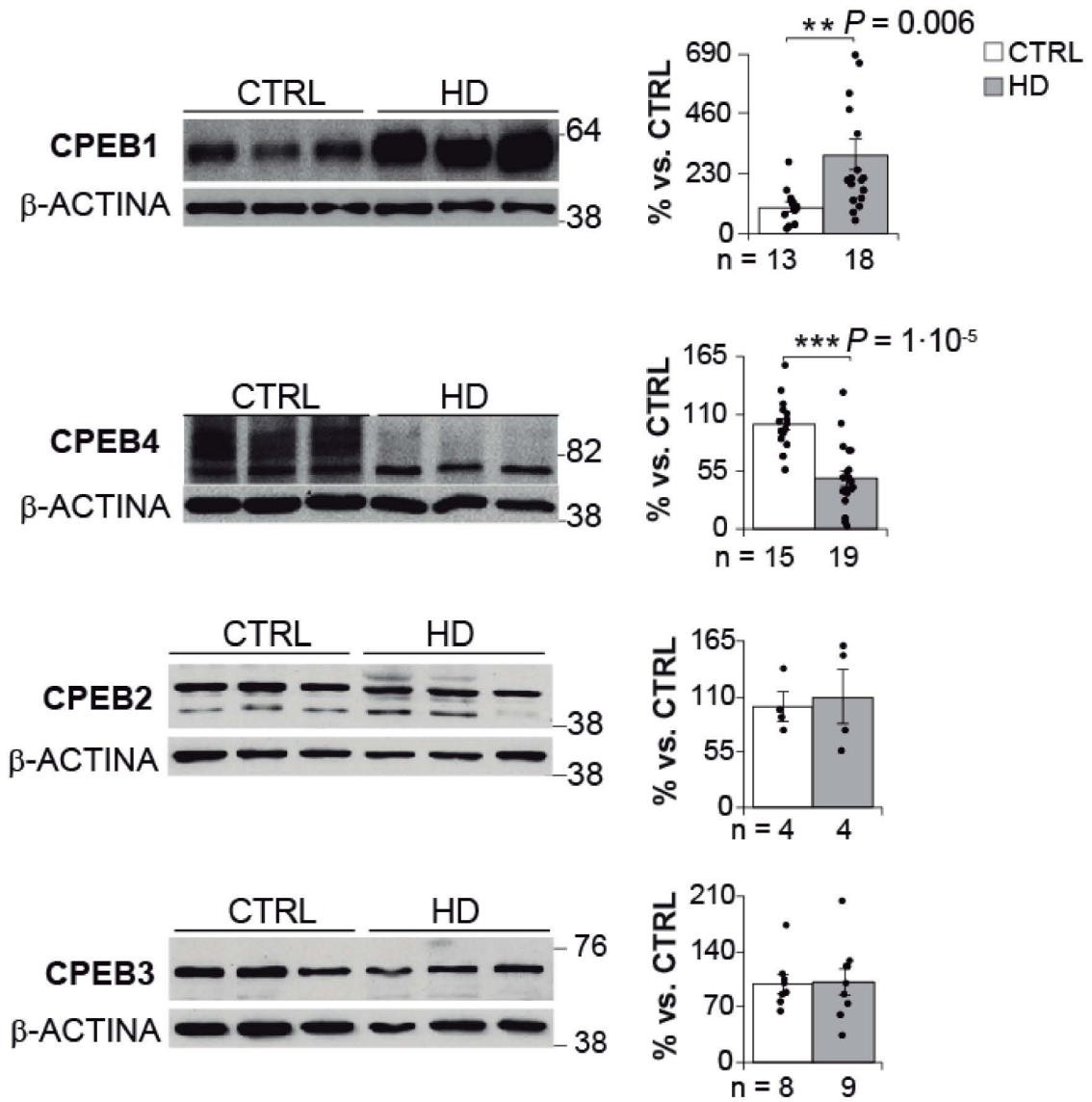


FIG. 1A

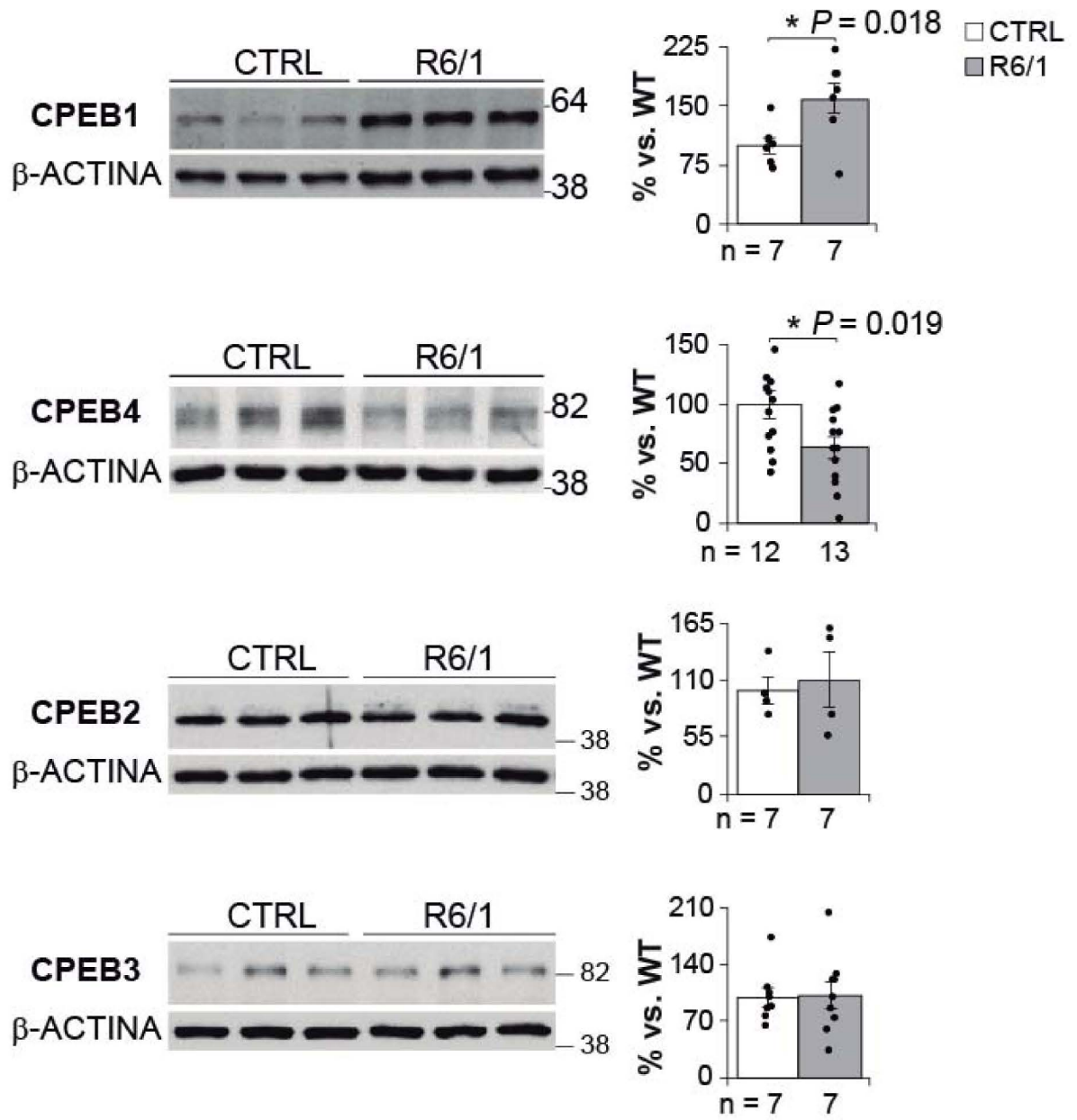


FIG. 1B

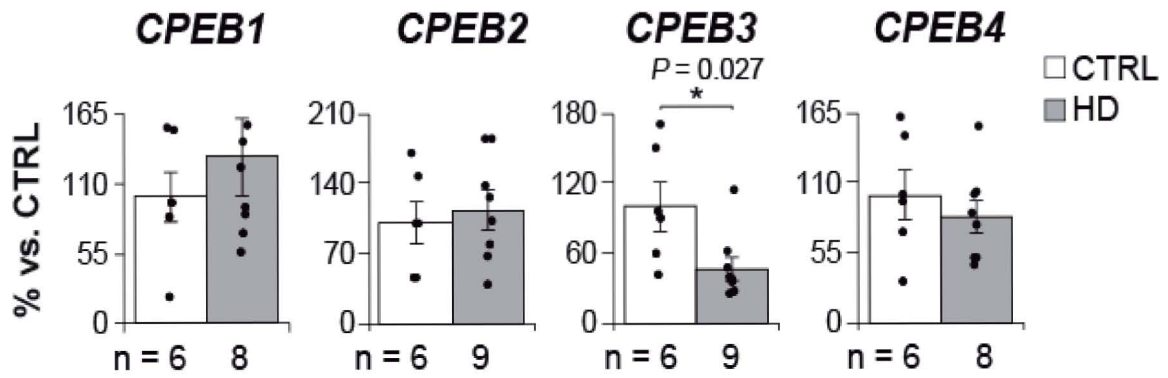


FIG. 1C

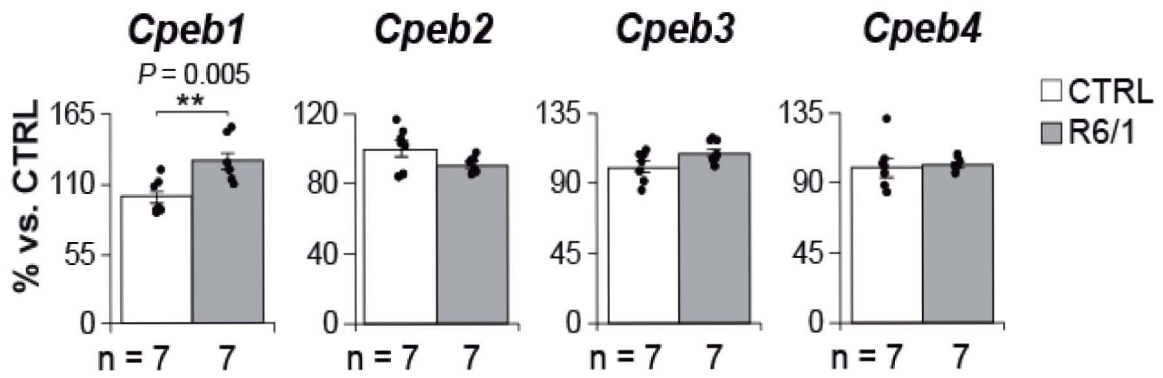


FIG. 1D

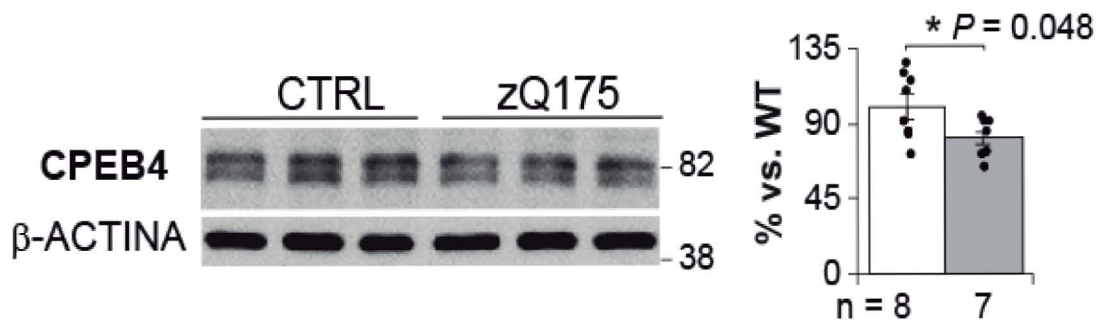


FIG. 1E

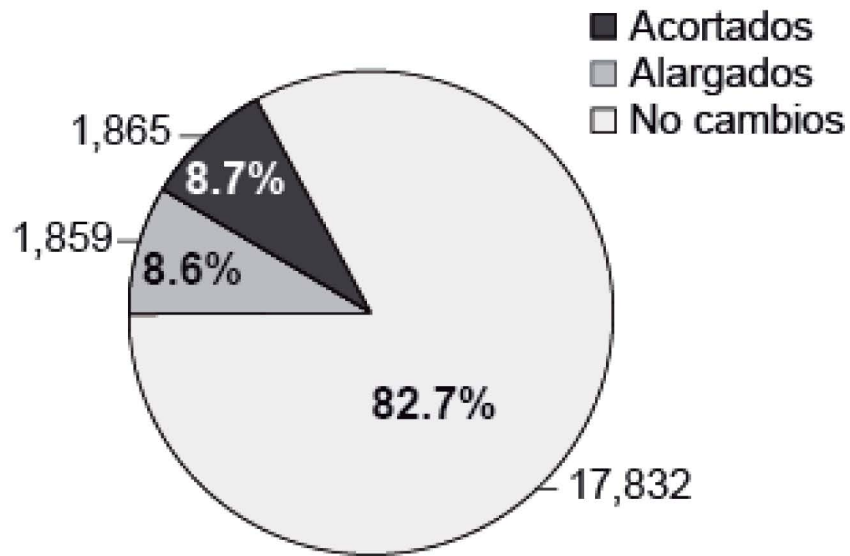


FIG. 2A

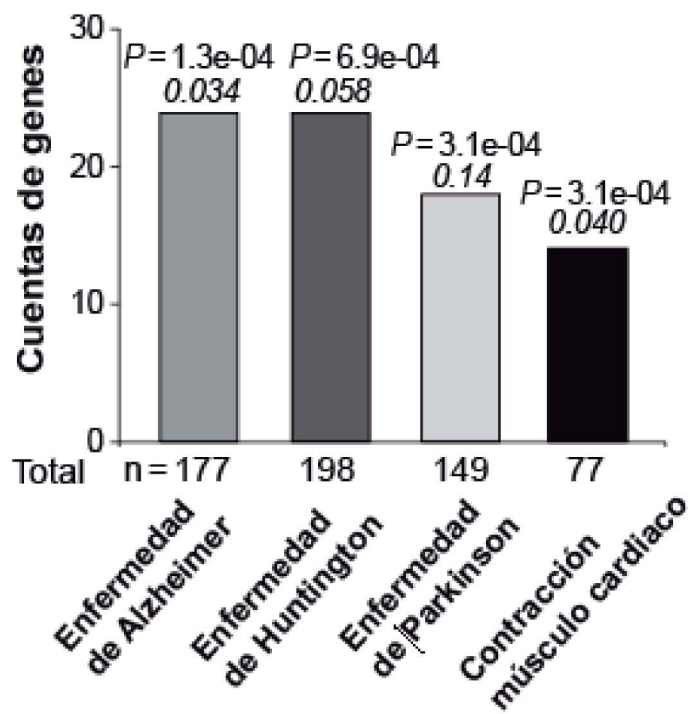


FIG. 2B

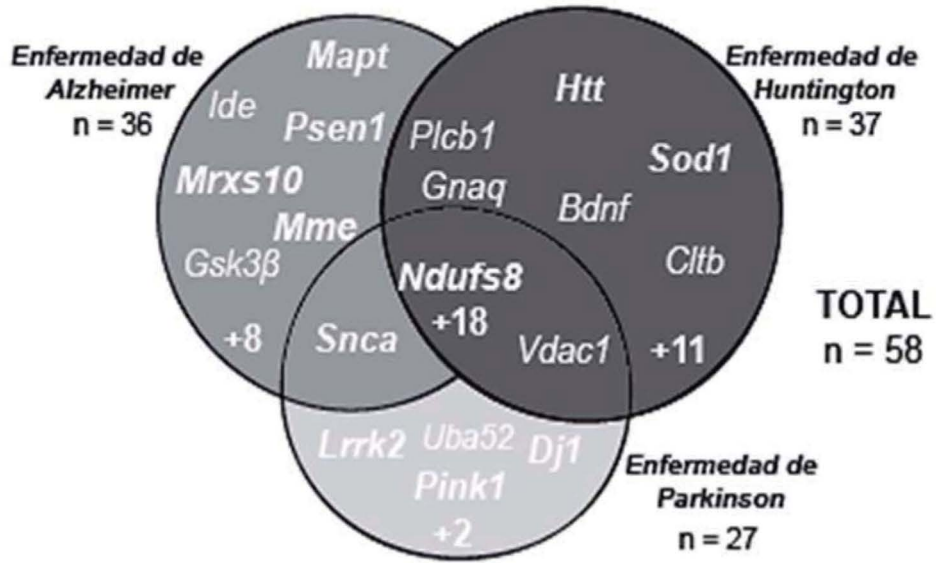


FIG. 2C

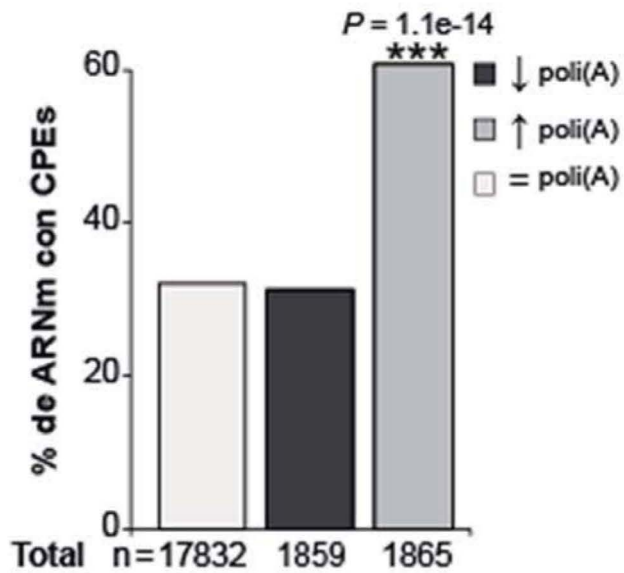
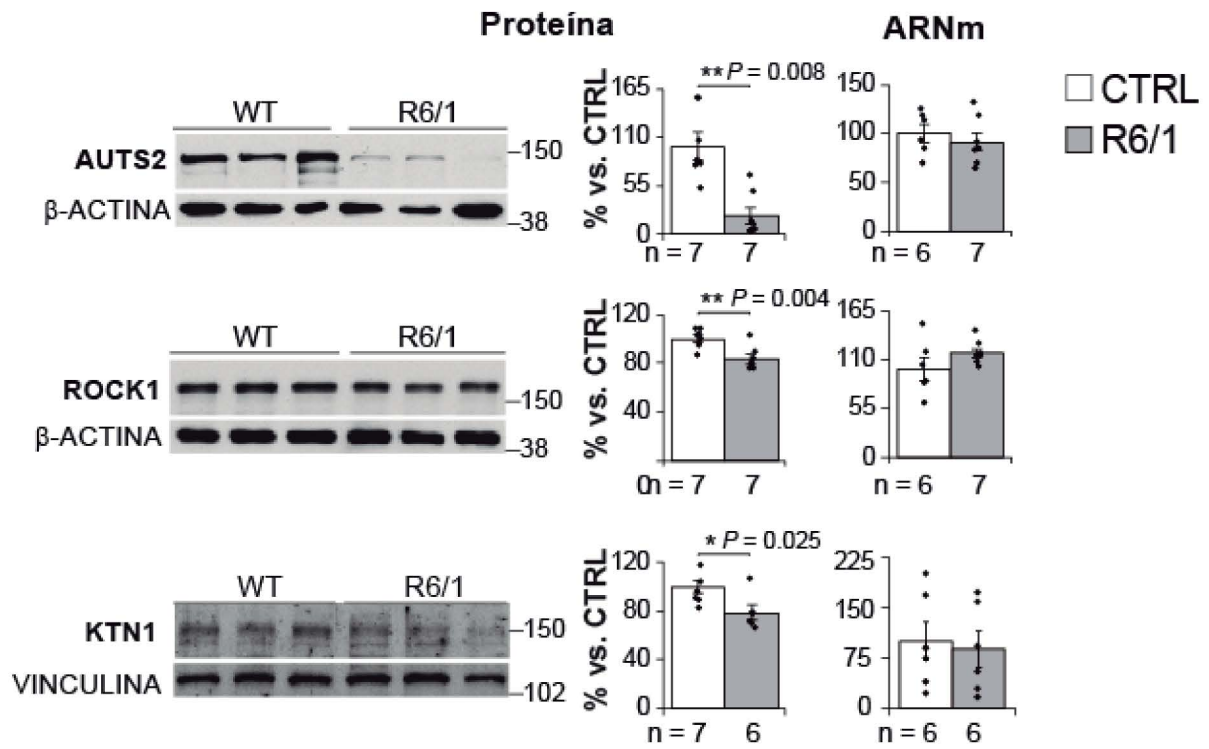
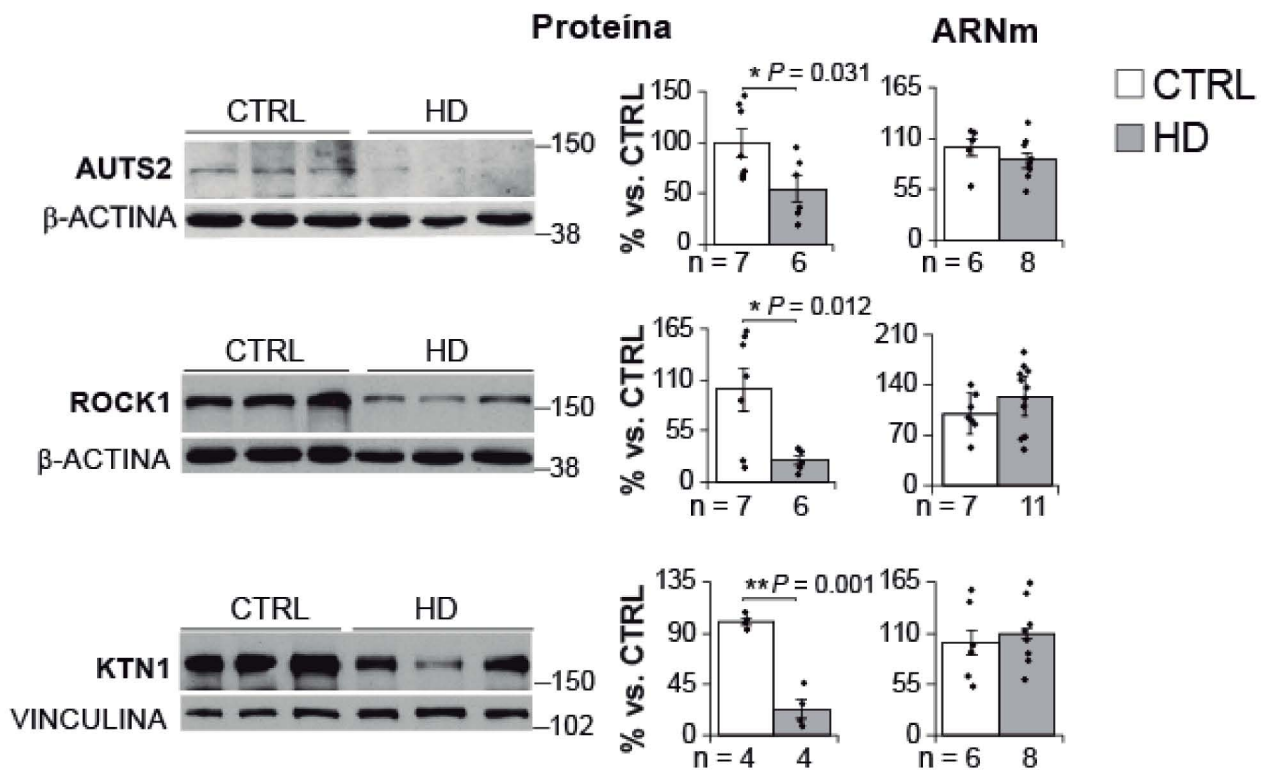


FIG. 2D



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**

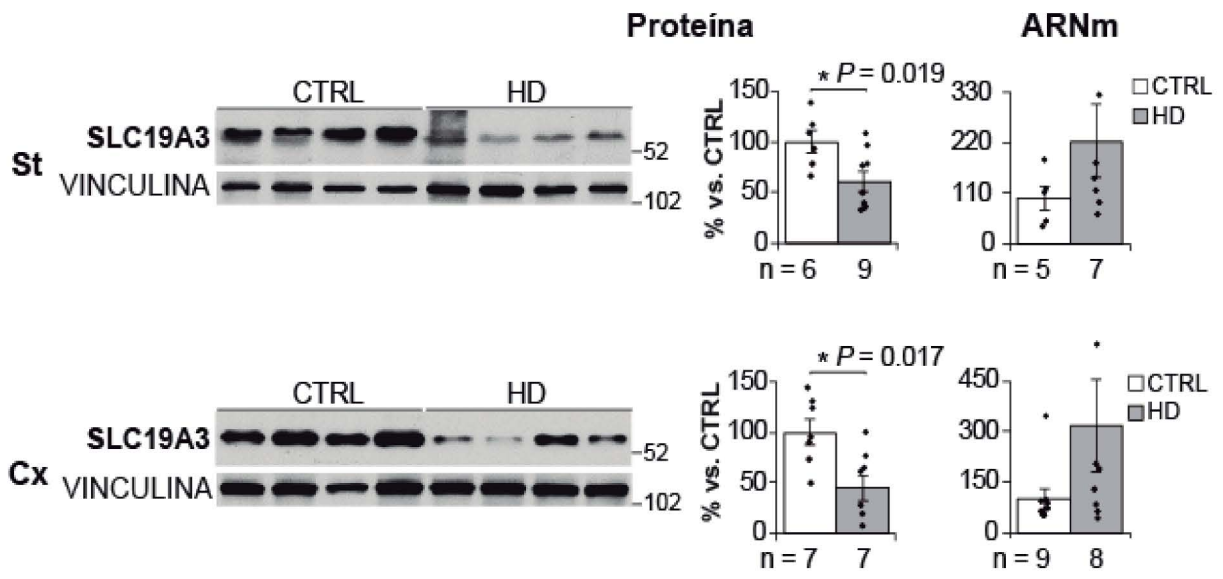


FIG. 4A

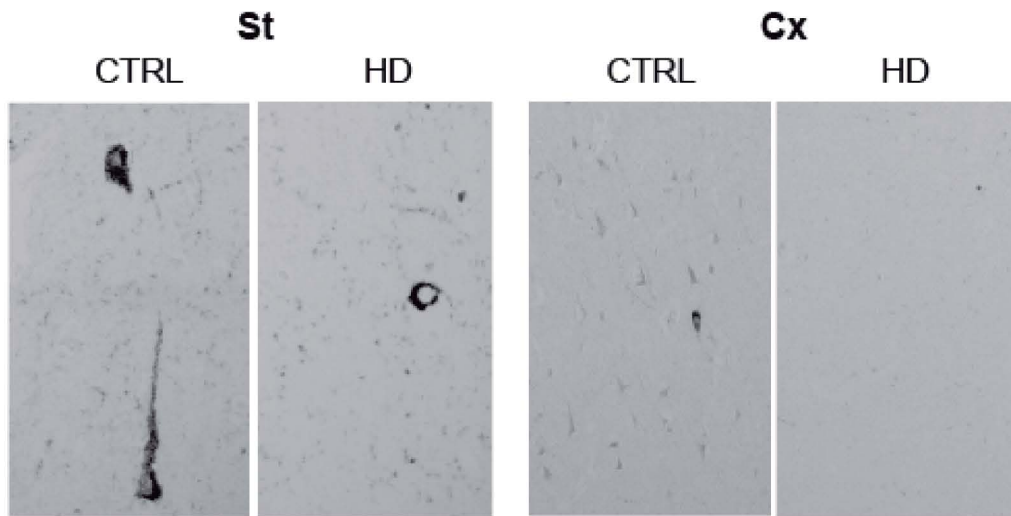


FIG. 4B



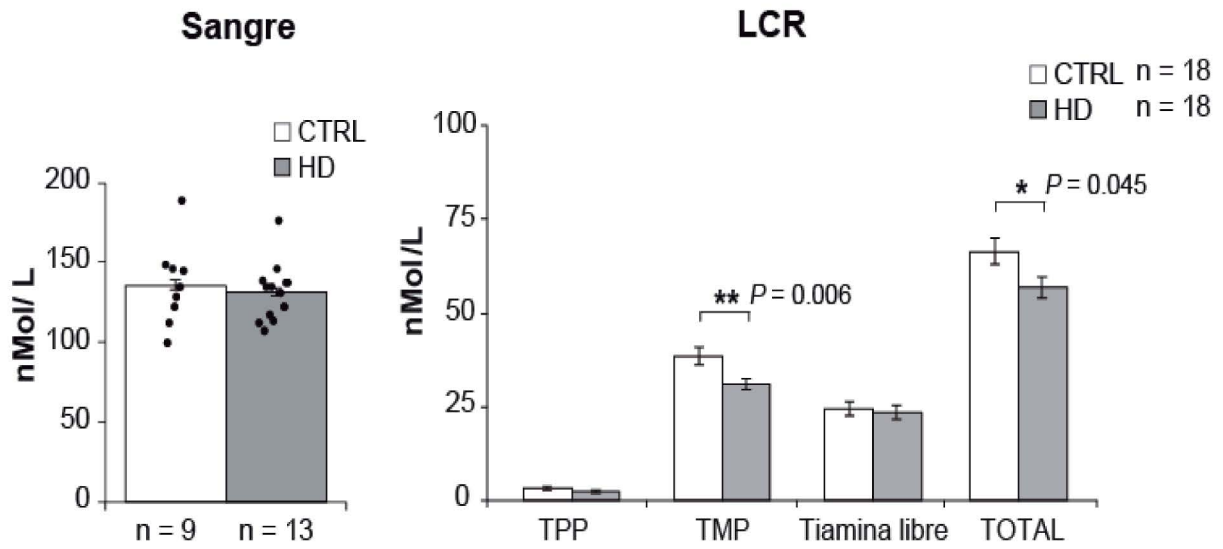


FIG. 4C

St

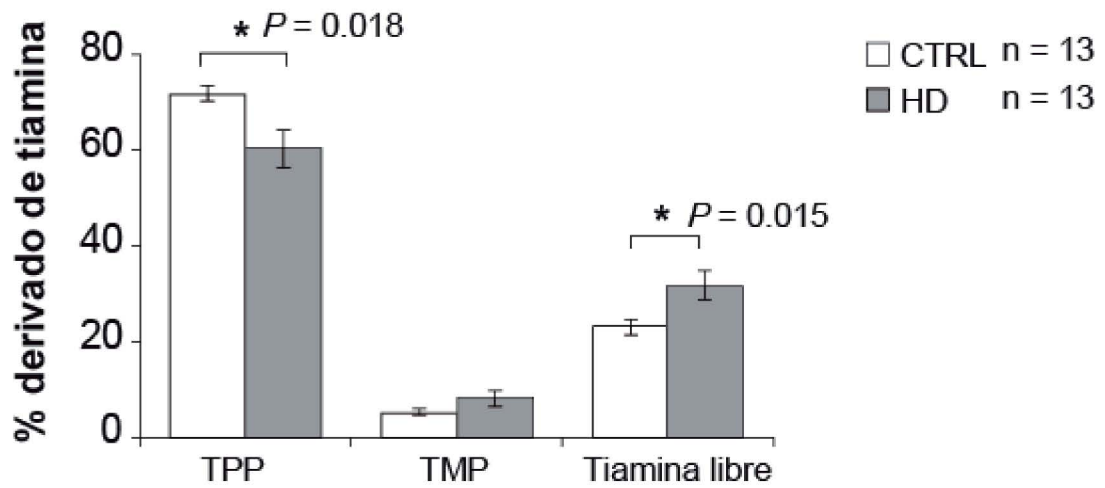
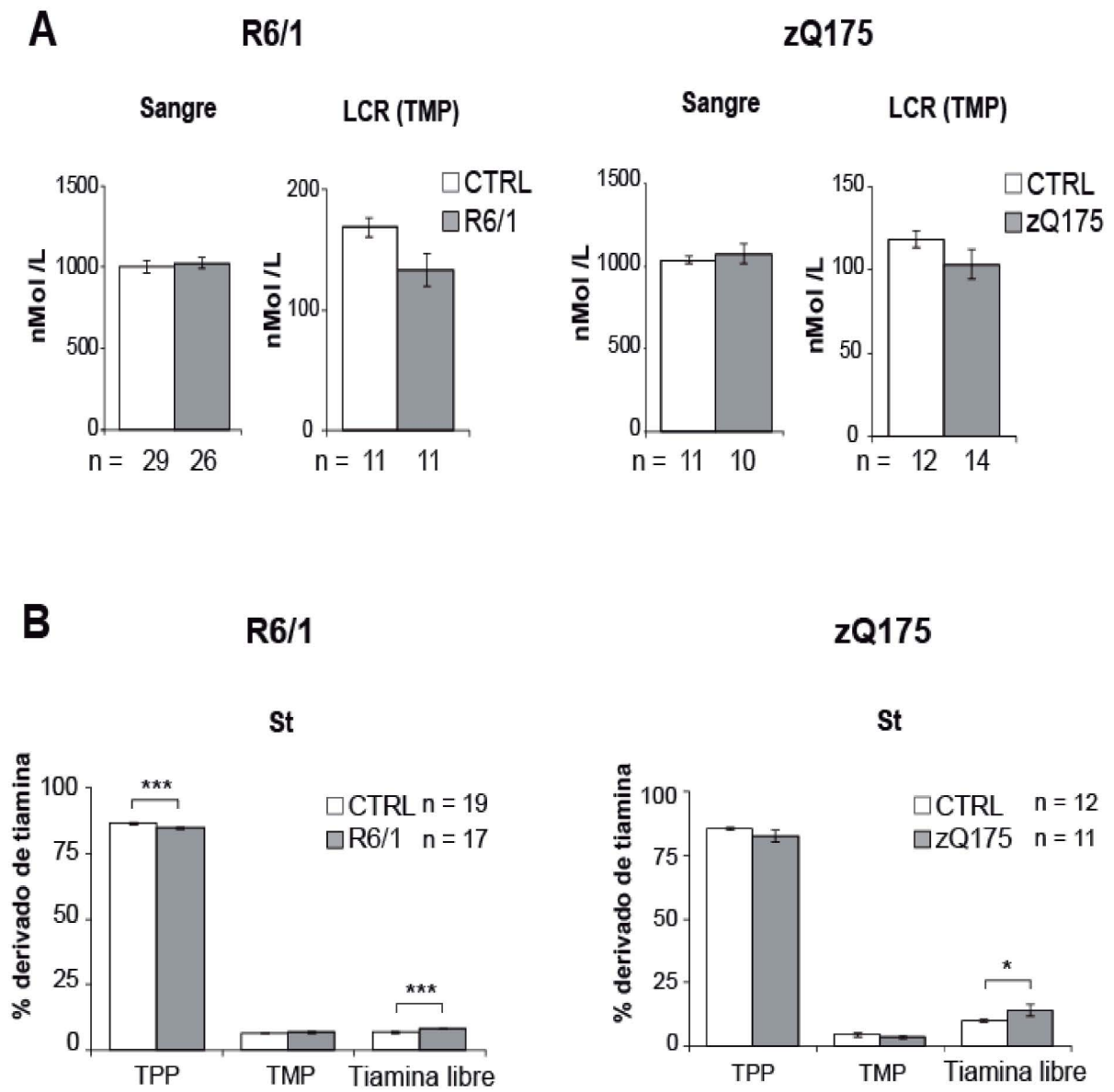


FIG. 4D



**FIG. 5**

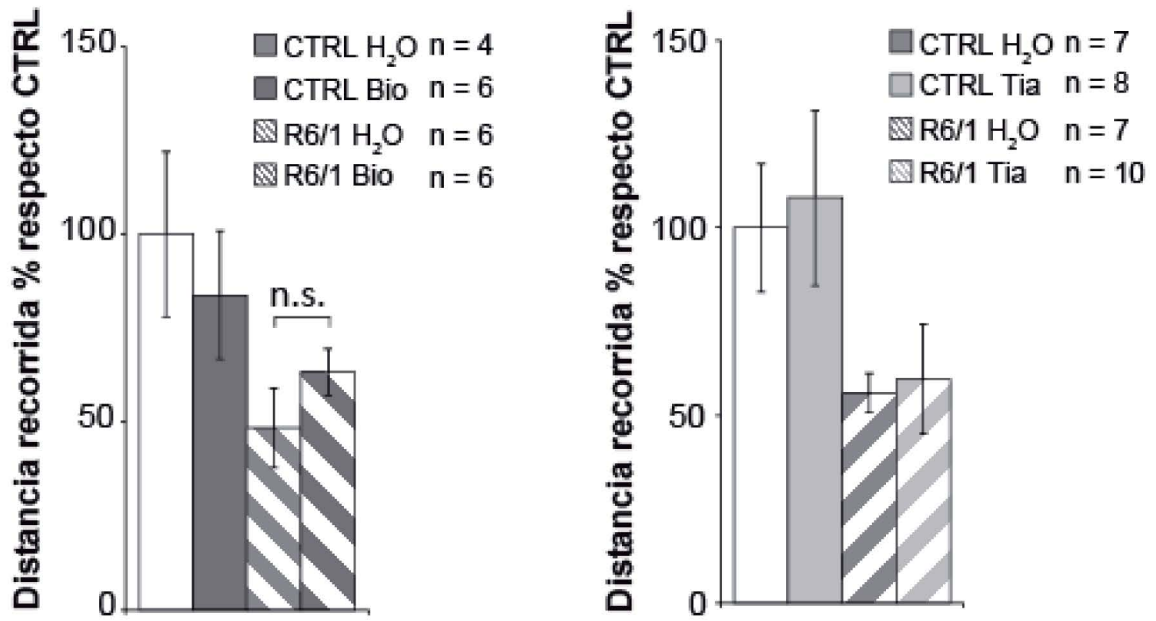


FIG. 6A

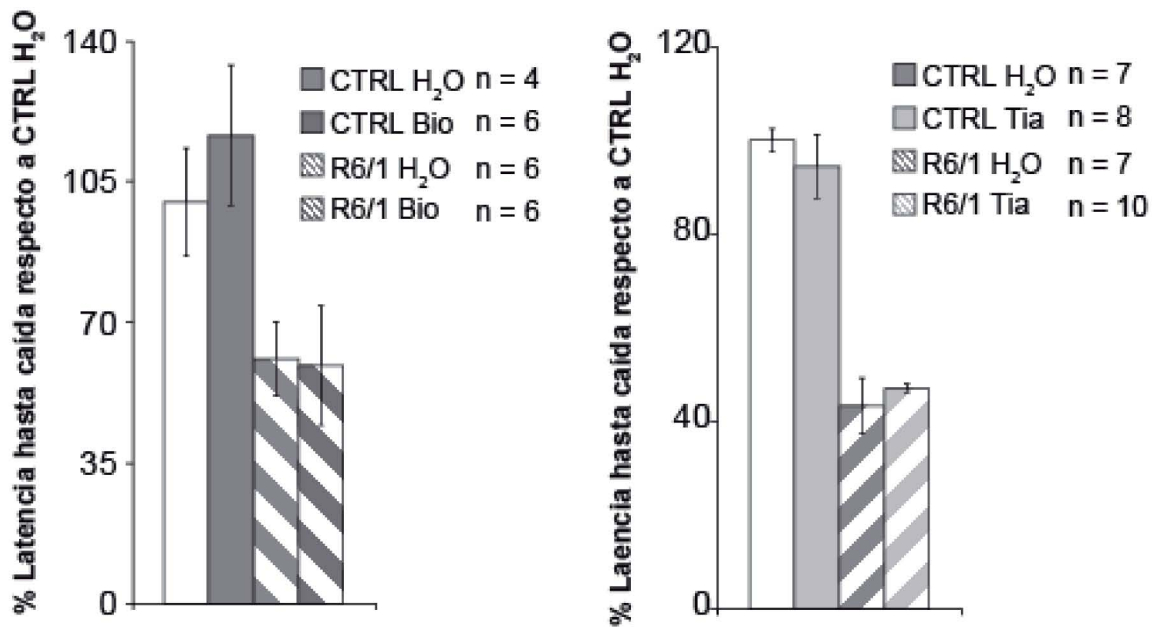


FIG. 6B

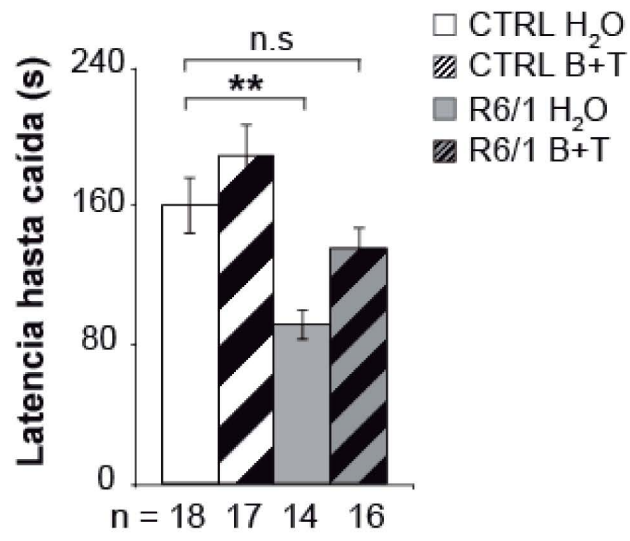


FIG. 6C

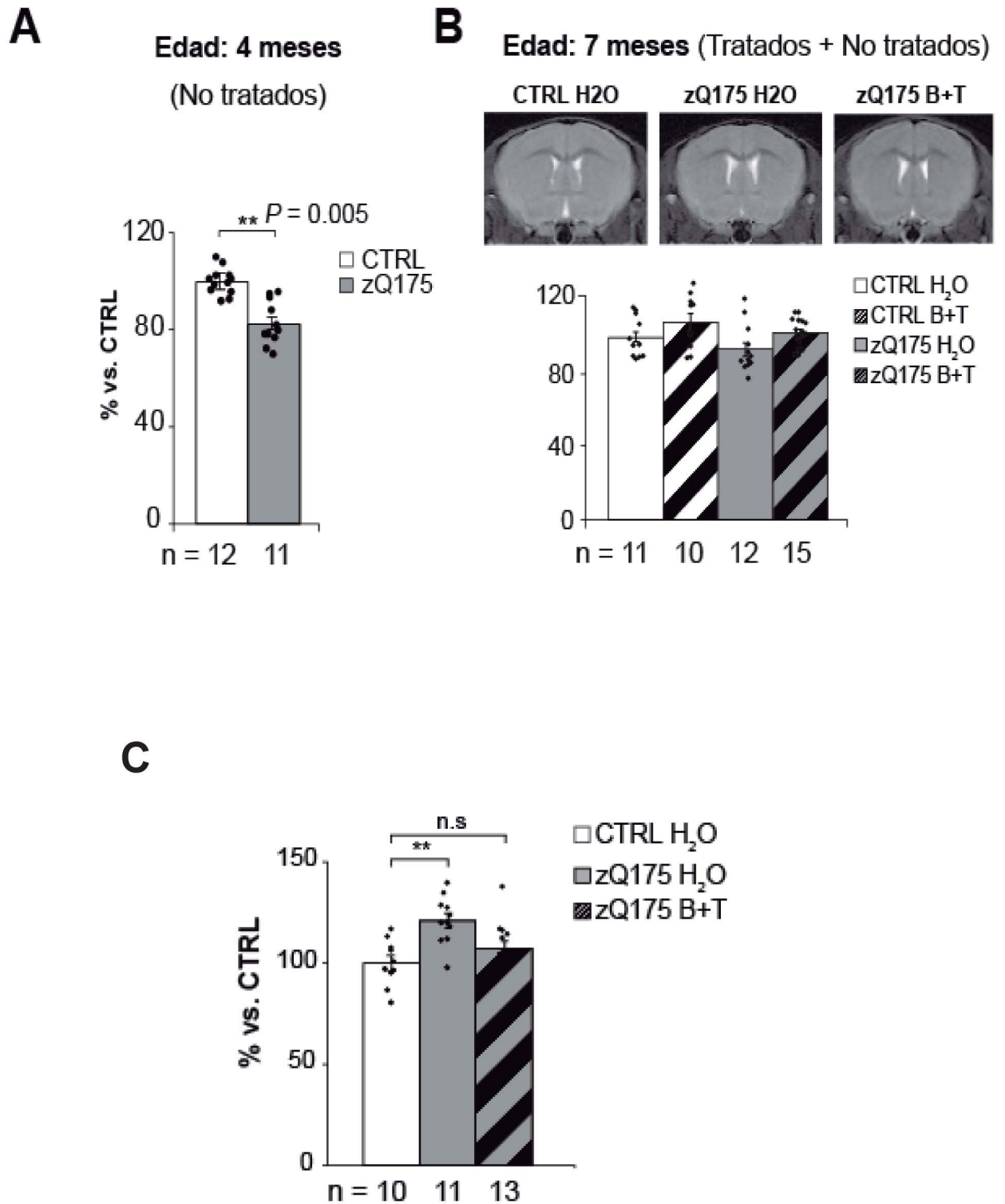


FIG. 7



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201930825

22 Fecha de presentación de la solicitud: 24.09.2019

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BRAHIM TABARKI <i>et al.</i> Biotin-Thiamine-Responsive Basal Ganglia Disease.. NIH U.S. National Library of Medicine, National Center of Biotechnology information, 2013, Páginas 1-10 [en línea][recuperado el 25/02/2020]. Recuperado de Internet <URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169615/pdf/Bookshelf_NBK169615.pdf">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169615/pdf/Bookshelf_NBK169615.pdf</a> >. página 1, primer y último párrafos; página 2, línea 5; página 3, primer y segundo párrafos; página 4, penúltimo párrafo.	1-9
A	GRUBER-BZURA BEATA M <i>et al.</i> Role of thiamine in Huntington's disease pathogenesis: In vitro studies.. Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University Poland Aug 2017. , 31/07/2017, Vol. 26, Páginas 751 - 760, ISSN 1899-5276 (Print), <DOI: doi:10.17219/acem/63091 pubmed: 29068569>. Página 752, columna derecha, segundo párrafo y página 756, columna izquierda, primer párrafo; página 760, columna izquierda, primer párrafo.	1-9
A	US 6746678 B1 (SHAPIRO HOWARD K) 08/06/2004, Columna 1, segundo párrafo; columna 31; columna 58; reivindicación 2.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.02.2020

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61P25/28** (2006.01)

**A61K31/4188** (2006.01)

**A61K31/51** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61P, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, LNP, EMBASE, INTERNET