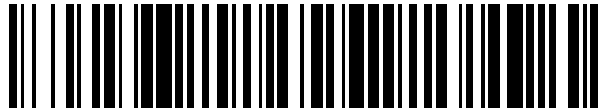


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 168**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009 E 09806203 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2373301**

54 Título: **Métodos de diagnóstico de enfermedades de neuronas motoras**

30 Prioridad:

05.12.2008 US 193535 P

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

10.02.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**HORNSTEIN, ERAN;
CHEN, ALON;
HARAMATI, SHARON y
CHAPNIK, ELIK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 442 168 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

Métodos de diagnóstico de enfermedades de neuronas motoras

5 **Campo y antecedentes la invención**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades de neuronas motoras y, más particularmente, pero no exclusivamente, a la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

10 Las enfermedades de neuronas motoras (MND) pertenecen a un grupo de trastornos neurológicos atribuidos a la destrucción de neuronas motoras del sistema nervioso central y a cambios degenerativos en la vía de la neurona motora. Dichas enfermedades son diferentes de otras enfermedades neurodegenerativas, que incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, atrofia olivopontocerebelosa, etc, que son causadas por la destrucción de neuronas que no son las neuronas motoras. Por lo general, las MND son trastornos degenerativos progresivos, que afectan a los nervios en las partes superior e inferior del cuerpo. Generalmente, las MND se descubren en la madurez. Los síntomas pueden incluir dificultad para tragar, debilidad en las extremidades, dificultad para hablar, alteración de la marcha, debilidad facial y calambres musculares. La respiración se puede ver afectada en las últimas etapas de estas enfermedades. La causa o causas de la mayoría de las MND no se conocen, pero los factores ambientales, tóxicos, virales o genéticos son todos sospechosos.

25 Las neuronas motoras, que incluyen las neuronas motoras superiores y las neuronas motoras inferiores, afectan a los músculos voluntarios, estimulándolos para que se contraigan. Las neuronas motoras superiores se originan en la corteza cerebral y envían fibras a través del tronco cerebral y la médula espinal, y están implicadas en el control de las neuronas motoras inferiores. Las neuronas motoras inferiores están situadas en el tronco del encéfalo y la médula espinal y envían fibras a los músculos. Las enfermedades de las neuronas motoras inferiores son enfermedades que implican menor degeneración de las neuronas motoras. Cuando una neurona motora inferior se degenera, las fibras musculares que normalmente activa se desconectan y no se contraen, causando debilidad muscular y disminución de los reflejos. La pérdida de cualquiera de los tipos de neuronas da como resultado debilidad, atrofia muscular (debilidad) y debilidad indolora que son las características clínicas de la MND.

35 La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad mortal de las neuronas motoras caracterizada por una pérdida de células piramidales en la corteza motora cerebral (es decir, células gigantes de Betz), neuronas motoras espinales anteriores y neuronas motoras del tronco encefálico, y degeneración de las mismas en células piramidales. La ELA muestra, desde un aspecto clínico, signos tanto de las neuronas motoras superiores como de las neuronas motoras inferiores, y muestra un rápido deterioro clínico después de la aparición de la enfermedad, lo que conduce de este modo a la muerte en unos pocos años.

40 Al igual que muchas otras enfermedades de las neuronas motoras, solo un pequeño porcentaje (aproximadamente un 10 %-15 %) de la ELA se hereda. La epidemiología genética de la ELA ha revelado por lo menos seis localizaciones cromosómicas responsables de la herencia de la enfermedad (de ALS1 a ALS6). Entre éstas, se han identificado tres genes. El primero fue identificado en 1993 como el gen superóxido dismutasa de Cu/Zn citosólica (SOD-1) que representa un 20 % de la forma dominante autosómica de la ELA (Rosen y col., 1993, Nature, 4 de marzo de 1993; 362 (6415): 59-62). El descubrimiento de esta causa genética principal de la ELA ha proporcionado una base para generar modelos de ratón para esta enfermedad. Estos modelos son útiles para someter a ensayo terapias que podrían ayudar en el tratamiento de la ELA.

50 El segundo se denominó Alsln, un factor de intercambio potencial de nucleótidos de guanina (GEF) responsable de la forma recesiva juvenil de ELA. El tercero es ALS4 que codifica para un dominio de ADN/ARN helicasa que contiene una proteína llamada Senataxina identificada por estar vinculada a la forma dominante autosómica de la ELA juvenil. Más recientemente, se informó que una mutación en la proteína de membrana asociada a vesículas/proteína B de membrana asociada a sinaptobrevina (VAPB) en un nuevo locus llamado ELA8, se asocia con una forma atípica de la ELA.

55 El riluzol es el único fármaco aprobado para la ELA en Estados Unidos y Japón. El riluzol se desarrolló originalmente como un anticonvulsivo que inhibe la liberación de glutamato y en varios ensayos clínicos se ha informado que solo muestra una ligera eficacia para la supervivencia de los pacientes con ELA (Rowland L P y Shneider N A, 2001, N Engl J Med, 344, 1688-1700; y Turner M R y Parton M J, 2001, Semin Neurol 21: 167-175).

60 Los micro-ARN (también conocidos como miARN) son miembros de moléculas de ARN de 20 a 24 nucleótidos (nt) de la familia de los ARN pequeños no codificantes. Los micro-ARN fueron identificados en mamíferos, gusanos, moscas de la fruta y plantas y se cree que regulan la estabilidad de sus copias de ARN mensajero diana (ARNm) de una forma específica de tipo tisular y celular. Principalmente, los micro-ARN regulan la estabilidad del ARN mediante la unión a la región 3' no traducida (UTR en la posición 3') de los ARNm diana y por lo tanto suprimen la traducción, o de forma similar a los siARN, uniéndose a y destruyendo copias diana de una forma dependiente de las secuencias.

Se encontró que los micro-ARN estaban implicados en diversas vías de diferenciación celular. Por ejemplo, se encontró que miR-181 se expresa preferentemente en las células linfoides B y su expresión ectópica en células madre/progenitoras hematopoyéticas conducía a un aumento de la fracción de células de linaje B *in vitro* e *in vivo*. Además, se demostró que miR-23 está presente en células NT2 progenitoras neurales humanas diferenciadas, pero no sin diferenciar y que regula un supresor transcripcional en dichas células. Otros investigadores han identificado la generación de moléculas de tipo micro-ARN derivadas de intrones (Id-micro-ARN) de estas regiones como una herramienta para el análisis de la función genética y desarrollo de agentes terapéuticos específicos de genes, y predijeron posibles aplicaciones que incluyen sistemas principales de modulación genética para la regulación del desarrollo, inmunidad intracelular, inactivación de heterocromatina, y evolución del genoma en eucariotas (Lin y Ying, 2004b).

Los micro-ARN se han visto implicados en diversas enfermedades neurológicas tales como Síndrome del cromosoma X frágil, atrofia muscular espinal (SMA), parkinsonismo de inicio temprano (síndrome de Waisman) y retraso mental ligado al cromosoma X (MRX3), así como diversos tipos de cáncer y afecciones precancerosas tales como tumor de Wilm, tumor de células germinales testiculares, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de linfocitos B, linfoma de tejidos colorrectales precancerosos y neoplásicos y de Burkkit [revisado en Gong H, y col., 2004, *Mediac Research Reviews*, Publicado online en Wiley InterScience (www.intersciencedotwileydotcom)].

La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20060247193 enseña la administración de más de 100 miARN para el tratamiento de las MND que incluyen la ELA.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20090246136 enseña la administración de miR-206 y/o miR-1 para el tratamiento de las MND que incluyen la ELA.

Figlewicz y col [Human Molecular Genetics, Volumen 3, 1994] enseña variantes de la subunidad de neurofilamentos pesados que están asociadas con el desarrollo de la ELA.

La técnica anterior relevante adicional incluye la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20080176766.

Sumario de la invención

La presente invención se define con las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un método para diagnosticar una MND, método que comprende analizar una actividad o expresión de miARN-9 o miARN-9* en una muestra de un sujeto que lo necesita, en el que una regulación negativa de la actividad o la expresión del miARN-9 o miARN-9* es indicativo de la MND.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un kit para diagnosticar una MND que comprende un agente que determina específicamente un nivel de miARN-9 o miARN-9*.

En un ejemplo de la presente invención, el análisis de dicha actividad o expresión de miR-9 o miR-9* se realiza usando una sonda de oligonucleótidos que tiene una secuencia de ácidos nucleicos tal como se establece en las SEC ID N°s: 3 o 4.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la MND se selecciona entre el grupo que consiste en Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, parálisis pseudobulbar, parálisis bulbar progresiva, enfermedad de neuronas motoras inferiores y atrofia muscular espinal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la muestra comprende una muestra de líquido cerebroespinal (CSF) o una muestra de sangre.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como lo entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece la invención.

Breve descripción de las figuras

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. A este respecto, la descripción proporcionada con las figuras hace evidente para los expertos en la materia cómo se pueden poner en práctica realizaciones de la invención.

En las figuras:

Las Figuras 1A-H son gráficos que ilustran menor actividad de supervivencia y cinética de los ratones MND-^{mut}. (A) Curva de supervivencia para ratones con genosupresión para Dicer de los controles y condicionales (control, MND-^{mut}; n = 12,12). (B) Aumento de peso de ratones de los controles y MND-

CR^{mut}. (C) Tiempo para completar un turno en la tarea de palos para ratones los controles y MNDCR^{mut}. (D-E) Medidas en campo abierto a las 8, 16 y 31 semanas de edad. (D) Relación de la distancia recorrida en el área de campo abierto en comparación con la media de los controles (n = 12,12). (E) Relación de sucesos de cría realizados en el área de campo abierto en comparación con la media de los controles (n = 12,12). (F-H) Movimiento en la jaula de alojamiento de MNDCR^{mut} y controles, a las 11 (F), 21 (G) y 50 (H) semanas de edad (n = 12,12). Inserciones: Promedio de actividad durante el período medido * P < 0,05, ** P < 0,01.

Las Figuras 2A-C son gráficos y fotografías que ilustran que los ratones MNDCR^{mut} presentan atrofia muscular con signos de denervación. Registro por EMG (electromiografía) bipolar del músculo *interóseo* y *gastrocnemio* de las patas traseras. (A) Trazas representativas por EMG de control (parte superior) y MNDCR^{mut} (parte inferior) con anestesia. Los potenciales de fibrilación frecuentes están anotados con flechas de color rojo. (B) Para cada ratón, los hallazgos por EMG se clasificaron en una escala de 1-7 denominadas "Índice de Patología por EMG", refleja la intensidad y la frecuencia de potenciales de fibrilación (n = 5,5) en ratones codificados, indicando que el electromiógrafo fue cegado tal como para el genotipo del ratón sometido a ensayo. (C) Tinción con Hematoxilina y Eosina de la sección transversal a través del músculo *tibial de* MNDCR^{mut}. Las fibras angulares están marcadas con flechas. * P < 0,05, **P < 0,01.

Las Figuras 3A-P son fotografías y gráficos que ilustran que MNDCR^{mut} presentan axonopatía y esclerosis de las astas ventrales de la médula espinal. (A-B) Tinción representativa con Nissl de secciones lumbares de un ratón MNDCR^{mut} y un miembro de la camada de control. Las inserciones son ampliaciones de una zona del asta ventral en cada sección. La línea discontinua representa el límite por debajo del cual se hizo recuento de células de diámetro grande (> 20 µm). (C) Número promedio de neuronas motoras contadas por asta ventral en la médula espinal lumbar (L2-L3) de ratones MNDCR^{mut} de cuatro meses de edad y controles (12 secciones lumbares por animal; n = 5,5). (D-E) Sección lumbar representativa inmunoteñida con GFAP de ratones MNDCR^{mut} de cuatro meses de edad y controles. (F) Intensidad media de señales medida en las astas latero-ventrales de médula espinal lumbar (L2-L3) de ratones MNDCR^{mut} y controles (unidades arbitrarias, 3 secciones lumbares por animal; n = 5,5). (G-L) Placa terminal representativa que demuestra superposición total (parte superior) o superposición parcial (parte inferior) entre los componentes postsinápticos (rojo; bungarotoxina marcada con rodamina) y presinápticos (anticuerpo anti-NEFM de color verde) de la unión neuromuscular. (M) Porcentaje de placas terminales patológicas en ratones MNDCR^{mut} y controles (400 sinapsis/animal; n = 2,2). (N-O) Raíces representativas dorsales (sensoriales, izquierda) y ventrales (motoras, derecha) usadas para medidas del número de axones, teñidos con anticuerpo anti-NEFM. (P) Número promedio de axones en la raíz dorsal y ventral de ratones MNDCR^{mut} y controles (n = 2). * P < 0,05, **P < 0,01.

Las Figuras 4A-G son gráficos y diagramas que ilustran que mir-9 está específicamente regulada de forma negativa en un modelo de atrofia muscular espinal y está secuencia arriba de la expresión coordinada de las subunidades de neutrofilamentos. (A-C) Distribución agrupada de la intensidad de expresión de subunidades NF. El porcentaje de axones en cualquier grupo de intensidad se menciona en el *eje y*. A-NEFL, B-NEFM, C-NEFH. Las líneas negras y grises representan la intensidad media global de axones de control y MNDCR^{mut}, respectivamente. (D) Ilustración de secuencias clonadas en constructos indicadores de luciferasa usados para la evaluación funcional de interacciones de miR-9 con mRNA con subunidades NF, en la que NEFH^{mut} representa NEFH mutado con semillas. Los recuadros de color gris representan sitios de unión a miR-9 (E) El ensayo de indicador de luciferasa heteróloga desvela que miR-9 puede funcionar secuencia arriba de las subunidades NF. Los niveles de la actividad de luciferasa en células HEK293 transfectadas con un vector vacío, o un vector que sobreexpresa miR-9. Los datos se normalizan a la actividad de un indicador de beta-galactosidasa co-transfectada y se presentan como porcentaje de actividad de luciferasa en ausencia de miR-9. OC-2 (un fragmento de la UTR en la posición 3' de Onecut2) se usa como un control positivo. (F-G) Células madre embrionarias de ratón de tipo silvestre (mESCs) y mESCs de SMN1^{mut}, que albergan mutación mSMN1 homocigota y dos copias de un transgén hSMN2 se diferenciaron *in vitro* en neuronas motoras. Las células se purificaron con FACS para la expresión de transgenes GFP, dirigida mediante el promotor Hlxb9. (F)- Representación gráfica con forma de volcán que ejemplifica la relación de log2 de la expresión de SMN1^{mut} / miARN de tipo silvestre en el *eje x* y el valor del log10 P obtenido mediante un ensayo de t de student de dos colas en el *eje y*. (G)- Análisis qPCR de la expresión de miR-9 y miR-9* en neuronas motoras derivadas de mESCs de SMN1^{mut} (barras de color gris) y mESCs de tipo silvestre (barras vacías) * P < 0,05, **P < 0,01.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en una realización de la misma, se refiere a métodos para diagnosticar enfermedades de neuronas motoras y, más particularmente, pero no exclusivamente, a la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

Se sabe que miARN desempeña un papel crucial en la regulación genética después de la transcripción en la plasticidad morfológica y funcional de neuronas de vertebrados postmitóticas. Además, alteraciones en la función de miARN contribuyen a la susceptibilidad a la enfermedad neurodegenerativa.

Los presentes inventores han generado un ratón transgénico que carece selectivamente de actividad microARN en

neuronas motoras postmitóticas (MN). El ratón presenta marcas de MND (enfermedad de neuronas motoras), incluyendo esclerosis de las astas centrales de la médula espinal, arquitectura anómala de placas terminales y atrofia muscular con signos de denervación (Figuras 2A-C y 3A-P).

5 Usando este modelo, los presentes inventores encontraron que la expresión de la subunidad pesada de neurofilamentos (NFH) está regulada de forma positiva en las MN deficientes en miARN (Figuras 4A-C).

Los presentes inventores mostraron que miR-9 está específicamente regulado de forma negativa en un modelo de ratón diferente de atrofia muscular espinal (Figuras 4F-G).

10

Finalmente, los presentes inventores mostraron que NFH es una diana para la regulación de miR-9 (Figura 4E).

Los presentes inventores concluyen a partir de estos hallazgos que miR-9 puede estar implicada en las MND y como tal los presentes inventores proponen que miR-9 puede servir como una diana potencial tanto para tratamientos como para diagnósticos de las MND.

15

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad de neuronas motoras (MND), método que comprende analizar una actividad o expresión de miARN-9 o miARN-9* en una muestra de un sujeto que lo necesita, en el que una regulación negativa de la actividad o expresión de miARN-9 o miARN-9* es indicativo de la MND.

20

Tal como se usa en el presente documento, el término "diagnosticar" se refiere a clasificar una patología (por ejemplo, una enfermedad, trastorno, síndrome, afección médica y/o un síntoma de los mismos), determinar una gravedad de la patología, controlar el avance de una patología, pronosticar un resultado de la patología y/o perspectivas de recuperación (por ejemplo, diagnóstico).

25

La expresión "enfermedad de neuronas motoras (MND)", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno neurológico que destruye selectivamente neuronas motoras. Como tal, enfermedades tales como corea de Huntington no se clasifican como MND.

30

Ejemplos de enfermedades que neuronas motoras incluyen, pero no se limitan a Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también conocida como Enfermedad de Lou Gehrig, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, parálisis pseudobulbar, parálisis bulbar progresiva, enfermedad de neuronas motoras inferiores y atrofia muscular espinal de tipo 1 (SMA1, Enfermedad de Werdnig-Hoffmann), Atrofia Muscular Espinal de Tipo 2 (SMA2) y Atrofia Muscular Espinal de Tipo 3 (SMA3, Enfermedad de Kugelberg-Welander) y Trastornos de Charcot-Marie-Tooth.

35

Tal como se usa en el presente documento "una muestra biológica" se refiere a una muestra de fluidos o muestra de tejido derivada de un sujeto. Ejemplos de muestras de fluidos incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, lágrimas, saliva, esputo y leche. Un ejemplo de una muestra de tejido incluye una muestra de tejido cerebral o una muestra de tejido nervioso (por ejemplo, para el diagnóstico postmortem).

40

Métodos para obtener dichas muestras biológicas son conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a procedimientos convencionales de recuperación de sangre y punción lumbar.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano. El sujeto puede estar sano o mostrar signos preliminares de una MND, tal como fatiga muscular. Como alternativa, el sujeto puede tener una predisposición genética a la enfermedad.

50 La detección del nivel del miARN-9 o 9* se puede realizar usando diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen métodos de hibridación basados en ARN (por ejemplo, hibridación de Transferencia Northern, hibridación de ARN in situ e hibridación de chip) y métodos de detección basados en transcripción inversa (por ejemplo, RT-PCR, RT-PCR cuantitativa, RT-PCR semicuantitativa, RT-PCR en tiempo real, RT-PCR in situ, extensión de cebadores, espectroscopía de masas, secuenciación, secuenciación por hibridación, LCR (LAR), Reacción Sintética Autosostenida (3SR/NASBA), reacción de Replicasa Q-Beta (Qb), reacción de sonda cíclica (CPR), un análisis de ADN ramificado, y detección de al menos un cambio de ácido nucleico).

55

El ARN celular total se puede estar a partir de una muestra biológica usando cualquier técnica adecuada tal como el método de guanidinio-tiocianato-fenol-cloroformo de una sola etapa que se describen Chomczynski y Sacchi, Anal. Biochem. 162: 156-159 (1987) o mediante el uso de kits tales como el kit de Reactivo Tri (Sigma).

60

A continuación sigue una lista lo limitante de métodos de hibridación basados en ARN que se pueden usar para detectar el miARN de la presente invención.

65 **Análisis de transferencia Northern** - Este método implica la detección de un ARN en particular en una mezcla de ARN. Una muestra de ARN se desnaturaliza por tratamiento con un agente (por ejemplo, formaldehído) que evita el enlace de hidrógeno entre pares de bases, asegurando que todas las moléculas de ARN tienen una conformación

lineal, sin plegar. Las moléculas individuales de ARN se separan a continuación de acuerdo con el tamaño por electroforesis en gel y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o basada en nylon a la que se adhieren los ARN desnaturalizados. A continuación la membrana se expone a sondas marcadas de ADN, ARN u oligonucleótidos (compuestos de desoxirribo o ribonucleótidos). Las sondas se pueden marcar usando radioisótopos o nucleótidos unidos a enzimas. La detección se puede hacer usando autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de moléculas de ARN en particular como la determinación de su identidad mediante una posición relativa en la membrana que es indicativa de una distancia de migración en el gel durante la electroforesis.

Tinción por hibridación *in situ* de ARN - En este método, sondas de ADN, ARN u oligonucleótidos (compuestos de desoxirribo o ribonucleótidos) están unidas a las moléculas de ARN presentes en las células. Generalmente, las células se fijan primero a portaobjetos microscópicos para conservar la estructura celular y para evitar que las moléculas de ARN se degraden y a continuación se someten a un tampón de hibridación que contiene la sonda marcada. El tampón de hibridación incluye reactivos tales como formamida y sales (por ejemplo, cloruro sódico y citrato sódico) que permiten la hibridación específica de las sondas de ADN o ARN con sus moléculas de mRNA diana *in situ* a la vez que se evita la unión no específica de sondas. Los expertos en la materia son capaces de ajustar las condiciones de hibridación (*es decir*, temperatura, concentración de sales y formamida y similares) a sondas específicas y tipos de células. Después de la hibridación, cualquier sonda sin unir se retira por lavado y el portaobjetos se somete a una emulsión fotográfica que desde las señales generadas usando sondas radiomarcadas o a una reacción colorimétrica que desde las señales generadas usando sondas marcadas unidas a enzimas.

Hibridación a matrices de oligonucleótidos - La tecnología de chip/matriz ya se ha aplicado con éxito en numerosos casos. Por ejemplo, la identificación sistemática de mutaciones se ha realizado en el gen BRCA1, en cepas mutantes de *S. cerevisiae*, y en el gen de proteasa del virus VIH-1 [léase Hacia y col., (1996) Nat Genet 1996; 14 (4): 441-447; Shoemaker y col., (1996) Nat Genet 1996; 14 (4): 450-456; Kozal y col., (1996) Nat Med 1996; 2 (7): 753-759].

La muestra de ácido nucleico que incluye la región candidata a analizar se aísla, amplifica y marca con un grupo indicador. Este grupo indicador puede ser un grupo fluorescente tal como ficoeritrina. El ácido nucleico marcado se incubaba a continuación con las sondas inmovilizadas en el chip usando una estación de fluidos. Por ejemplo, Manz y col. (1993) Adv in Chromatogr 1993; 33: 1-66 describe la fabricación de dispositivos de fluidos y particularmente dispositivos microcapilares, en sustratos de silicio y vidrio.

Una vez que la reacción se completa, el chip se inserta en un escáner y se detectan patrones de hibridación. Los datos de hibridación se recogen, como una señal emitida desde los grupos indicadores ya incorporados en el ácido nucleico, que ahora está unido a las sondas unidas al chip. Las sondas que coinciden perfectamente con una secuencia de la muestra de ácidos nucleicos producen generalmente señales más fuertes que las que presentan faltas de coincidencias. Dado que se conoce la secuencia y la posición de cada sonda inmovilizada en el chip, se puede determinar la identidad del ácido nucleico hibridado a una sonda dada.

Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos usadas para las diversas técnicas de hibridación que se han descrito anteriormente en el presente documento son capaces de hibridar a miARN 9 o 9* en condiciones de hibridación rigurosas.

A modo de ejemplo, la hibridación de ácidos nucleicos cortos (por debajo de 200 bp de longitud, por ejemplo de 17-40 bp de longitud) se puede realizar mediante los siguientes protocolos de hibridación dependiendo de la rigurosidad deseada; (i) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACl 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche deshidratada sin grasas al 0,1%, temperatura de hibridación de 1-1,5 °C por debajo de la T_m, solución de lavado final de TMACl 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 % a 1-1,5 °C por debajo de la T_m (condiciones de hibridación rigurosas) (ii) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACl 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche deshidratada sin grasas al 0,1 %, temperatura de hibridación de 2-2,5 °C por debajo de la T_m, solución de lavado final de TMACl 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 % a 1 - 1,5 °C por debajo de la T_m, solución de lavado final de 6 x SSC, y lavado final a 22 °C (condiciones de hibridación de rigurosas a moderadas); y (iii) solución de hibridación de 6 x SSC y SDS al 1 % o TMACl 3 M, fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8), EDTA 1 mM (pH 7,6), SDS al 0,5 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y leche deshidratada sin grasas al 0,1 %, temperatura de hibridación a 2,5-3 °C por debajo de la T_m y solución de lavado final de 6 x SSC a 22 °C (solución de hibridación moderada).

Por ejemplo, una molécula de micro-ARN que tiene una secuencia de ácidos nucleicos tal como se expone en la SEC ID N°: 1 se puede detectar usando una sonda de oligonucleótidos que tiene una secuencia de ácidos nucleicos tal como se expone en la SEC ID N°: 3. Por ejemplo, una molécula de micro-ARN que tiene una secuencia de ácidos nucleicos tal como se expone en la SEC ID N°: 2 se puede detectar usando una sonda de oligonucleótidos que tiene una secuencia de ácidos nucleicos tal como se expone en la SEC ID N°: 4.

Tal como se ha mencionado anteriormente, miARN-9 o 9* también se pueden detectar usando un método basado en transcripción inversa. La transcripción inversa usa moldes de ARN, cebadores (específicos o aleatorios), transcriptasa inversa (por ejemplo, MMLV-RT) y desoxirribonucleótidos para formar (es decir, sintetizar) una molécula de ADN complementario (cADN) basada en la secuencia del molde de ARN. Una vez sintetizada, la molécula de cADN monocatenario o la molécula de cADN bicatenario (que se sintetiza basándose en el cADN monocatenario) se puede usar en diversos métodos de detección basados en ADN tales como análisis por RT-PCR.

Análisis de RT-PCR - Este método usa amplificación de PCR de moléculas de ARN relativamente raras. En primer lugar, las moléculas de ARN se purifican a partir de células y se convierten en ADN complementario (cADN) usando una enzima transcriptasa inversa (tal como una MMLV-RT) y cebadores tales como oligo-dT, hexámeros aleatorios, o cebadores específicos de genes. A continuación, mediante la aplicación de cebadores específicos de genes y Taq ADN polimerasa, una reacción de identificación por PCR realiza en una máquina para PCR. Los expertos habituales en la materia son capaces de seleccionar la longitud y secuencia de los cebadores específicos de genes y las condiciones para PCR (es decir, temperaturas de hibridación, número de ciclos, y similares) que son adecuadas para detectar moléculas específicas de ARN. Se observará que se puede usar una reacción por RT-PCR semicuantitativa, mediante el ajuste del número de ciclos de PCR y comparando productos de amplificación con controles conocidos.

Tinción de RT-PCR in situ - Este método se describe en: Nuovo, G. J. y col. (1993). Intracellular localization of polimerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. *Am J Surg Pathol* 17, 683-690; y Komminoth, P. y col. (1994) Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polimerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR. *Pathol Res Pract* 190, 1017-1025). En resumen, la reacción de RT-PCR en células fijadas implica la incorporación de nucleótidos marcados en la reacción. La reacción se realiza usando un aparato específico de RT-PCR *in situ*, tal como el sistema PixCell II™ Laser Capture Microdissection (LCM) de microdissección por captura con láser disponible en Arcturus Engineering (Mountainview, California, Estados Unidos de América).

Las sondas y cebadores (es decir, agentes de detección) que se usan para determinar específicamente un nivel de miARN-9 o miARN-9* se pueden envasar en un kit y marcar para el uso del diagnóstico de una enfermedad de neuronas motoras. Los kits que comprenden cebadores pueden incluir adicionalmente una enzima ADN polimerasa, tal como una ADN polimerasa termoestable, una enzima transcriptasa inversa, una mezcla de dNTP, un tampón concentrado para reacción en cadena de polimerasa y un tampón concentrado para transcripción inversa. Los agentes de detección pueden incluir análogos de nucleótidos y/o un resto de marcado, por ejemplo, restos detectables directamente tales como un fluoróforo (fluorocromo) o un isótopo radiactivo, o restos detectables indirectamente, tal como un miembro de un par de unión, tal como biotina, o una enzima capaz de catalizar una reacción colorimétrica o luminométrica no soluble. El kit también puede comprender al menos un gel prefabricado para realizar la RT-PCR. Además, el kit puede incluir adicionalmente al menos un envase que contiene reactivos para detectar ácidos nucleicos sometidos a electroforesis. Dicho reactivos incluyen los que directamente detectan ácidos nucleicos, tales como agentes de intercalado fluorescentes o reactivos de tinción de plata, o los reactivos dirigidos a la detección de ácidos nucleicos marcados, tales como, pero no limitados a, reactivos ECL. El kit incluye preferentemente un aviso asociado con el mismo en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de kits para diagnóstico. Con el kit también se pueden proporcionar instrucciones detalladas para uso, almacenamiento y resolución de problemas.

Tal como se ha mencionado, el diagnóstico de MND también se puede realizar mediante el análisis de una actividad de miARN-9 o miARN-9*.

Dado que los miARN son polinucleótidos que se unen a copias diana de una forma específica de secuencias, causando la destrucción de las mismas, es posible analizar una actividad de miARN-9 o miARN-9* mediante el análisis de una expresión de al menos una de sus copias diana. Una regulación de forma negativa de la actividad de miARN-9 debería conducir de forma inevitable a una regulación de forma positiva en la expresión de su copia diana.

En la técnica se conocen métodos para determinar dianas para miARN-9 o miARN-9*. Por ejemplo, diversas herramientas bioinformáticas están disponibles para analizar secuencias genéticas y determinar si comprenden sitios de unión a miARN (es decir, dianas).

Herramientas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a TargetScan [Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) *Cell* 120: 15-20; Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) *Cell* 115: 787-798] (<http://wwwdottargetscandotorg>) y PicTar [Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, y col. (2005) *Nat Genet* 37: 495-500] (<http://genomedotucscdotedu>).

Para asegurar que no se producen asignaciones de falsos positivos de miRs a dianas, las diana se pueden seleccionar basándose en la conservación evolutiva en al menos dos especies (por ejemplo, ser humano y ratón) o más.

Se pueden usar otros métodos para aumentar la precisión de los resultados obtenidos usando métodos

bioinformáticos, por ejemplo un análisis de tolerancia al ruido.

De acuerdo con una realización, la copia diana analizada no es una subunidad pesada de neurofilamentos (NFH).

- 5 Se observará que el análisis de una expresión de la copia diana se puede realizar en el ARN o en el nivel de proteínas.

Los niveles de expresión de proteínas se pueden determinar usando métodos conocidos en las técnicas.

- 10 **Ensayo de inmunabsorción unido a enzimas (ELISA):** Este método implica la fijación de una muestra (por ejemplo, células fijadas o una solución proteica) que contiene un sustrato de proteínas a una superficie tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Se aplica un anticuerpo específico de sustratos acoplado con una enzima y se permite que se una al sustrato. La presencia del anticuerpo se detecta a continuación y se cuantifica con una reacción colorimétrica que usa la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas usadas normalmente en este método incluyen peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Si está bien calibrada y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producido. Un sustrato convencional se usa generalmente para mejorar la precisión cuantitativa.
- 15

- 20 **Transferencia Western:** Este método implica la separación de un sustrato a partir de otra proteína por medio de un gel de acrilamida seguido de transferencia del sustrato a una membrana (por ejemplo, nylon o PVDF). La presencia del sustrato se detecta a continuación con anticuerpos específicos para el sustrato, que a su vez se detectan con reactivos de unión a anticuerpos. Los reactivos de unión anticuerpos pueden ser, por ejemplo, proteína A, u otros anticuerpos. Los reactivos de unión anticuerpos pueden estar radiomarcados o unidos a enzimas tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La detección puede ser por autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de sustrato como la determinación de su identidad mediante una posición relativa en la membrana que es indicativo de una distancia de migración en el gel de acrilamida gel durante la electroforesis.
- 25

- 30 **Radioinmunoensayo (RIA):** En una versión, este método implica la precipitación de la proteína deseada (*es decir*, el sustrato) con una proteína de unión a anticuerpos específicos y a anticuerpos radiomarcados (por ejemplo, proteína A marcada con I^{125}) inmovilizada en un vehículo precipitable tal como perlas de agarosa. El número de recuentos en el microgránulo precipitado es proporcional a la cantidad de sustrato.

- 35 En una versión alternativa del RIA, se usan un sustrato marcado y una proteína de unión a anticuerpos sin marcar. Una muestra que contiene una cantidad desconocida de sustrato se añade en cantidades variables. La disminución en los recuentos precipitados a partir del sustrato marcado es proporcional a la cantidad del sustrato en la muestra añadida.

- 40 **Separación de células activadas por fluorescencia (FACS):** Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células con anticuerpos específicos de sustratos. Los anticuerpos específicos de sustratos están unidos a fluoróforos. La detección se realiza por medio de una máquina de separación de células que lee la longitud de onda de la luz emitida desde cada célula a medida que pasa a través de un rayo de luz. Este método puede usar dos o más anticuerpos simultáneamente.

- 45 **Análisis inmunohistoquímico:** Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células fijadas con anticuerpos específicos de sustratos. Los anticuerpos específicos de sustratos pueden estar unidos a enzimas o unidos a fluoróforos. La detección se realiza con microscopía y evaluación subjetiva o automática. Si se usan anticuerpos unidos a enzimas, se puede requerir una reacción colorimétrica. Se observará que la que inmunohistoquímica amida va seguida de contratinción de los núcleos celulares usando por ejemplo tinción con Hematoxilina o con Giemsa.
- 50

- 55 **Ensayo de actividad in situ:** De acuerdo con este método, un sustrato cromogénico se aplica en las células que contienen una enzima activa y la enzima cataliza una reacción en la que el sustrato se descompone para producir un producto cromogénico visible con luz o con un microscopio de fluorescencia.

- 60 **Ensayos de actividad in vitro:** En estos métodos, la actividad de una enzima en particular se mide en una mezcla de proteínas extraídas de las células. La actividad se puede medir en un pocillo del espectrofotómetro usando métodos colorimétricos o se puede medir en un gel de acrilamida no desnaturizante (*es decir*, gel de actividad). Después de la electroforesis, el gel se empapa en una solución que contiene un sustrato y reactivos colorimétricos. La banda teñida resultante corresponde con la actividad enzimática de la proteína de interés. Si está bien calibrada y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de enzima presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producido. Un patrón de enzimas se usa generalmente para mejorar la precisión cuantitativa.

- 65 Tal como se ha mencionado, un diagnóstico para una MND se puede considerar positivo cuando existe una regulación negativa de miARN-9 o miARN-9*.

Por lo general, el nivel de miARN-9 o miARN-9* en las muestras de pacientes se compara el de al menos un individuo sano (es decir, un control sin MND). Una regulación negativa de al menos 1,5 vez es indicativa de una MND. De acuerdo con otra realización, una regulación negativa de al menos 2 veces es indicativa de una MND. Preferentemente, la muestra de control es del fluido biológico idéntico y proviene de un sujeto sano de la misma especie, edad, género y de la misma subpoblación (por ejemplo, fumador/no fumador). Como alternativa, los datos de control se pueden adquirir a partir de bases de datos y bibliografía. Se observará que la muestra de control también se puede adquirir a partir del sujeto enfermo en un punto temporal en particular, para analizar el avance de la enfermedad.

Después del análisis de actividad y/o expresión de miARN-9 o miARN-9*, los resultados se registran por lo general y el sujeto es informado. El diagnóstico se puede corroborar con otros medios que incluyen los que conforman los criterios de Escorial E1. Otros métodos de diagnóstico que se pueden usar en conjunto con el método de la presente invención son los que implican estimulación magnética transcranial (TMS). Este procedimiento no invasivo crea un pulso magnético dentro del cerebro que estimula la actividad motora en un área determinada del cuerpo. Electrodo pegados a diferentes áreas del cuerpo recogen y registran la actividad eléctrica en los músculos.

Se observará que el método de diagnóstico de la presente invención también se puede demostrar con otros ensayos para descartar la participación de otras enfermedades o para medir el grado de afectación muscular. A continuación aparece una lista de dichos ensayos:

1. Se usa electromiografía (EMG) para diagnosticar disfunción muscular y nerviosa y enfermedad de la médula espinal. También se usa para medir la velocidad a la que viajan los impulsos a lo largo de un nervio en particular. La EMG registrar la actividad eléctrica desde el cerebro y/o médula espinal hasta una raíz nerviosa periférica (encontrada en los brazos y piernas) que controla los músculos durante la contracción y en reposo. Electrodo de cables muy fino se insertan uno cada vez en un músculo para evaluar cambios en el voltaje eléctrico que se producen durante el movimiento y cuando el músculo está en reposo. Los electrodos están unidos a un instrumento de registro. El ensayo normalmente dura aproximadamente una hora o más, dependiendo del número de músculos y nervios a someter a ensayo.

2. La EMG se realiza normalmente en conjunto con un estudio de velocidad de la conducción nerviosa. Este procedimiento también mide la energía eléctrica para someter a ensayo la capacidad del nervio para enviar una señal. Un técnico coloca dos conjuntos de electrodos planos en la piel sobre los músculos. El primer conjunto de electrodos se usa para enviar pulsos pequeños de electricidad (similares a una sacudida de electricidad estática) para estimular el nervio que se dirige a un músculo en particular. El segundo conjunto de electrodos transmite la señal eléctrica de respuesta a una máquina de registro. El médico revisa a continuación la respuesta para verificar cualquier daño nervioso o enfermedad muscular.

3. Ensayos de identificación sistemática en laboratorio de sangre, orina, u otras sustancias pueden descartar enfermedades musculares y otros trastornos que pueden tener síntomas similares a los de las MND. Por ejemplo, el análisis del fluido que rodea al cerebro y la médula espinal puede detectar un número de trastornos, que incluyen PPS. Análisis de sangre se pueden ordenar para medir los niveles de la proteína creatina quinasa (que se necesita para las reacciones químicas que producen energía para contracciones musculares); altos niveles pueden ayudar a diagnosticar enfermedades musculares tales como distrofia muscular.

4. La formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) usa ondas de radio generadas por ordenador y un campo magnético potente para producir imágenes detalladas de estructuras corporales que incluyen tejidos, órganos, huesos, y nervios. Estas imágenes pueden ayudar a diagnosticar tumores cerebrales y de médula espinal, enfermedades oculares, inflamación, infección, e irregularidades vasculares que puede llevar a apoplejía. MRI también puede detectar y controlar trastornos degenerativos tales como esclerosis múltiple y puede documentar lesión cerebral por traumatismo. MRI a menudo se usa para descartar enfermedades distintas de las MND que afectan a la cabeza, cuello, y médula espinal.

5. La biopsia muscular o nerviosa puede ayudar a confirmar enfermedad nerviosa y regeneración nerviosa. Una pequeña muestra del músculo o nervio se retira con anestesia local y se estudia al microscopio. La muestra se puede retirar quirúrgicamente, a través de una hendidura hecha en la piel, o por biopsia con aguja, en la que se inserta una aguja hueca fina a través de la piel y en el músculo. Una pequeña pieza de músculo permanece en la aguja hueca cuando se retira del cuerpo. Aunque este ensayo puede proporcionar información valiosa sobre el alcance de la lesión, es un procedimiento invasivo que puede causar por sí mismo efectos secundarios neuropáticos. Muchos expertos no creen que una biopsia sea necesaria siempre para el diagnóstico.

Dado que los presentes inventores mostraron que miARN-9 y 9* están regulados de forma negativa en modelos de ratón con MND, los presentes inventores también proponen que estos miARN se pueden usar para tratar dichas enfermedades.

Los micro-ARN se procesan a partir de pre-miR (precursores de pre-micro-ARN). Los pre-miR son un conjunto de moléculas de ARN precursoras transcritas mediante a ARN polimerasa III que se procesan de forma eficaz en miARN funcionales, por ejemplo, después de la transfección en células cultivadas. Por consiguiente, un pre-miR se puede usar para provocar la actividad específica de miARN en tipos celulares que normalmente no expresan este

miARN, respondiendo de este modo a la función de su diana mediante la regulación negativa de su expresión en un experimento de "ganancia de función (miARN)". Existen diseños de pre-miR para todos los miARN conocidos indicados en el Registro de miARN y se pueden diseñar fácilmente para cualquier investigación cualquier.

5 Los pre-miARN de origen natural se generan a partir de copias primarias más largas (pri-miARN - número de registro en la base de miR = MI0000466; MI0000467; MI0000468) con una ribonucleasa, por ejemplo, Drosha.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "pri-miARN" se refiere a precursores de ARN de los pre-miARN, por ejemplo, precursores de ARN que contienen miARN y se extienden con Drosha. Por consiguiente, la presente invención también contempla la regulación positiva de una función y/o actividad de miARN-9 o miARN-9* mediante la administración del pri-miARN-9.

15 Como alternativa, agentes capaces de regular de forma positiva la función y/o actividad de miARN pueden ser los miARN por sí mismos - es decir miARN 9 y/o 9*.

20 El término "polinucleótido" se refiere a un oligómero o polímero monocatenario o bicatenario de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye polinucleótidos y/o oligonucleótidos derivados de moléculas de ácidos nucleicos de origen natural (por ejemplo, ARN o ADN), moléculas sintéticas de polinucleótidos y/o oligonucleótidos compuestas por bases de origen natural, azúcares, y uniones covalentes entre nucleósidos (por ejemplo, estructura principal), así como polinucleótidos y/o oligonucleótidos sintéticos que tienen partes de origen no natural, que funcionan de forma similar con respecto a las partes de origen natural.

25 Los polinucleótidos (incluyendo oligonucleótidos) diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación que comprenden la presente invención se pueden generar de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, incluyendo tanto síntesis enzimáticas como síntesis en fase sólida. El equipo y los reactivos para ejecutar síntesis en fase sólida están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Applied Biosystems. También se puede usar cualquier otro método para dichas síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos estarían dentro de las capacidades de un experto en la materia y se puede realizar mediante metodologías establecidas como se detalla en, por ejemplo: Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. y col., eds. (1994, 1989), "Current Protocols in Molecular Biology," Volúmenes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular Cloning," John Wiley & Sons, Nueva York; y Gait, M. J., ed. (1984), "Oligonucleotide Synthesis"; usando química en fase sólida, por ejemplo fosforamidita de cianoetilo seguido de desprotección, desalinización, y purificación, por ejemplo, por un método sobre tritilo automatizado o HPLC.

35 El polinucleótido de la presente invención se puede modificar usando diversos métodos conocidos en la técnica. Sin embargo, se toman medidas para asegurar que se mantiene la función de miR.

40 Por ejemplo, los oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención pueden comprender nucleósidos heterocíclicos que consisten en purinas y las bases de pirimidinas, unidas en una unión en fosfodiéster en la posición 3' a 5'.

45 Los oligonucleótidos o polinucleótidos usados preferentemente son los modificados en la estructura principal, uniones entre nucleósidos, o bases, tal como se describe ampliamente en lo sucesivo en el presente documento.

50 Ejemplos específicos de oligonucleótidos o polinucleótidos preferentes útiles de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o uniones entre nucleósidos no naturales. Oligonucleótidos o polinucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen los que mantienen un átomo de fósforo en la estructura principal, tal como se desvela en las Patentes de Estados Unidos: N° 4.469.863; N° 4.476.301; N° 5.023.243; N° 5.177.196; N° 5.188.897; N° 5.264.423; N° 5.276.019; N° 5.278.302; N° 5.286.717; N° 5.321.131; N° 5.399.676; N° 5.405.939; N° 5.453.496; N° 5.455.233; N° 5.466.677; N° 5.476.925; N° 5.519.126; N° 5.536.821; N° 5.541.306; N° 5.550.111; N° 5.563.253; N° 5.571.799; N° 5.587.361; y N° 5.625.050.

55 Estructuras principales de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados preferentes incluyen, por ejemplo: fosforotioatos; fosforotioatos quirales; fosforoditioatos; fosfotriésteres; fosfotriésteres de aminoalquilo; fosfonatos de metilo y otros alquilos, que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales; fosfinatos; fosforamidatos, que incluyen fosforamidato de 3'-amino y aminoalquilfosforamidatos; tionofosforamidatos; tionoalquilfosfonatos; tionoalquilfosfotriésteres; y boranofosfatos que tienen uniones normales en la posición 3'-5', análogos de éstos unidos en la posición 2'-5', y los que tienen polaridad invertida en la que los padres adyacentes de unidades de nucleósidos están unidas en las posiciones 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se pueden usar diversas sales, sales mixtas, y formas de ácido libre de las modificaciones anteriores.

65 Como alternativa, estructuras principales de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras principales que están formadas con uniones entre nucleósidos de

alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y uniones entre nucleósidos de alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Éstos incluyen los que tienen enlaces de morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido, y sulfona; estructuras principales de formaceto y tioformaceto; estructuras principales de metileno formaceto y tioformaceto; estructuras principales de que contienen alquenos; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenoimino y metilenohidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂, tal como se desvela en las Patentes de Estados Unidos: N° 5.034.506; N° 5.166.315; N° 5.185.444; N° 5.214.134; N° 5.216.141; N° 5.235.033; N° 5.264.562; N° 5.264.564; N° 5.405.938; N° 5.434.257; N° 5.466.677; N° 5.470.967; N° 5.489.677; N° 5.541.307; N° 5.561.225; N° 5.596.086; N° 5.602.240; N° 5.610.289; N° 5.602.240; N° 5.608.046; N° 5.610.289; N° 5.618.704; N° 5.623.070; N° 5.663.312; N° 5.633.360; N° 5.677.437; y N° 5.677.439.

Otros oligonucleótidos o polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación que comprende la invención son los modificados en azúcares como en la unión entre nucleósidos, es decir, la estructura principal de las unidades de nucleótidos se reemplaza con grupos nuevos. Las unidades base se mantienen para complementar con la diana de polinucleótidos apropiada. Un ejemplo de dicho mimético de oligonucleótido incluye un ácido nucleico peptídico (PNA). Un oligonucleótido PNA se refiere a un oligonucleótido en el que la estructura principal de azúcar está reemplazada con una estructura principal que contiene amida, en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Las bases se retienen y están unidas directa o indirectamente a aza-átomos de nitrógeno de la parte amida de la estructura principal. Las patentes de Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de Estados Unidos N° 5.539.082; N° 5.714.331; y N° 5.719.262; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Otras modificaciones en la estructura principal que se pueden en la presente invención se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 6.303.374.

Oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente divulgación que comprenden la invención también pueden incluir modificaciones sustituciones en bases. Tal como se usa en el presente documento, bases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C), y uracilo (U). Bases "modificadas" incluyen, pero no se limitan a, otras bases sintéticas y naturales, tales como: 5-metilcitosina (5-me-C); 5-hidroximetil citosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; 2-tiouracilo, 2-tiotimina, y 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil uracilo y citosina; 6-azo uracilo, citosina, y timina; 5-uracilo (pseudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo, y otras adeninas sustituidas en la posición 8 y guaninas; 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo, y otros uracilos sustituidos a la posición 5 y citosinas; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-desazaguanina y 7-desazaadenina; y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Bases modificadas adicionales incluyen las que se desvelan en: Patente de Estados Unidos N° 3.687.808; Kroschwitz, J. I., ed. (1990), "The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering," páginas 858-859, John Wiley & Sons; Englisch y col. (1991), "Angewandte Chemie," Edición Internacional, 30, 613; y Sanghvi, Y. S., "Antisense Research and Applications," capítulo 15, páginas 289-302, S. T. Crooke y B. Lebleu, eds., CRC Press, 1993. Dichas bases modificadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstos incluyen pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas, y purinas N-2, N-6, y O-6-sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones con 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico a 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S. y col. (1993), "Antisense Research and Applications," páginas 276-278, CRC Press, Boca Raton), y actualmente son sustituciones básicas preferentes, incluso más particularmente cuando se combinan con creaciones de azúcar con 2'-O-metoxietilo.

Se observará que una molécula de ARN también se puede generar usando técnicas recombinantes.

Para expresar un polinucleótido exógeno (*es decir*, para producir una molécula de ARN), una secuencia de ácidos nucleicos que codifican al polinucleótido de la presente divulgación (por ejemplo, SEC ID N°s: 1, 3, 5, 6 o 7) está ligada preferentemente en un constructo de ácido nucleico. Dicho constructo de ácido nucleico incluye una secuencia promotora para dirigir la transcripción de una secuencia de polinucleótidos en la célula de una forma constitutiva o inducible.

Promotores constitutivos adecuados para su uso con la presente divulgación son secuencias promotoras que son activas en la mayoría de las condiciones ambientales y en la mayoría de tipos de células tales como el citomegalovirus (CMV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Promotores inducibles adecuados para su uso con la presente invención incluyen por ejemplo el promotor inducible con tetraciclinas (Zabala M, y col., Cancer Res. 2004, 64 (8): 2799-804).

El constructo de ácido nucleico (también denominado en el presente documento como "vector de expresión") de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariontas, eucariotas, o preferentemente ambos (por ejemplo, vectores lanzadera). Además, los vectores de clonación habituales también pueden contener una secuencia de iniciación de transcripción y de traducción, terminador de transcripción y traducción y una señal de poliadenilación.

Los promotores eucariotas contienen por lo general dos tipos de secuencias de reconocimiento, la caja TATA y elementos promotores secuencia arriba. Se cree que la caja TATA, localizada 25-30 pares de bases secuencia arriba del sitio de inicio de la transcripción, está implicada en la dirección de la ARN polimerasa para iniciar la síntesis de ARN. Los otros elementos promotores secuencia arriba determinan la velocidad a la que se inicia la transcripción.

Preferentemente, el promotor usado por el constructo de ácido nucleico de la presente divulgación es activo en la población celular específica transformada. Ejemplos de promotores específicos de tipo celular y/o específicos de tejidos incluyen promotores tales como albúmina que es específica de hígado [Pinkert y col., (1987) Genes Dev. 1: 268-277], promotores específicos linfoides [Calame y col., (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275]; en particular promotores de receptores de linfocitos T [Winoto y col., (1989) EMBO J. 8: 729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji y col. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos de neuronas tal como el promotor de neurofilamentos [Byrne y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch y col. (1985) Science 230: 912-916] o promotores específicos de glándulas mamarias tal como el promotor de suero de leche (Patente de Estados Unidos N° 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea N° 264.166).

Se pueden usar diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente divulgación en células. Dichos métodos se describen generalmente en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang y col., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega y col., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa y col. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.464.764 y N° 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

La introducción de ácidos nucleicos mediante infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como lipofección y electroporación, dado que se puede obtener eficacia de transfección más elevada debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

Los miARN de este aspecto de la presente divulgación (o los vectores de expresión que codifican a los mismos) se pueden administrar al paciente *per se* o como parte de una composición farmacéutica, en la que se mezclan con vehículos o excipientes adecuados.

Tal como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos que se describen en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere a los miARN que se pueden tener en cuenta para el efecto biológico.

En lo sucesivo en el presente documento, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pueden usar de forma intercambiable para hacer referencia a un vehículo o a un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y que no anula la actividad ni las propiedades biológicas del compuesto administrado. En estas expresiones está incluido un adyuvante.

En lo sucesivo en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Ejemplos de excipientes, sin limitación, incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramuscular, subcutánea y por vía intramedular así como as intratecal, intraventricular directa, intracardiaca, por ejemplo, inyecciones en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraocular.

Enfoques convencionales para administración de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad para una molécula de la superficie celular endotelial en combinación con un agente que por sí mismo es incapaz de cruzar la BBB) en un intento de explotar una de las vías de transporte endógeno del BBB;

5 estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad lipídica de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua a vehículos lípidos o de colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de la BBB por interrupción hiperosmótica (que resulta de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados con un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación inherente en los sistemas de transporte endógenos, efectos secundarios biológicos potencialmente indeseables asociados con la administración sistémica de una molécula química compuesta de un motivo vehículo que podría ser activo fuera del SNC, y el posible riesgo de daño cerebral dentro de regiones del cerebro en las que se interrumpe la BBB, lo que hace que sea un método de administración subóptimo.

10 Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.

15 El término "tejido" se refiere a parte de un organismo que consiste en un agregado de células que tienen una estructura similar y/o una función común. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral y tejido muscular.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden preparar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, y solución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización.

25 Composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden formular por lo tanto de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración.

30 Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosal, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

35 Para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente mediante la combinación de los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por parte de un paciente. Se pueden preparar preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, goma de agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato sódico.

45 Se proporcionan núcleos de gragea con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los revestimientos de comprimidos o grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

50 Composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas con gelatina así como cápsulas cerradas herméticamente, blandas hechas con gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener a los principios activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral se deberían presentar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

60 Para la administración bucal, las composiciones puedan adquirir la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de una manera convencional.

65 Para la administración por inhalación nasal, los principios activos para su uso de acuerdo con la presente divulgación se administran de forma conveniente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de un envase presurizado o de un nebulizador con el uso de un agente propulsor adecuado, por ejemplo,

diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para su uso en un dosificador se pueden formular para que contengan una mezcla de polvos del compuesto y una base adecuada en polvo tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica que se describe en el presente documento se puede formular para administración parenteral, por ejemplo, por inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación individual, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes para la formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersión.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los principios activos se pueden preparar en forma de suspensiones apropiadas para inyección a base de aceite o de agua. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución a base de agua sin pirógenos, estéril, antes de su uso.

La composición farmacéutica de la presente divulgación también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases convencionales para supositorios tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente divulgación incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de principios activos (miARN) eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una MND (por ejemplo, ELA) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la vista de la divulgación detallada que se proporciona en el presente documento.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la divulgación, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos in vitro y de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos que se describen en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales in vitro, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos in vitro y de cultivo celular y estudios animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación usada y de la vía de administración usada. La formulación, vía de administración y dosificación exactas las puede elegir el médico individual en vista de la afección del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl, y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1, p.1).

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles del principio activo que son suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración mínima eficaz, MEC). La MEC variada para cada preparación, pero se puede estimar a partir de datos in vitro. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones en plasma.

Dependiendo de la gravedad y de la respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser una sola o una pluralidad de administraciones, con un transcurso del tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se produce la curación o se consigue la disminución del estado de enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc.

Las composiciones de la presente divulgación, si se desea, se pueden presentar en un envase o en un dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación individual que contienen al principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, la mina de metal o de plástico, tal como

un envase de de tipo blíster. El envase o el dispositivo dosificador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración. El envase dosificador también puede llevar incluida una notificación asociada con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la comercialización de agentes farmacéuticos, cuya notificación refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma administración de las composiciones o en seres humanos o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede presentar un etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de Estados Unidos para fármacos con receta o un prospecto del producto aprobado. También se pueden preparar las composiciones que comprenden una preparación de divulgación formulada en un vehículo farmacéutico compatible, colocar en un envase apropiado, y marcar para el tratamiento de una afección indicada, tal como se ha detallado anteriormente de forma adicional.

Los miARN se pueden administrar solos o en conjunto con otros métodos de conocidos tratamiento. Por lo tanto, por ejemplo, los miARN de este aspecto de la presente divulgación se pueden administrar junto con Riluzol para el tratamiento de ELA.

Dado que las MND se han correlacionado con una disminución en la actividad y/o expresión de miARN-9 y/o miARN-9*, los presentes inventores proponen que la identificación de los agentes candidatos para el tratamiento de una MND se puede hacer basándose en su capacidad para regular de forma positiva miARN-9 y/o miARN-9*.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para identificar un agente para el tratamiento de una MND, método que comprende:

- (a) poner en contacto una neurona motora con un agente candidato;
- (b) evaluar la actividad que la expresión de miR-9 o miR-9* en la neurona motora; y
- (c) comparar la actividad de expresión de la etapa (b) con una actividad expresión en ausencia del compuesto candidato, en la que una regulación positiva de la actividad expresión de miR-9 o miR-9* indica que el agente candidato es un agente terapéutico para el tratamiento de MND.

La neurona motora se puede aislar a partir de cualquier animal, incluyendo un ratón, una rata o un ser humano. Como alternativa, la neurona motora puede ser parte de una línea celular de neurona motora - tal como por ejemplo la línea celular de neurona motora de murino, NSC19 [Smirnova IV Spine (Phila Pa 1976). 1998 15 de enero; 23 (2): 151-8].

Además, como alternativa, la neurona motora se puede diferenciar a partir de una célula madre. De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, la célula madre es una célula madre embrionaria (ESC) aislada a partir de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sirven como modelos para las MND. Por ejemplo, se pueden aislar células madre embrionarias a partir de un ratón Tg(H1xb9-GFP)1Tmj Tg(SMN2)89Ahmb *Smn1^{tm1Msd}*/J (número de reserva de laboratorio de Jackson N° 006570). Como alternativa, se pueden aislar células madre embrionarias a partir de animales transgénicos, que comprenden una genosupresión de agentes colinérgicos de DICER. Este modelo para MND se describe adicionalmente a continuación en el presente documento.

Se conocen diversos métodos para diferenciación de células madre embrionarias en neuronas motoras, tales como por ejemplo los que se describen en Wichterle, H., y col., [Cell 110, 385-97 (2002)].

Agentes candidatos a modo de ejemplo incluyen agentes de moléculas pequeñas, agentes polinucleótidos, compuestos químicos, compuestos antibióticos conocidos porque modifican la expresión genética, polinucleótidos modificados o sin modificar (que incluyen oligonucleótidos), polipéptidos, péptidos, moléculas pequeñas de ARN y miARN.

Se observará que los métodos de puesta en contacto de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación por lo general dependen del tipo de agente candidato que se está sometiendo a ensayo. Por lo tanto, por ejemplo un agente polinucleótido por lo general se pone en contacto con la neurona motora junto con un agente de transfección. Un compuesto químico pequeño se coloca por lo general en el medio de cultivo de neuronas motoras sin agentes adicionales.

Para que se considere como un agente terapéutico, los agentes candidatos de la presente divulgación por lo general regulan de forma positiva una actividad o expresión de miR-9 o miR-9* en al menos 1,5 veces y más preferentemente en al menos 2 veces.

Después de la selección de un agente candidato como un agente terapéutico para el tratamiento de una MND, el agente se puede someter a ensayo - por ejemplo en un modelo animal para la enfermedad y por último el agente se puede someter a ensayo en seres humanos. La variación de la eficacia terapéutica después conducir a la preparación del agente candidato como una composición farmacéutica.

Tal como se ha mencionado, los presentes inventores han mostrado que animales transgénicos que comprenden una genosupresión específica de agentes colinérgicos de DICER pueden servir como modelos vivos para las MND ya que muestran, entre otros fenotipos relevantes, una atrofia muscular comparada con sus correspondientes

mamíferos de tipo silvestre.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un mamífero no humano transgénico, que comprende una genosupresión específica de agentes colinérgicos de DICER, en la que el mamífero presenta atrofia muscular en comparación con el mamífero de tipo silvestre.

Tal como se usa en el presente documento, el término "DICER" se refiere a una enzima endonucleasa capaz de escindir moléculas de ARN bicatenario, largas en fragmentos de 21-23 al este bases. Dicer se expresa desde el gen AF430845 en ratones chr12: 102, 185, 761-102, 246, 274).

Un "animan transgénico" representa a un animal no humano, preferentemente un mamífero elegido entre el grupo de los roedores y particularmente el ratón, rata, hámster y cobaya. El ratón es particularmente apreciado porque su sistema inmune se ha estudiado con detalle. Como alternativa, el animal transgénico se elige entre animales criados y particularmente entre porcinos, ovinos, caprinos, bovinos, equinos y particularmente caballos, y lagomorfos, particularmente conejos. El animal transgénico de acuerdo con la invención también se puede elegir entre primates, particularmente monos tales como el macaco, chimpancé y el babuino.

Los animales transgénicos de la presente invención se pueden clasificar como "genosuprimidos". Un "genosuprimido" tiene una alteración en el gen diana a través de la introducción de secuencias transgénicas que dan como resultado una disminución de la función del gen diana, preferentemente de modo que la expresión del gen diana es insignificante o indetectable.

De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, los animales transgénicos de la presente divulgación comprenden una supresión en al menos parte del gen DICER, de modo que la proteína codificada de ese modo, se convierte en no funcional. Ésto se puede conseguir a través de mutación aleatoria (aproximación de trampa de genes, mutagénesis química) o inserción dirigida (recombinación homóloga).

De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, la genosupresión está mediada por recombinación de Cre-loxP.

De acuerdo con este ejemplo, la preparación de mamíferos transgénicos que comprenden una genosupresión específica de agentes colinérgicos de DICER requiere la introducción de i) un polinucleótido que codifica Cre unido de forma operativa a un promotor específico de agentes colinérgicos y ii) un polinucleótido que codifica DICER flanqueado por sitios de lox-P en una célula sin diferenciar cell.

Por lo general, dicha célula es una célula madre embrionaria (ES). La célula ES transformada se inyecta en un embrión de mamífero, en el que se integrará en el embrión en desarrollo. El embrión se implanta con situación en una madre sustituta durante la duración de la gestación.

Las células madre embrionarias se seleccionan por lo general por su capacidad para integrarse en y formar parte de la línea germinal de un embrión en desarrollo con el fin de crear la transmisión de una línea germinal del constructo genético heterólogo. Por lo tanto, cualquier línea celular de ES que tenga esta capacidad es adecuada para su uso en el presente documento. Una cepa de ratón que se usa por lo general para la producción de células ES es la cepa 129J. Una línea celular de ES preferente es la línea celular de murino D3 (número de catálogo de la Colección Americana de Cultivos Tipo N° CRL 1934). Las células se cultivan y se preparan para la inserción de ADN usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como los que se exponen en Robertson (Robertson, In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., 1987.).

Ejemplos de promotores específicos colinérgicos incluyen, pero no se limitan al promotor del transportador de Acetil-Colina Vesicular.

Por lo general, los animales transgénicos generados de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación presentan síntomas de una MND. Dichos síntomas pueden incluir al menos uno de de los siguientes: esclerosis de las astas ventrales de la médula espinal, arquitectura anómala de placas terminales y atrofia muscular con signos de denervación.

Se observará que los animales transgénicos de este aspecto de la presente divulgación se pueden usar para someter a ensayo una eficacia de un agente candidato para el tratamiento de una MND. Después de la administración del agente candidato al ratón, se pueden realizar las funciones motoras del ratón. Si las funciones motoras mejoran, el agente candidato se puede seleccionar como un agente terapéutico y se puede preparar como composiciones farmacéuticas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados se refieren a

"que incluye pero no se limita a".

La expresión "que consiste en" se refiere a "que incluye y se limita a".

5 La expresión "que consiste básicamente en" se refiera que la composición, método o estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura que se reivindican.

10 Tal como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" pueden incluir una pluralidad de compuestos, que incluyen mezclas de los mismos.

15 A través de toda la presente solicitud, v se pueden presentar diversas realizaciones de la presente invención en forma de intervalos. Se debería entender que la descripción en forma de intervalos es simplemente por conveniencia y brevedad y no se debería interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debería considerar que la descripción del intervalo que tiene desvelados específicamente todos los subintervalos posibles así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debería considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene desvelados específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

20 Cada vez que se indica un intervalo numérico en el presente documento, se hace referencia a que incluye cualquier número mencionado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varían/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y " que varían/varía desde" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento de forma intercambiable y pretenden incluir el primer y el segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada que incluye, pero no se limita, esas formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, o desarrollados fácilmente a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir básicamente, disminuir o revertir el avance de una afección, mejorar básicamente síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir básicamente el aspecto de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

35 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se han expuesto anteriormente en el presente documento y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones que sigue a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

40 A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención.

45 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio usados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley y Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tal como se expone en las Patentes de Estados Unidos N° 4.666.828; N° 4.683.202; N° 4.801.531; N° 5.192.659 y N° 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen de extensamente en la patente y en bibliografía científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; N° 3.839.153; N° 3.850.752; N° 3.850.578; N° 3.853.987; N° 3.867.517; N° 3.879.262; N° 3.901.654; N° 3.935.074; N° 3.984.533; N° 3.996.345; N° 4.034.074; N° 4.098.876; N° 4.879.219; N° 5.011.771 y N° 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic

Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

Materiales y métodos generales

Animales: El gen Dicer se genosuprimió específicamente en MN postmitóticas mediante el cruce de un ratón que portaba un anhelo condicional de Dicer, a un transgén Cre-recombinasa, dirigido por un promotor específico de colinérgicos (transportador de Acetil-Colina Vesicular; VAcHT-Cre). Los ratones se mantuvieron en un ciclo de 12/12 h de luz/oscuridad, con alimento y agua a *voluntad*. Se controló la viabilidad de los ratones diariamente y se pesaron regularmente.

Exámenes de comportamiento

Campo abierto: La distancia total recorrida en un aparato en campo abierto consiste en una caja de Plexiglas iluminada con 120 lux de color blanco (50 x 50 x 22 cm) y el número de sucesos de cría se cuantificó a lo largo de un ensayo de cinco minutos para cada ratón individual, en tres sesiones de ensayos independientes durante la fase de oscuridad del ciclo de luz-oscuridad, con un sistema de seguimiento automatizado de vídeo (VideoMot2; TSE Systems, GmbH, Bad Homburg, Alemania). Por simplicidad, los datos se normalizaron a la media de las actuaciones de tipo silvestre por cada punto temporal. Sin embargo, se realizó un análisis estadístico sobre los datos antes de la normalización.

Ensayo de postes verticales: Los ratones se colocaron sobre un poste vertical de superficie rugosa (diámetro de 2 cm; altura de 40 cm) frente al borde superior. Se midió el tiempo necesario para girar hacia abajo y el tiempo necesario para bajar del poste. Se promediaron los datos a través de los tres ensayos por ratón por cada punto temporal.

Movimiento en la jaula de alojamiento: Los ratones se alojaron individualmente, y se examinó la actividad locomotora automáticamente durante un período de 48 horas usando el sistema InfraMot (TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Electromiografía: Los ratones se anestesiaron con ketamina/xylazina i.p., y se realizó EMG con aguja con un electrodo de agujas para EMG bipolar insertado en múltiples sitios en los músculos *interóseo* y *gastrocnemio* de las patas traseras. El registro se realizó con un aparato convencional para EMG (Medelec, GB). Para cada ratón, los hallazgos de EMG se clasificaron en una escala de 1-7 denominada "Índice de Patología por EMG" que refleja la intensidad y la frecuencia de los potenciales de fibrilación. Se procesaron capturas en pantalla representativas de trazas de EMG usando Photoshop (Adobe).

Preparación y tinción de tejidos: Los ratones se anestesiaron profundamente con hidrato de cloral (1,4 µg/g de peso corporal, i.p.) o Ketamina/xilacina (0,25 ml, i.p. al 10 %) y se procesaron directamente o se perfundieron por vía transcardial con 10 ml de PBS, seguido de 100 ml de paraformaldehído al 2,5 % (PFA). Los tejidos se equilibraron en una mezcla de PFA al 1,25 % y sacarosa al 15 % durante 24 horas. Secciones 'flotantes' de 20 µm coronales de médula espinal se recogieron y se almacenaron en PBS a 4 °C.

Para el análisis de pericarion lumbar, secciones de médula se tiñeron con violeta de cresilo y células grandes positivas para Nissl (diámetro mayor que ~20 µm) se contaron y se presentaron como el número medio por asta ventral. Cada sección de médula espinal lumbar L2-L3 en la 6ª vértebra se usó para el recuento (-15 secciones por animal).

Para detectar Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), secciones flotantes libres se incubaron previamente en solución de PBS que contenía suero de caballo normal al 20 % y Triton X-100 al 0,3 % durante 1 hora y se incubó durante una noche a temperatura ambiente con anti-GFAP de conejo policlonal (1:200, Dako). Anticuerpo conjugado con cianina2 (Cy2) altamente absorbido de forma cruzada frente a IgG de conejo (1:300, Jackson) se usó para la detección secundaria. Se usó software Image-Pro plus 4.1 para cuantificar la intensidad de GFAP en una región oval que incluye la parte lateral de cada asta ventral en 3 secciones lumbares L2 por ratón.

Procesamiento y análisis de raíz ventral y dorsal: Raíces ventrales y dorsales se diseccionaron a un nivel L5 con el ganglio de la raíz dorsal, fijado y embebido en parafina. La recuperación de antígenos de secciones rehidratadas de 3 µm se sumergieron en ácido cítrico y se calentaron el microondas durante 3 minutos. Los tejidos se bloquearon con suero de caballo normal al 20 % que contenía triton X-100 al 0,2 % durante 1,5 horas y se incubó durante una noche con subunidades de neurofilamentos anti-pesadas, medias o ligeras de conejo policlonal (1:200, Novus Biologicals) junto con MBP anti rata (1:50, Abcam). Las secciones se lavaron a continuación con PBS y se incubaron durante 45 minutos con anticuerpo secundario anti conejo conjugado con Cy3 y anticuerpo secundario anti rata conjugado con Cy2 (1:200, Jackson). Se recogieron imágenes digitales fluorescentes de 0,08 y 0,5 mm² de las raíces se recogieron en un microscopio E600 de Nikon (Nikon, Tokyo, Japón) equipado con objetivos Plan Fluor y conectados a una cámara CCD (DMX1200F, Nikon). La densidad media de la tinción de axones individuales y el número de axones en las raíces se analizaron usando software Image-Pro plus 4.1.

Análisis de unión muscular y neuromuscular: Músculos *gastrocnemio* medio y *tibial* anterior se sumergieron en bungarotoxina marcada con rodamina durante cinco minutos (Molecular Probes; 1:200 en PBS), y a continuación se diseccionaron. Los músculos diseccionados se aclararon con PBS, se fijaron en PFA-PBS al 1 % (pH 7,3) durante 1 hora y se equilibró en sacarosa al 30 %. Secciones congeladas de músculo con un espesor de 40 μ m se incubaron durante una noche en anticuerpos policlonales de conejo criado frente a neurofilamentos (Novus) o sinaptofisina (Dako). Anti conejo conjugado con Cy2 (1:200, Jackson) se usó para la detección secundaria.

Para el análisis de fibras angulares, secciones embebidas en parafina de los músculos *gastrocnemio medio* y *tibial anterior* se tiñeron con Hematoxilina y Eosina.

Diferenciación de neuronas motoras y micromatriz de miARN: Células madre embrionarias de ratón (mESCs) de un ratón Tg (H1xb9-GFP)1Tmj Tg(SMN2)89Ahmb *Smn1*^{tm1Msd}/J (número de reserva de laboratorio de Jackson N^o 006570), se diferenciaron en neuronas motoras tal como se ha descrito anteriormente [Wichterle, H., y col., Cell 110, 385-97 (2002)]. Después de la disociación de cuerpos embrionarios, neuronas motoras GFP⁺ se purificaron a través de un clasificador de células a alta velocidad MoFlo (Beckman Coulter) usando una boquilla de 100 μ m a 30 psi (207 kPa). Las neuronas motoras se sembraron en portaobjetos revestidos con poli-d-lisina y laminina (BioCoat Cellware) y se colocaron en pocillos frente a una monocapa de células astrogiales primarias de ratón para proporcionar soporte trófico.

El ARN total de neuronas motoras se extrajo usando Reactivo TRI (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó usando el bioanalizador Agilent 2100. Muestras independientes de ARN de SMN1^{mut} y controles se marcaron con un kit de marcado con Hy3/Hy5 miRCURY (Exiqon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar la polarización asociada con el tinte, el diseño experimental implicó el movimiento alternativo de la marca de colorante en la mitad de las muestras. La hibridación sobre un portaobjetos de micromatriz LNA miRCURY (Exiqon) fue seguido de barrido en un escáner de micromatriz de ADN Agilent (Agilent Technologies). Después del barrido de las micromatrices, los datos de intensidad sin procesar se extrajeron usando un Lector de Aplicaciones Puntuales (Niles Scientific).

Análisis de expresión de qRT-PCR de miARN: La expresión cuantitativa de miARN en neuronas motoras derivadas se adquirió y se analizó usando un Sistema de PCR en Tiempo Real LightCycler 480 de Roche (Roche Applied Science). Ensayos de micro-ARN Taqman para miR-9 y miR-9* (Applied Biosystems), se realizaron tal como se ha descrito anteriormente [Chen y col., Nucleic Acids Res 33, e179 (2005)]. El sno234 de ARN pequeño se usó como control interno.

Clonación de las UTR en la posición 3' de subunidades de neurofilamentos y Onecut2: Secuencias de UTR en la posición 3' de NFH (SEC ID N^o: 8), NFM (SEC ID N^o: 9), NFL (SEC ID N^o: 10) y Onecut2 (SEC ID N^o: 11) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de ratón. La secuencia mutada de la UTR en la posición 3' de NFH, que carecía de todas las secuencias de base de miR-9, se sintetizó con salientes de XbaI y se insertó en plásmido PBluscript (Epoch Biolabs) (SEC ID N^o: 12).

Fragmentos de UTR en la posición 3' se ligaron en vector fácil pGem-T (promega) de acuerdo con las directrices del fabricante, y se subclonaron adicionalmente en el sitio XbaI en el extremo 3' de la luciferasa en el vector de destino de control de pGL3 (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y por secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa: Células HEK 293T se cultivaron en poli-1-lisina en formato de 24 pocillos con una confluencia de un 70-85 % y se transfectaron usando Polietilenimina con los siguientes plásmidos: 20 ng de plásmido beta-galactosidasa, 10 ng de plásmido de UTR en la posición 3' de control de pGL3 y 430 ng de plásmidos de sobreexpresión de miR-9 o miR-vec vacío. Los datos a partir del ensayo de luciferasa de Luciérnaga (Promega) realizados 48 horas después de la transfección, se normalizaron con niveles de beta galactosidasa y se promediaron a través de repeticiones en seis pocillos por afección.

Análisis estadístico: Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (SE). Se usó ensayo de t de Student - para la comparación de los grupos. Las estadísticas se realizaron usando software SPSS (SPSS Inc., Chicago). Para datos de matriz de miARN, el análisis se realizó usando el paquete Limma del proyecto Bioconductor (<http://www.dotbioconductor.org>). La normalización con LOESS se aplicó dentro de matrices y la normalización con Aquantile entre matrices. Se realizó control de calidad convencional usando las funciones de representación de Limma.

Ejemplo 1

La pérdida de actividad de miARN en el MNDicer^{mut} causa disfunción cinética progresiva

Para evaluar la implicación de miARN en patologías de neuronas motoras (MN), los presentes inventores extirparon específicamente Dicer1 en las MN postnatales, postmitóticas, cruzando un alelo condicional de Dicer1 con un

transgén Cre-recombinasa, dirigido por un promotor específico de colinérgicos que se expresa en las MN postmitóticas pero que no se desarrolla en ellas (Transportador de Acetil-Colina Vesicular; VAcHT-Cre). Como la actividad de Dicer es necesaria para el procesamiento de miARN *in vivo*, VAcHT-Cre; animales $Dicer^{flx/flx}$ (también denominados a continuación "MNDicer^{mut}") pierden la capacidad de hacer miARN funcionales en un subconjunto de MN somáticas postmitóticas y por lo tanto proporcionan un modelo convincente para la pérdida de función de miARN en las MN.

Mientras que VAcHT-Cre; animales heterocigotos $Dicer^{flx/+}$ ("controles") son aparentemente normales, ratones MNDicer^{mut} presentan una esperanza de vida significativamente más corta y una pérdida de peso progresiva (Figuras 1A-B). Para comprender mejor la patología de estos ratones, se realizó una amplia serie de ensayos funcionales para evaluar su actividad genética. Desde la edad de dos meses, los ratones MNDicer^{mut} fueron inferiores a los controles en un 'ensayo de poste vertical' (Figura 1C). El ensayo en 'campo abierto' controlado por vídeo desveló que los ratones MNDicer^{mut} recorrían progresivamente distancias más cortas y tenían menos crías que los controles (Figuras 1D-E). Además, un estudio en la jaula de alojamiento a través del ciclo circadiano, usando el sistema *InfraMot*, indicó que la actividad locomotora de MNDicer^{mut} se deteriora gradualmente en comparación con los controles (Figuras 1F-H). Se puede hacer la hipótesis de que este deterioro aparente en la fuerza física es probablemente la consecuencia de atrofia muscular.

Ejemplo 2

Los MNDicer^{mut} presentan atrofia muscular por denervación

Para caracterizar directamente el fenotipo muscular, se realizó un estudio electromiográfico (EMG), que mostró potenciales de fibrilación frecuentes. Estos datos son coherentes con un proceso de denervación continuo, que probablemente subyace a la atrofia muscular (Figuras 2A-B). MNDicer^{mut} también presentan miofibras angulares en la histología muscular, un signo patognomónico de atrofia muscular relacionada con la denervación (Figura 2C) y temblor que también se puede atribuir a la denervación (no se muestran los datos). En conjunto, se puede concluir que los animales MNDicer^{mut} padecen atrofia muscular por denervación, que sugiere pérdida de las MN.

Ejemplo 3

Se pierden neuronas motoras en los MNDicer^{mut}

Una disminución en grandes números de pericarion (> 20 μm de diámetro) en el asta ventral de la médula espinal lumbar (tinción con Nissl, Figuras 3A-C) se observó con histología de médula espinal. La inmunoreactividad negativa tanto para TUNEL como para caspasa-3 activada (no se muestran los datos), es coherente con un perfil habitual de muerte lenta de las MN, encontrada en muchas enfermedades de neuronas motoras (MND). La astrocitosis reactiva se toma a menudo como una indicación de toxicidad neuronal o de muerte neuronal, por lo tanto los niveles de expresión de proteínas ácidas fibrilares gliales (GFAP) se cuantificaron en secciones de médula espinal lumbares. Se observó inmunoreactividad potenciada de GFAP en el aspecto latero-ventral de las secciones de médula espinal lumbar de MNDicer^{mut}, lo que implica astrocitosis reactiva y lo que apoya adicionalmente la pérdida de MN (Figuras 3D-F).

Ejemplo 4

Signos de axonopatía con "degeneración retrógrada" en los MNDicer^{mut}

La disfunción y/o degeneración de la unión neuromuscular (NMJ) acompaña o incluso precede a la pérdida de cuerpos de neuronas motoras en unos pocos modelos de ELA. Por lo tanto, los presentes inventores procedieron a evaluar defectos axonales distales potenciales en los MNDicer^{mut}. A la edad de cuatro meses, la arquitectura de placas terminales anómalas era dos veces tan frecuente en las uniones neuromusculares del músculo *Tibial* en ratones MNDicer^{mut} con respecto a los controles (Figura 3G-M). Estos datos implican que la disfunción de neuronas motoras se puede documentar en axones vivos de ratones MNDicer^{mut}, de forma similar a la patofisiología de "degeneración retrógrada" que se ha observado anteriormente en otros modelos de MND. Esto es interesante, porque se sabe que los miARN tienen función perisináptica, distal, lo que sugiere que una neuropatía de inicio temprano, relacionada con miARN, puede preceder a la muerte pericarial en el modelo de Dicer. Por consiguiente, se evaluó una población discreta de axones motores proximales en la raíz ventral, antes de que se unan mediante axones sensoriales. Los ratones MNDicer^{mut} presentaron una disminución significativa de los axones de MN en comparación con los controles, mientras que los axones sensoriales de la raíz dorsal permanecieron intactos (Figuras 3N-P).

Ejemplo 5

MNDicer^{mut} no consigue coordinar la estequiometría de subunidades de neurofilamentos

La desregulación de la expresión coordinada de las subunidades de neurofilamentos (NF) ligeros, medios y pesados

(NEFL, NEFM, NEFH, respectivamente), provocar efectos en el citoesqueleto axonal. Por ejemplo, mutaciones en NEFL causan neuropatía motora de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2E. Además, la perturbación experimental de equilibrio de neurofilamentos finos en modelos de ratón, conduce a fenotípicos que se asemejan muy de cerca a patologías de neuronas motoras humanas y anteriormente se sugirió como un componente de ELA humana.

Más específicamente, la regulación postranscripcional de la expresión genética de neurofilamentos desempeñó papel fundamental en el bienestar neuronal y la supresión de la cola de NEFH fue sugerida como un componente de esclerosis lateral amiotrófica.

La expresión de NF está regulada con la región sin traducir de la posición 3' (UTR 3') del mRNA, que parece que interactúan con un factor de actuación *trans* sin caracterizar que está atenuado en ELA [Ge y col., J Biol Chem 278, 26558-63 (2003)]. Se analizaron niveles de expresión relativa en las proteínas de la subunidad NF en ratones MNDicer^{mut} y controles de hermanos. La cuantificación de la señal inmunofluorescente de NF en aproximadamente dos mil axones lumbares, reveló que los niveles de expresión de NEFL y NEFM, eran comparables con el tipo silvestre. Sin embargo, la expresión de la subunidad pesada (NEFH) está específicamente regula de forma positiva en los MNDicer^{mut} (Figuras 4A-C).

Ejemplo 6

La expresión coordinada de las subunidades de neurofilamentos se consigue con miR-9

Para evaluar la posibilidad de una implicación de miARN en la regulación positiva de NEFH en los ratones MNDicer^{mut}, se buscaron secuencias de NF para sitios de unión potencial a miARN. Se encontró un solo sitio de unión a en el mRNA de NEFL. Como contraste, el mRNA de NEFH alojan nueve sitios de unión a miR-9, dispersado sobre las UTR en la posición 3' de mRNA de NEFH y la parte 3' de la región de codificación (Figura 4D). Es importante destacar que los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la interacción de miR-9 con sus sitios potenciales de dianas afecta al mRNA de NEFH en un ensayo de indicador heterólogo y que esto depende de la presencia de los sitios de unión de base (Figura 4E). Estos datos sugieren fuertemente un modelo en el que la pérdida de expresión o actividad de miR-9 puede dar como resultado desregulación de NEFH y posteriormente una desregulación de la estequiometría de NF.

Ejemplo 7

miR-9 está regulado específicamente de forma negativa en un modelo de atrofia muscular espinal

Para relacionar estos resultados con la patogénesis observada en otros modelos de MND, los niveles de expresión miARN se perfilaron en un modelo de atrofia muscular espinal (SMA), una MND pediátrica causada por mutaciones en el gen SMN1. En particular, la desregulación de la expresión de neurofilamentos, que recuerda a los observados en el modelo de Dicer1 se informó en mutantes SMN1 y SMN1 se compromete funcionalmente en complejos de miARN-proteína en células humanas. Células madre embrionarias que albergan una mutación SMN1 en neuronas motoras se diferenciaron in vitro en neuronas motoras. A continuación, una micromatriz de miARN (LNA oligo platform, Exiqon) se identificó sistemáticamente con ARN marcado extraído de MN de SMN1^{mut} purificadas con FACS. La comparación directa de ARN de MN de tipo silvestre y SMN1^{mut} reveló que la expresión solamente de unos pocos miARN disminuye significativamente en las MN de SMN1^{mut}. Curiosamente, los miARN regulados de forma negativa más significativamente resultaron ser miR-9 y miR-9* (Figura 4F). Estos dos miARN se procesan a partir de la misma horquilla, y la cuantificación de qPCR reventó una disminución de hasta 15 veces en sus niveles de expresión en MN de SMN1^{mut} (Figura 4G).

En conjunto, los presentes inventores presentan un modelo nuevo para MND, basándose en la pérdida de función de Dicer1. En este modelo, la pérdida específica de MN de actividad de miARN da como resultado atrofia muscular por denervación. Además, cambios en los niveles de expresión de las unidades de neurofilamentos contribuyen probablemente con la enfermedad. Este fenotipo está atribuido a la desregulación de miR-9, que reside secuencia arriba de los mRNA de neurofilamentos. La importancia de miR-9 en las raíces de las MND a partir de su expresión específica en neuronas es su increíble regulación negativa en neuronas motoras deficientes en SMN1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yeda Research And Development Co. Ltd.
Hornstein, Eran
Chen, Alon
Haramati, Sharon
Chapnik, Elik

<120> MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE NEURONAS MOTORAS

<130> 47663
 <150> US 61/193.535
 5 <151> 05-12-2008
 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> miARN-9
 20 <400> 1
 ucuuuugguuu ucuagcugua uga 23
 <210> 2
 <211> 22
 <212> ARN
 25 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> miARN-9*
 30 <400> 2
 auaaagcuag auaaccgaaa gu 22
 <210> 3
 35 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Sonda de oligonucleótidos que detecta miARN-9 ilustrativa
 <400> 3
 tcatacagct agataaccaa aga 23
 45 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótidos que detecta miARN-9* ilustrativa
 <400> 4
 55 actttcggtt atctagcttt at 22
 <210> 5
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

ES 2 442 168 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <223> horquilla de precursor de hsa-mir-9-1
 5
 <400> 5

 cggggguggu ugnuaucuuu ggnuaucuaq cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60
 cubgauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

 10
 <210> 6
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> horquilla de precursor de hsa-mir-9-2

 <400> 6
 20

 ggaagcgagu ugnuaucuuu ggnuaucuaq cuguaugagu gnauuugguu ucauaaagcu 60
 agauaaccga aaguaaaaac uccuua 87

 <210> 7
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> horquilla de precursor de hsa-mir-9-3
 30
 <400> 7

 ggagggcccg uucucucuuu ggnuaucuaq cuguaugagu gccacagagc cgucauaaag 60
 cuagauaacc gaaaguagaa augauucua 90

 35
 <210> 8
 <211> 1206
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> UTR 3' de NFH clonada

 <400> 8
 45

ES 2 442 168 T3

ccctctagag gaggtaaaag ccaagaacc cccaagaag gtagaagaag agaagacact 60
gcctacacca aagacagag cyagagagag taagaagac gaagctccca aggaggcccc 120
gaagcccaag gtggaggaga agaaggaaac tcccacggaa aagcccaag actctacagc 180
agaagccaag aaggaagagg ctggagagaa gaagaaagcc gtggcctcag aggaggagac 240
tcttgccaag ttgggtgtga aggaagagc taaacccaaa gagaagacag agacaaccaa 300
gacagaagca gaagacacca aggccaaaga acctagcaa cccacagaga cggaaaagcc 360
aaagaaagag gagatgccag cggcaccaga gaagaaagac accaaggagg agaagaccac 420
agagtccagg aagcctgagg agaagcccaa aatggaggcc aaggtcaagg aggatgcaa 480
gagcctttcc aaagagccta gcaaacccaa gacagaaaag gctgaaaat cctctagcac 540
agaccagaaa gaaagccagc ccccagagaa gaccacagag gacaaggcca ccaagggaga 600

gaagtaagag aacaagagaa acaccagaa tagccaaga aactcaggac ggtcccagta 660
ctcaggggtc ggcgtaataa attttatttc ttcctttccc tccgtaagaa gaaacactgc 720
ttagatggtg ggcctgccct caccaaacag gaatttctat taagattaag ttagcaagag 780
aagataaacc tggccttgt ccccacgcc gaaaaccctc cccaggtgat ggacaattat 840
gatagcttct ttagccgaa cgtgatgtat gctgaacgct acgcgtaaaa caegcgtcta 900
aaaaactgcc cctcctttcc aagtaagtgc atttatttcc tgtatgtcca actgacagat 960
gaccgcaata atgaatgagc agttagaaac gcattatgct tgaatggtg taacctattc 1020
ctgaatgcct tcttgttttc caaaggagtg gtcaggccct tgcccagtac acgctcctgg 1080
aagagctgca gcaggtgagg cagggcgctg gccactgaac cagccagggy tgaactctcc 1140
actgaagtcc actttcaatt gcttccatgc aataaaacca agtgcttctg aataaatct 1200
agaggg 1206

<210> 9
<211> 509
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> UTR 3' de NFM clonada

10

<400> 9

ccctctagaa tggagtcag ttgcaaaag ttaagccata cgacaatttc aaaatgcatg 60
tgattgacag cttcaaaaca gaatgggttc tcccagggg gctccagaca ttgtattttc 120
ctttgtgcaa tatgaggaa ctgcatgcaa gctcaggggtg cccccctcct cagtccttgg 180
ggggaattca aatgcatgat cgtgtatgta cctagggaa tgcagagttt cctgagctgt 240
tggaaagagg gcaactgggg gggatgtctt gagatgtatt atgcagagta ccaactgagc 300
caaaaataat aagtgaaca gaactotctt agccttaaga aagctatata tgaatactta 360
cgtttacctc actggtgcat ttanaatgga cttctgttca tgggagaacc ttgtgatctt 420
gcacagttcg caacctatc ttgatcgatg taaaatgtca cagcagtcct tgctcaataa 480
aggtcactact ggaacataa tctagaggg 509

15

<210> 10
<211> 347

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>UTR 3' de NFL 3'

5

<400> 10

```

ccctctagaa gaagaaagat tgagccctat tcccaactat tccaggaaaa gttctcecca      60
atcagggtcaa cctcatcacc aaccaaccag ttgagttcca gatcctatac aaattaagaa      120
gtcaatacat gtataattct gagatgactt aggttggact ttcaatggtg tgetatgaat      180
ttctctctta cgcagagtat ctgtttgctt gcagagtggc ttcttggtt gctgccagcc      240
tgtgcattgt ccatgcttat gagttcagga tctatggcaa tgtgaatcac acagatgttt      300
acaataataa taaaaaaaaa accacacaca caacacgac tagaggg                          347
    
```

10

<210> 11
 <211> 1238
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> UTR 3' de Onecut2 clonada

<400> 11

```

ccctctagac caaagaagca gaatactgca aaccaagac atttgttacc tgccattttc      60
tagcctacaa atactgtgat tacttttaga gatcagagca cctctgtaac tccgagtggc      120
attcggctct tgtcttgggc tcaccacctg gctgagcaga ccagctacat caatgacatt      180
agccaaatat ccgggcagtg acttcgccc gcccagccctg gttggtcacc ttccatagc      240
aagtgaaga gggcccacag aactctggga gattacaaag gtcactatgt gcatatttac      300
cagtgaatgg ccccaggtag gcaccaaggg gtgttcggag caagcaaaa gcttcgatga      360
ctctttacag acaactgaga ctgacttttg tatgaattgc ttaattgaaa ccaagaaac      420
ttttttctg cacctacttc tgcaacaaac agaactgtcc cattgaaatga gtaaatggtt      480
ccaccaatca ctggaaatca ccatcaacag aaaaagcacy ctagaatgaa agaacaaca      540
aaaccaccga agacacactg tgttcaaca gaccttttg gacgctctta ttttttatt      600
ttttttttt tggaaagcaga tttgaaagaa aggttgaga cacaaatcaa cagacgagcc      660
tcaatggctg ctgcttcata tgacaactca ctcggtaatc ttaacgttga agattgtctt      720
taatttgtgc ctatgcagtt ttcaaaaga acatggaaac agagcaacag aaacctcaac      780
agctacaata ccaaaagtga ggattctcac acctttttgt ctcagttcat taccttctt      840
tgcttgctta aaatacttat agcgtcattg atctgtacaa aggtaatcga ttttgttct      900
ttaagcaaca aaaggaaagg gtcatttgtt tgattttatt gtttcccttt agttttgtt      960
tatggctttt acccaacatg gaatctccc cctacacata aagttccatg gactccaac      1020
ttgagatgtc gggatactga aagggtgcc tttctctct cagcagagca tgggaaatc      1080
gattgtcgtc tgaatgtctg tggcttaacc cttagacttg gttgcttctg tgttcagtgt      1140
tgtcattagg ggagggaaag ggagcaagga tcaggggtag gagtctaggt gatccgccct      1200
ttccagaacc aaagaattta tagagaaatt cttagaggg                          1238
    
```

20

ES 2 442 168 T3

5 <210> 12
 <211> 600
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> vector de clonación pBluescript

10 <400> 12

```

gaatatctag agagaacaag agaaacaccc agaatagaac tcaggacggt cccagtactc      60
aggggtcggc gtaataaatt ttatttcttc ctttccctcc gtaagaagaa acactgetta      120
gatggtgggc ctgcctcac caaacaggaa tttctattaa gattaagtta gcaagagaag      180
ataaccctga gccttgtccc ccaogccgaa aaccctcccc aggtgatgga caattatgat      240
agcttcttgt agcogaacgt gatgtatgct gaacgctacg cgtaaaacac gcgtctaaaa      300
actgccccct cctttccaag taagtgcatt tatttctgt atgtccaact gacagatgac      360
cgcaataatg aatgagcagt tagaaacgca ttatgcttga aatgttgtaa cctattcctg      420

aatgccttct tgttttgagt ggtcaggccc ttgccagta cacgctcctg gaagagetgc      480
agcaggtgag gcagggcgt gccactgaa ccacgccagg gtgtactctc cactgaagtc      540
cactttcaat tgcttccatg caataaaacc aagtgttctt gaaataaatc tagaaaacac      600
  
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar una enfermedad de neuronas motoras (MND), comprendiendo el método analizar una actividad o una expresión de miARN-9 o miARN-9* en una muestra de un sujeto humano que lo necesita, en el que una regulación negativa de dicha actividad o dicha expresión de dicho miARN-9 o miARN-9* es indicativa de la MND.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho análisis de dicha actividad o expresión de dicho miARN-9 o miARN-9* se realiza usando una sonda de oligonucleótidos que tiene una secuencia de ácidos nucleicos tal como se expone en SEC ID N°: 3 o 4.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la MND se selecciona entre el grupo que consiste en Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, parálisis pseudobulbar, parálisis bulbar progresiva, enfermedad de neuronas motoras inferiores y atrofia muscular espinal.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra comprende una muestra de líquido cerebroespinal (CSF).
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra comprende una muestra de sangre.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la MND es ELA.

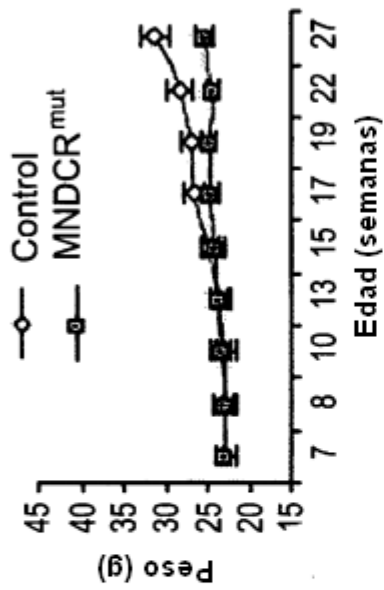


FIG. 1B

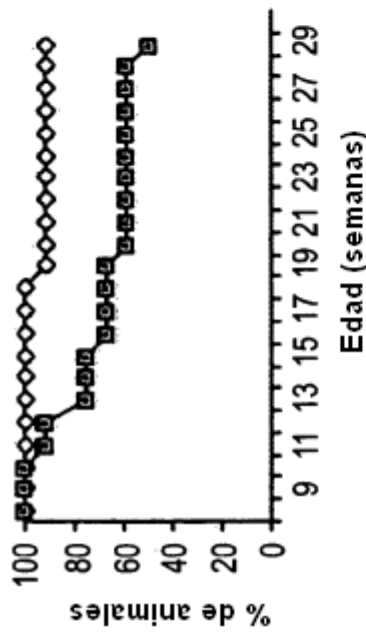


FIG. 1A

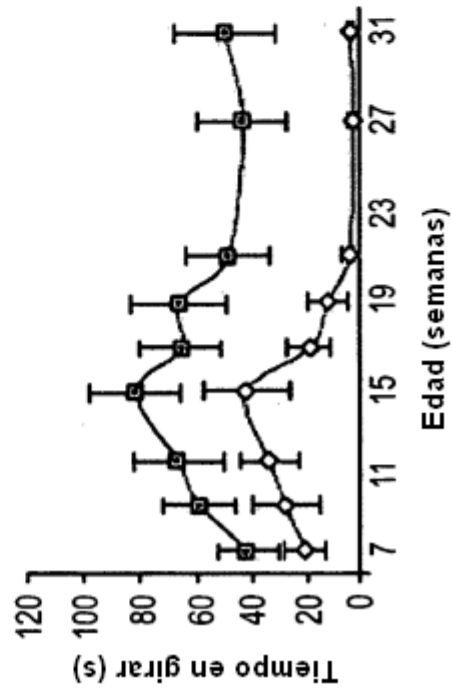


FIG. 1C

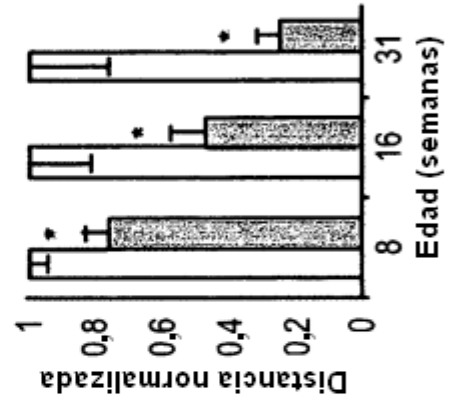


FIG. 1D

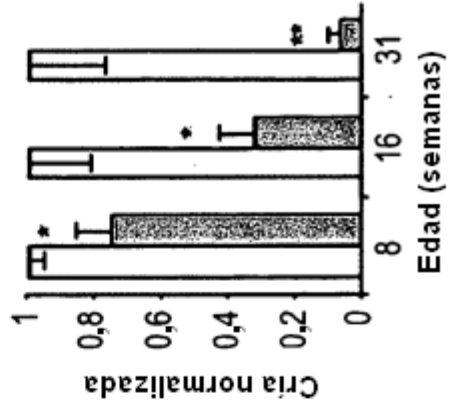


FIG. 1E

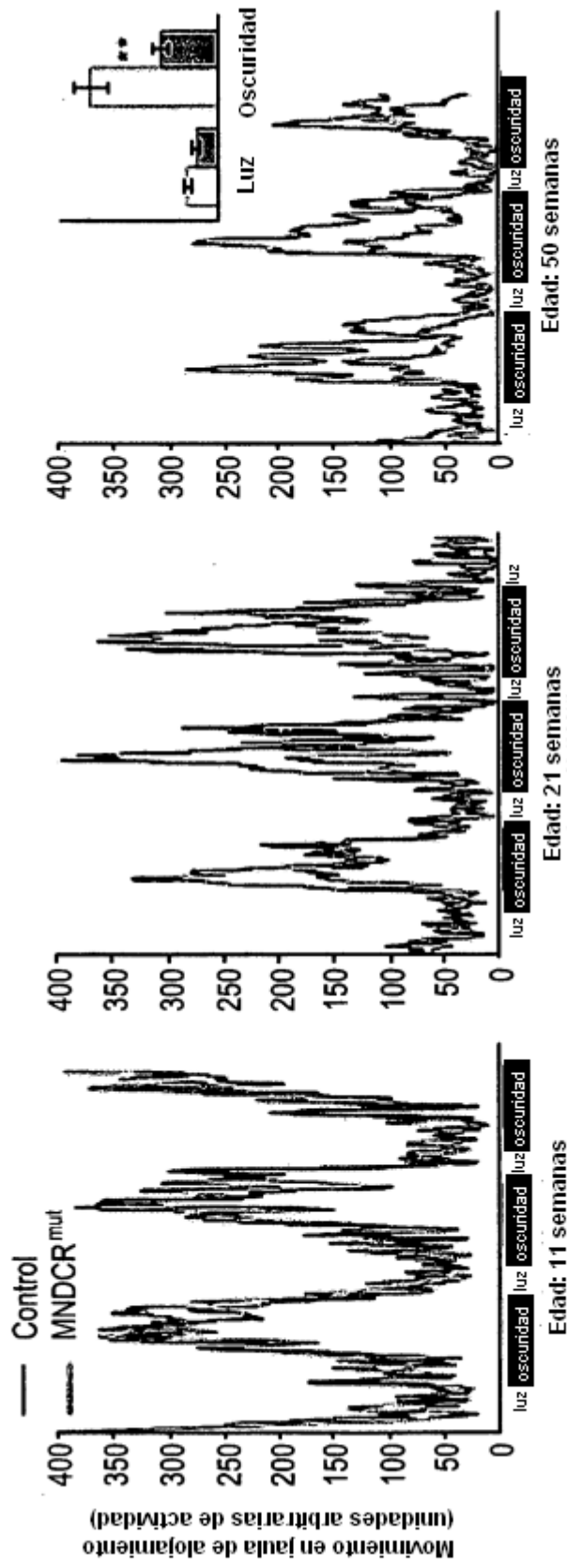


FIG. 1H

FIG. 1G

FIG. 1F

FIG. 2A



FIG. 2B

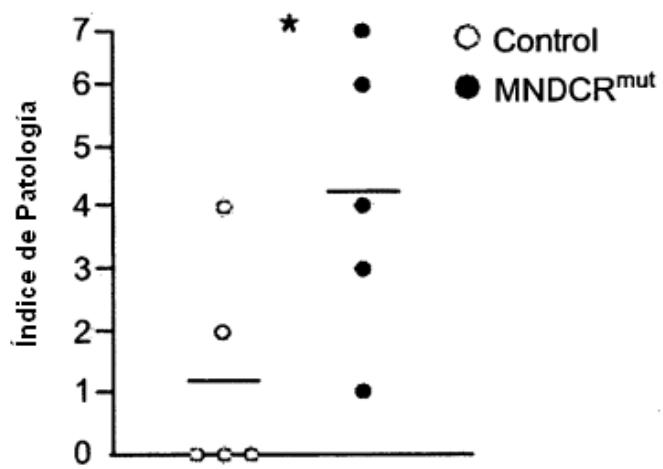
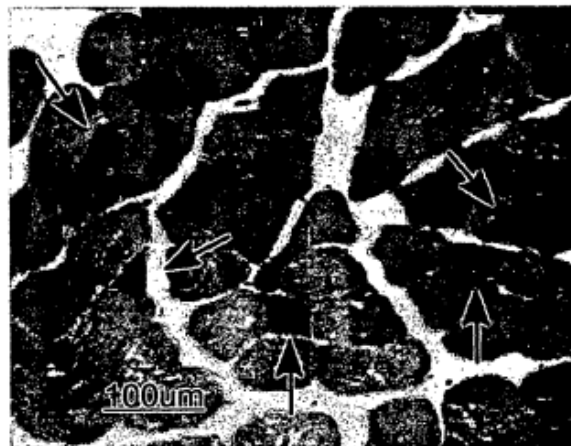


FIG. 2C



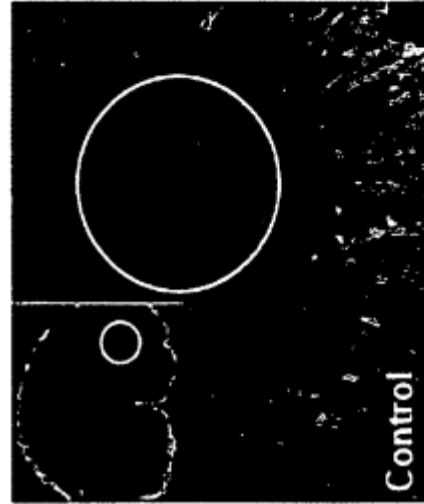
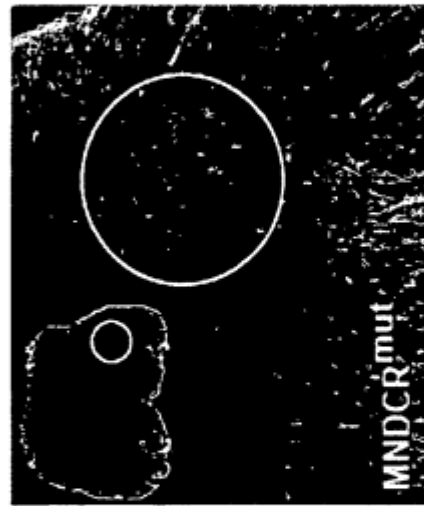
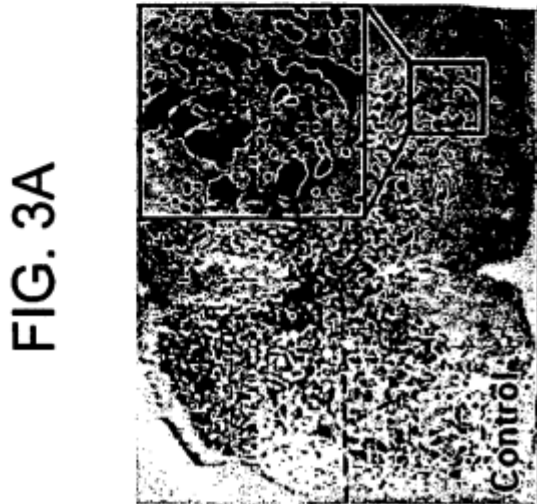
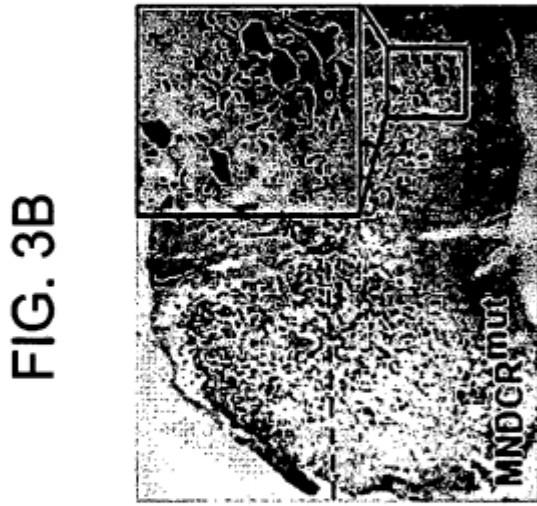
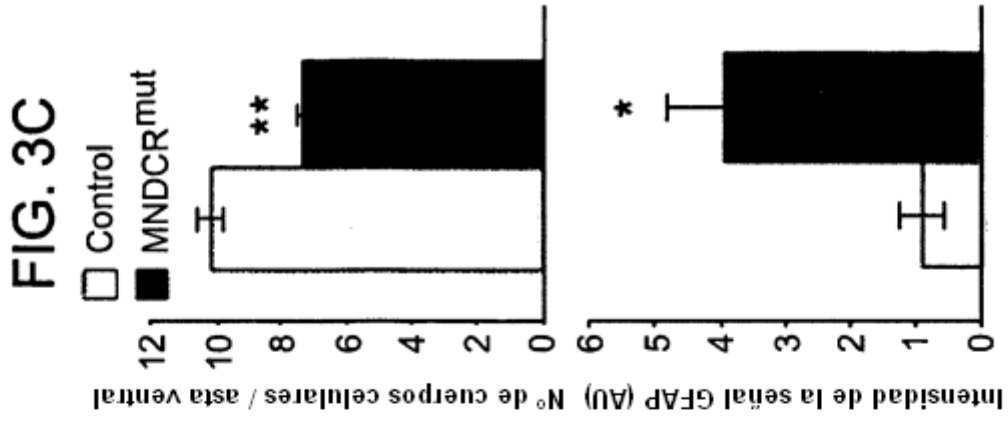


FIG. 3F

FIG. 3E

FIG. 3D



FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 3I

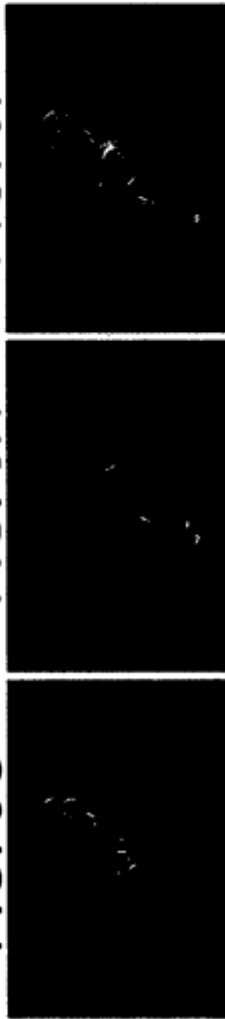


FIG. 3J

FIG. 3K

FIG. 3L

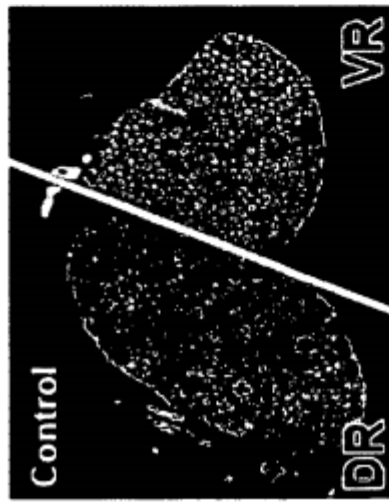


FIG. 3N

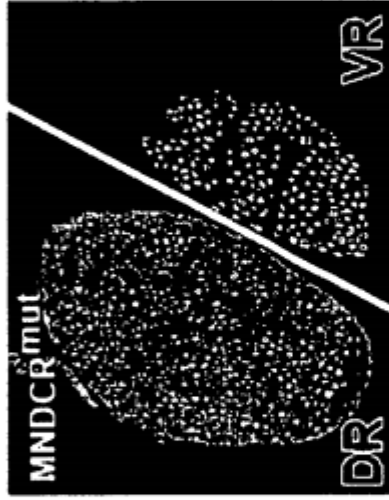


FIG. 3O

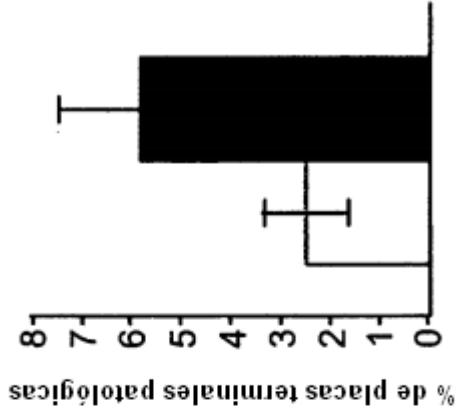


FIG. 3M

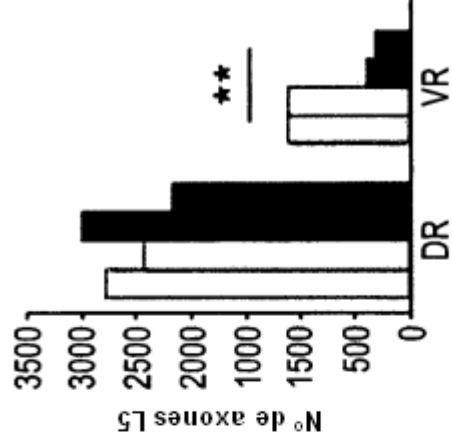


FIG. 3P

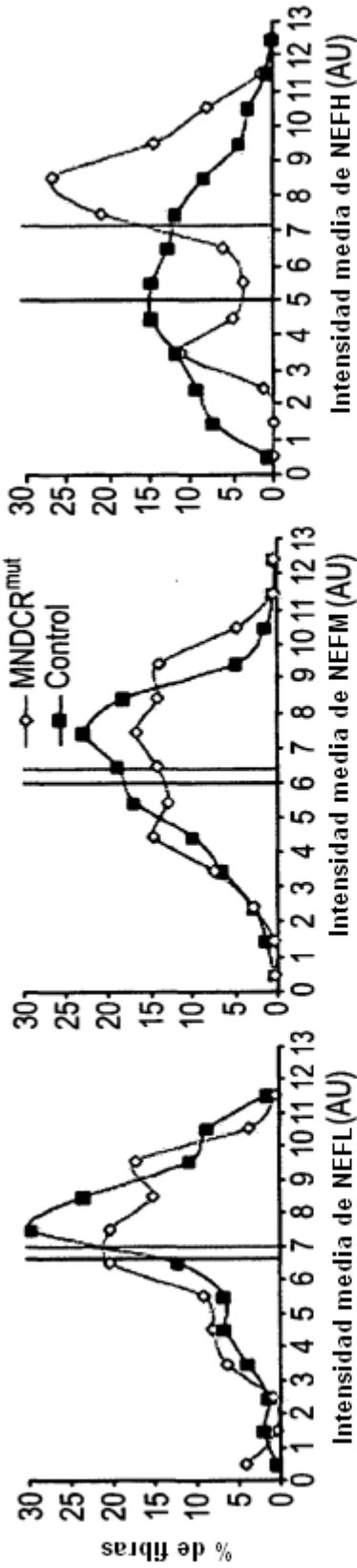


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

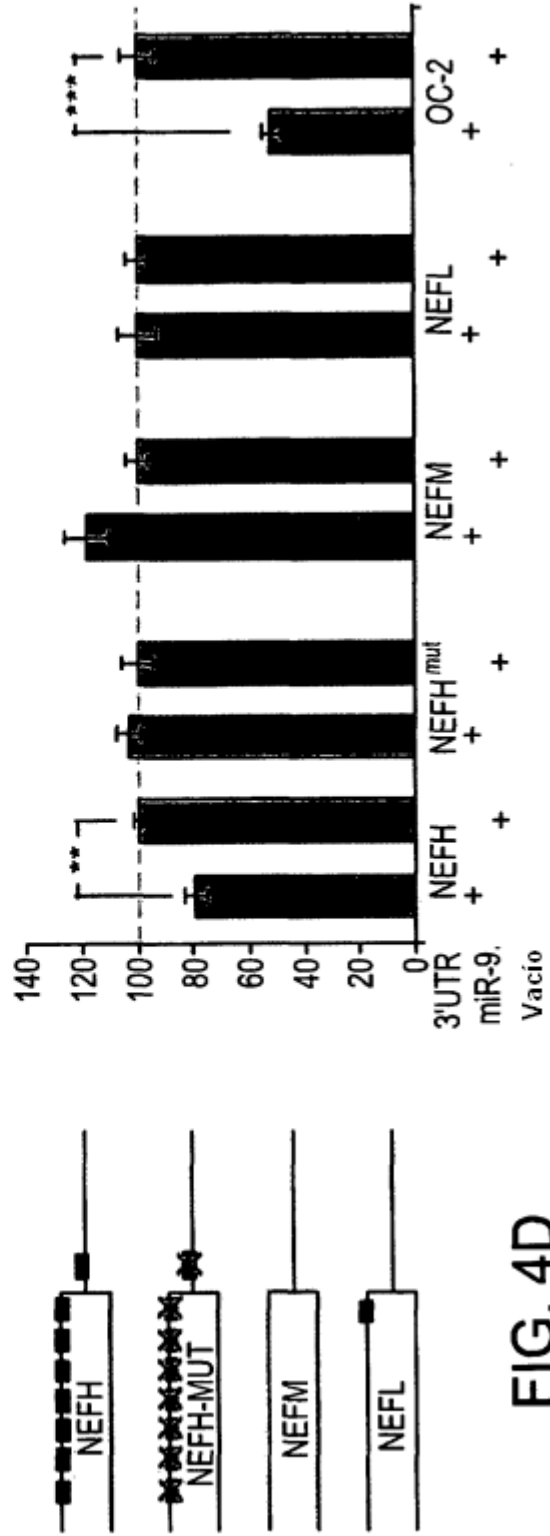


FIG. 4D

FIG. 4E

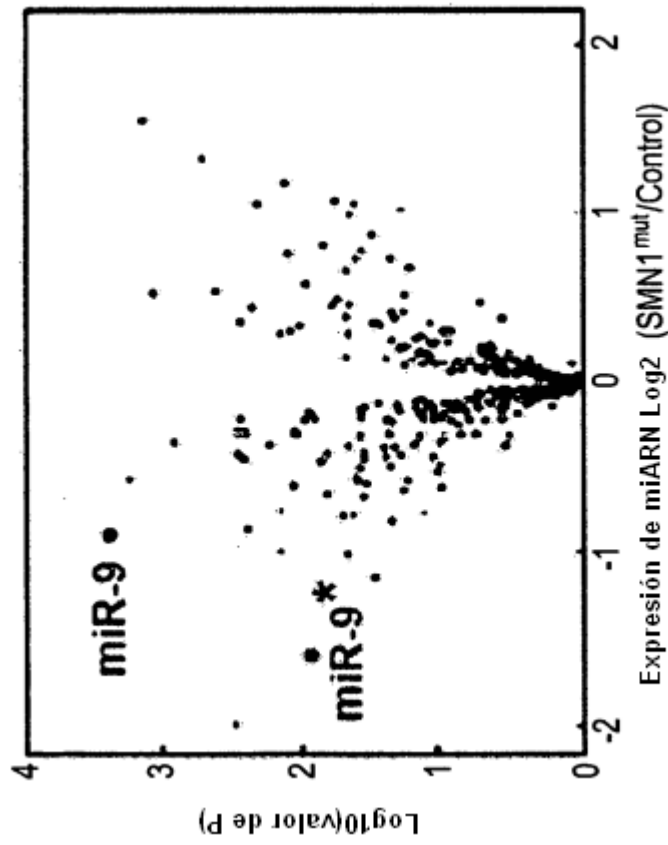


FIG. 4F

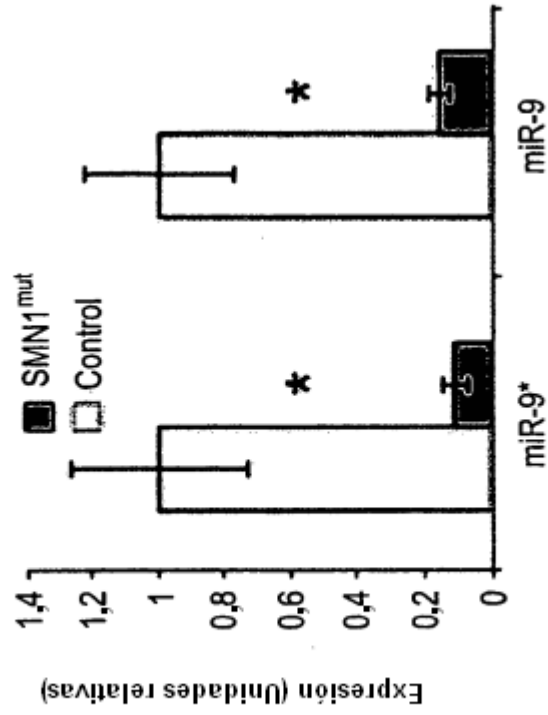


FIG. 4G