

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 765**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2009** **E 13169606 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2633854**

54 Título: **miRNA-9 o miRNA-9* para uso en el tratamiento de ELA**

30 Prioridad:

05.12.2008 US 193535 P

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

23.12.2015

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:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 554 765 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

miRNA-9 o miRNA-9* para uso en el tratamiento de ELA

5 Campo y antecedentes de la invención

La divulgación, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades de las neuronas motoras y, es decir, de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

10 Las enfermedades de las neuronas motoras (ENM) pertenecen a un grupo de trastornos neurológicos atribuidos a la destrucción de las neuronas motoras del sistema nervioso central y a cambios degenerativos en la ruta de las neuronas motoras. Dichas enfermedades son diferentes de otras enfermedades neurodegenerativas provocadas por la destrucción de neuronas que no son las neuronas motoras, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la atrofia olivopontocerebelosa, etc.. De forma típica, las ENM son trastornos progresivos degenerativos que afectan nervios en la parte superior o inferior del cuerpo. En general, las ENM aparecen en la edad madura. Los síntomas pueden incluir dificultad al tragar, debilidad de las extremidades, dificultad en el habla, dificultad para andar, debilidad facial y calambres musculares. En las últimas etapas de estas enfermedades puede verse afectada la respiración. La causa (o causas) de la mayoría de las ENM se desconoce, pero se sospecha de factores ambientales, tóxicos, virales o genéticos.

20 Las neuronas motoras, incluyendo 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 encefálico y la médula espinal, y están implicadas en el control de las neuronas motoras inferiores. Las neuronas motoras inferiores se localizan en el tronco encefálico y en la médula espinal y envían fibras a los músculos. Las enfermedades de neuronas motoras inferiores son enfermedades que implican la degeneración de las neuronas motoras inferiores. Cuando una neurona motora inferior se degenera, las fibras musculares que esta habitualmente activa se desconectan y no se contraen, provocando debilidad muscular y reflejos disminuidos. La pérdida de cualquier tipo de neuronas da como resultado debilidad, atrofia muscular (debilitamiento) y debilidad indolora, que son las características distintivas de las ENM.

30 La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad de neuronas motoras fatal, caracterizada por una pérdida de células piramidales en la corteza cerebral motora (es decir, células de Betz gigantes), de neuronas motoras medulares anteriores y de neuronas motoras del tronco encefálico, y la degeneración de las mismas en células piramidales. La ELA muestra, desde un aspecto clínico, signos de neuronas motoras superiores y de neuronas motoras inferiores, y muestra un deterioro clínico rápido después del inicio de la enfermedad, conduciendo por lo tanto a la muerte dentro de unos pocos años.

40 Como muchas otras enfermedades de neuronas motoras, solo un pequeño porcentaje (aproximadamente 10 %-15 %) de la ELA es hereditaria. La epidemiología genética de la ELA ha revelado al menos seis localizaciones cromosómicas responsables de la heredabilidad de la enfermedad (ELA1 a ELA6). Se han identificado entre estas tres genes. El primero se identificó en 1993 como el gen de la superóxido dismutasa Cu/Zn citosólica (SOD-1), que es responsable del 20 % de la forma autosómica dominante de la ELA (Rosen *et al.*, 1993, Nature, 1993 Mar 4;362 (6415):59-62). El descubrimiento de esta causa genética principal de la ELA ha proporcionado una base para la generación de modelos de ratón para esta enfermedad. Estos modelos son útiles para probar terapias que podrían ayudar en el tratamiento de la ELA.

50 El segundo se nombró como Alsina, un factor potencial de intercambio guanina-nucleótido (FIG), responsable de la forma recesiva juvenil de la ELA. El tercero es ELA4, que codifica una proteína que contiene un dominio helicasa ADN/ARN llamada Senataxina, identificada como ligada a la forma autosómica dominante de la ELA juvenil. Más recientemente, se informó que una mutación en la proteína de membrana asociada a vesícula/proteína B de membrana asociada a sinaptobrevina (PBAV), en un locus nuevo llamado ELA8, está asociada con una forma atípica de la ELA.

55 La única droga aprobada en los Estados Unidos y Japón para la ELA es Riluzole. Riluzole se desarrolló originalmente como un anticonvulsivo que inhibe la liberación de glutamato, y se ha informado en varios ensayos clínicos que muestra solo una eficacia ligera en la supervivencia de pacientes de 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 miRNA) son moléculas de ARN de de 20 a 24 nucleótidos (nt), miembros de la familia de los ARN pequeños no codificantes. Los micro-ARN se identificaron en mamíferos, gusanos, moscas de la fruta y plantas, y se cree que regulan la estabilidad de sus transcritos de ARN mensajeros (ARNm) diana de una manera específica de tejido y de célula. De forma principal, los micro-ARN regulan la estabilidad del ARN mediante la unión a la región 3' no traducida (3' UTR) del ARNm diana y, por lo tanto, por la supresión de la traducción o, de manera semejante a los ARNip, uniéndose a, y destruyendo, transcritos diana de una manera dependiente de secuencia.

65

Se encontró que los micro-ARN están implicados en diversas rutas de diferenciación celular. Por ejemplo, se encontró que miR-181 se expresa de forma preferencial en las células linfoides B y que su expresión ectópica en células madre hematopoyéticas/progenitoras conducía *in vitro* e *in vivo* a una fracción aumentada de células del linaje B. Además, miR-23 mostró estar presente en células NT2 progenitoras neurales de ser humano diferenciadas, pero no en las no diferenciadas, y que regulan un represor transcripcional en tales células. Otros investigadores han identificado la generación de moléculas similares a micro-ARN derivadas de intrones (micro-ARN-di) a partir de estas regiones, como una herramienta para el análisis de la función génica y el desarrollo de terapias específicas de genes, y predijeron posibles aplicaciones incluyendo sistemas de modulación de genes principales para la regulación del desarrollo, la inmunidad intracelular, la inactivación de heterocromatina, y la evolución genómica en eucariotas (Lin y Ying, 2004b).

Se implicó a los micro-ARN en diversas enfermedades neurológicas, tales como el síndrome de X Frágil, la atrofia muscular espinal (AME), el parkinsonismo de inicio temprano (síndrome de Waisman) y el retraso mental ligado al X (RMX3), así como con diversos cánceres y afecciones precancerosas tales como el tumor de Wilm, el tumor testicular de células germinales, la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia de células B, tejidos colorrectales precancerosos y neoplásicos y el linfoma de Burkkit [revisado en Gong H, *et al.*, 2004, *Mediac Research Reviews*, publicado en la red en Wiley InterScience (www.intersciencedotwiley-dotcom)].

La solicitud de patente de Estados Unidos 20060247193 explica la administración de más de 100 miARN para el tratamiento de las ENM, incluyendo a la ELA.

La solicitud de patente de Estados Unidos 20090246136 explica la administración de miR-206 y/o miR-1 para el tratamiento de las ENM, incluyendo a la ELA.

Figlewicz *et al.* [Human Molecular Genetics, Volumen 3, 1994] explican que las variantes de la subunidad pesada del neurofilamento se asocia con el desarrollo de ELA.

Antecedentes adicionales, relevantes en la técnica, incluyen a la solicitud de patente de Estados Unidos 20080176766; la solicitud de patente WO2007/016548; la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/247193, Krichevsky *et al.*, RNA 9 (2003), 1274-1281; Monika *et al.*, AN Official Publication of the American Association of Anatomists, 235 (2006), 2538-2548; Johnson *et al.*, Neurobiology of disease, 29 (2007), 438-445.

Sumario de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un uso de miRNA-9 o miRNA-9* para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el miRNA-9 es como se indica en SEC ID N°: 1.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el miRNA-9* es como se indica en SEC ID N°: 2.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención el sujeto es un ser humano.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado como se entiende normalmente por alguien con las habilidades habituales en la materia a la que la invención atañe.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con relación a las imágenes que la acompañan. En este sentido, la descripción tomada con los dibujos hace obvio para los expertos en la materia como se pueden practicar las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

Las figuras 1A-H son gráficos que ilustran la supervivencia inferior y la actividad cinética de los ratones MNDCRmut. (A) Curva de supervivencia para los ratones de control y los genosuprimidos condicionales para Dicer (control, MNDCRmut; n=12, 12). (B) Ganancia de peso de ratones de control y MNDCRmut. (C) Tiempo para completar una vuelta en la tarea del poste para ratones de control y MNDCRmut. (D-E) Medidas de campo a las 8, 16 y 31 semanas de edad. (D) Proporción de la distancia recorrida en la pista de campo en comparación con la media de los controles (n=12,12). (E) Proporción de sucesos de levantamiento sobre las patas traseras realizados en la pista de campo, en comparación con la media de los controles (n=12,12). (F-H) Locomoción en la jaula de los MNDCRmut y de los controles, a las 11 (F), 21 (G) y 50 (H) semanas de edad (n=12,12). Recuadros: promedio de actividad en todo el periodo medido * P<0,05, **P<0,01.

Las figuras 2A-C son gráficos y fotografías que ilustran que los ratones MNDCRmut muestran atrofia muscular con signos de denervación. Registro de EMG bipolar de los músculos interóseo y gastrocnemio de las extremidades posteriores. (A) Trazados de EMG representativos del control (arriba) y de MNDCRmut (abajo) con anestesia. Los potenciales de fibrilación frecuentes se indican mediante flechas rojas. (B) Para cada ratón, los hallazgos del EMG se clasificaron en una escala de 1-7 designada el "Índice de Patología de EMG", reflejando la intensidad y frecuencia de los potenciales de fibrilación (n=5,5) en ratones codificados, haciendo notar que el electromiograma no mostraba el genotipo del ratón sometido a la prueba. (C) Tinciones de hematoxilina y eosina de secciones transversales a través del músculo tibial de los MNDCRmut. Las fibras angulares se marcan con flechas. *P<0,05, **P<0,01.

Las figuras 3A-P son fotografías y gráficos que ilustran que los MNDCRmut muestran axonopatía y esclerosis de los cuernos ventrales de la médula espinal. (A-B) Tinción de Nissl representativa de secciones lumbares de un ratón MNDCRmut y de un miembro de la misma camada de control. Los recuadros son ampliaciones de un área del cuerno ventral en cada sección. La línea discontinua representa el borde en el que se hizo el recuento de las células de diámetro grande (> 20 µm). (C) Número promedio de neuronas motoras contadas por cuerno ventral en la médula espinal lumbar (L2-L3) de ratones MNDCRmut y de control de cuatro meses de edad (12 secciones lumbares por animal; n=5,5). (D-E) Sección lumbar con GFAP inmunoteñida representativa de ratones de cuatro meses de edad MNDCRmut y de control. (F) Promedio de la intensidad de señal de medida en los cuernos lateroventrales de la médula espinal lumbar (L2-L3) de ratones MNDCRmut y de los controles (unidades arbitrarias, 3 secciones lumbares por animal; n=5,5). (G-L) Placa motora representativa demostrando el solapamiento completo (arriba) o el solapamiento parcial (abajo) entre los componentes post sinapsis (rojo; bungarotoxina marcada con rodamina) y los componentes pre sinapsis (anticuerpo verde anti-NEFM) del punto de unión neuromuscular. (M) Porcentaje de placas motoras patológicas en ratones MNDCRmut y en los controles (400 sinapsis/animal; n=2,2). (N-O) Raíces dorsales (sensitivas, izquierda) y ventrales (motoras, derecha) representativas usadas para las mediciones del número de axones, teñidas con anticuerpo anti-NEFM. (P) Promedio del número de axones en la raíz dorsal y ventral de ratones MNDCRmut y de los controles (n=2). * P<0,05, **P<0,01.

Las figuras 4A-G son gráficos y diagramas que ilustran que mir-9 está regulado negativamente de forma específica en un modelo de atrofia muscular espinal y está aguas arriba de la expresión coordinada de las subunidades del neurofilamento. (A-C) Distribución categorizada de la intensidad de expresión de la subunidad NF. El porcentaje de axones a cualquier categoría de intensidad se menciona en el eje y. A-NEFL, B-NEFM, C-NEFP. Las líneas negra y gris representan la intensidad media global de los axones del control y de MNDCRmut, respectivamente. (D) Ilustración de las secuencias clonadas en las construcciones indicadoras de luciferasa usadas para la evaluación funcional de las interacciones de miR-9 con los ARNm de la subunidad del NF, donde NEFHmut significa NEFH mutado en la semilla. Los cuadros grises representan los sitios de unión de miR-9. (E) El ensayo del indicador de luciferasa heterólogo revela que miR-9 puede funcionar cadena arriba de las subunidades del NF. Niveles de la actividad de luciferasa en células HEK293 transfectadas con un vector vacío, o con un vector que sobreexpresa miR-9. Los datos están normalizados con la actividad de un indicador de beta-galactosidasa contransfectado y presentados como el porcentaje de la actividad de luciferasa en ausencia de miR-9. Como un control positivo se usó OC-2 (un fragmento de la 3' UTR de Onecut2). (F-G) Células madre embrionarias de ratón de control de tipo silvestre (CMEr) y CMEr de SMN1mut, albergando la mutación de mSMN1 homocigota y dos copias de un transgen hSMN2 se diferenciaron in vitro en neuronas motoras. Las células se purificaron por FACS por la expresión del transgen GFP, dirigida por el promotor Hlxb9. (F) Diagrama de volcán que ilustra la proporción log2 de la expresión de miARN de SMN1mut / tipo silvestre en el eje x y el log10 del valor P obtenido mediante una prueba t de Student de dos colas en el eje y. (G) Análisis por PCRc de la expresión de miR-9 y miR-9* en neuronas motoras derivadas de CMEr de SMN1mut (barras grises) y de CMEr de tipo silvestre (barras blancas) * P<0,05, **P<0,01.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

Se conoce que el miARN desempeña una función de gran importancia en la regulación post transcripcional de genes en la plasticidad morfológica y funcional de neuronas post mitóticas de vertebrados. Además, las alteraciones en la función del miARN contribuyen a la susceptibilidad a la enfermedad neurodegenerativa.

Los presentes inventores han generado un ratón transgénico que carece, de forma selectiva, de actividad microARN en neuronas motoras (NM) post mitóticas. El ratón muestra características distintivas de ENM (enfermedad de neuronas motoras), incluyendo esclerosis de los cuernos ventrales de la médula espinal, arquitectura de la placa motora aberrante y atrofia muscular con signos de denervación (Figuras 2A-C y 3A-P)

Usando este modelo, los presentes inventores encontraron que la expresión de la subunidad pesada del neurofilamento (NFP) se regula positivamente en NM deficientes en miARN (figuras 4A-C).

Los presentes inventores demostraron que miR-9 está regulado negativamente de forma específica en un modelo de ratón de atrofia de médula espinal diferente (figuras 4F-G).

Finalmente, los presentes inventores demostraron que NFP es una diana para la regulación mediante miR-9 (Figura 4E).

A partir de estos hallazgos, los presentes inventores concluyen que miR-9 puede estar implicado en ENM y, como tal, los presentes inventores proponen que miR-9 puede servir como una diana potencial para tratamientos y el diagnóstico de las ENM.

5 Según se usa en el presente documento, el término “diagnosticar” se refiere a clasificar una patología (por ejemplo, una enfermedad, trastorno, síndrome, afección y/o un síntoma de los mismos), determinar una severidad de la patología, controlar la progresión de una patología, predecir un desenlace de la patología y/o las perspectivas de recuperación (por ejemplo, pronóstico).

10 La frase “enfermedad de neuronas motoras (ENM)” como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno neurológico que de forma selectiva destruye neuronas motoras. Como tal, las enfermedades tales como corea de Huntington no se clasifican como ENM.

15 Los ejemplos de enfermedades de neuronas motoras incluyen, pero sin limitación, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, palsy pseudobulbar, palsy bulbar progresivo, enfermedad de las neuronas motoras inferiores y atrofia muscular espinal 1 (AME1, Enfermedad de Werdnig-Hoffmann), Atrofia Muscular Espinal Tipo 2 (AME2) y Atrofia Muscular Espinal Tipo 3 (AME3, Enfermedad de Kugelberg-Welander) y trastornos de Charcot-Marie-Tooth.

20 Como se usa en el presente documento “una muestra biológica” se refiere a una muestra de fluido o a una muestra de tejido que procede de un sujeto. Los ejemplos de muestras de fluido incluyen, pero sin limitación, sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, linfa, 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 diagnóstico *post mortem*).

25 Se conocen en la técnica los métodos para obtener tales muestras biológicas incluyendo, pero sin limitación, procedimientos de extracción de sangre convencionales y punción lumbar.

30 Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un animal, preferentemente a un mamífero, más preferentemente a un ser humano. El sujeto puede ser sano o mostrar signos preliminares de una ENM, tal como fatiga muscular. De forma alternativa, el sujeto puede tener una predisposición genética a la enfermedad.

35 La detección del nivel del miARN-9 o 9* puede efectuarse usando diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de hibridación basados en ARN (por ejemplo, hibridación de transferencia de Northern, hibridación *in situ* de ARN 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 cebador, espectroscopia de masas, secuenciación, secuenciación mediante hibridación, LCR (LAR), Reacción Sintética Auto Mantenido (3SR/NASBA), reacción de la Replicasa Q-Beta (Qb), reacción de sonda cíclica (CPR), un análisis de ADN ramificado, y detección de al menos un cambio de ácido nucleico.

40 El ARN celular total puede aislarse de una muestra biológica utilizando cualquier técnica adecuada tal como el método de fenol-cloroformo-guanidinio-tiocianato de único paso descrito en Chomczynski y Sacchi, Anal. Biochem. 162:156-159 (1987) o por el uso de kits tales como el kit Tri-Reagent (Sigma).

45 A continuación hay una lista no limitante de métodos de hibridación basados en ARN que pueden ser usados para detectar el miARN divulgado.

50 Análisis de Transferencia de Northern - Este método implica la detección de un ARN particular en una mezcla de ARN. Una muestra de ARN se desnaturaliza mediante el tratamiento con un agente (por ejemplo, formaldehído), que impide la unión de hidrógeno entre pares de bases, asegurando que todas las moléculas de ARN tienen una conformación desplegada y lineal. Se separan después las moléculas de ARN individuales, de acuerdo con el tamaño, mediante electroforesis en gel y se transfieren a una membrana basada en nitrocelulosa o nylon a la cual los ARN desnaturalizados se adhieren. Se expone después la membrana a sondas de ADN, ARN u oligonucleótidos (compuestos de deoxirribo o ribonucleótidos). Pueden marcarse las sondas usando radioisótopos o nucleótidos ligados a enzima. La detección puede ser usando autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia.

55 Este método permite la cuantificación de una cantidad de moléculas de ARN particulares y 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.

60 Tinción de la hibridación *in situ* de ARN - En este método, se adhieren sondas de ADN, ARN u oligonucleótidos (compuestos de deoxirribo o ribonucleótidos) a las moléculas de ARN presentes en las células. En general, primero se fijan las células a portaobjetos para preservar la estructura celular y para impedir que las moléculas de ARN se degraden, y después se someten a tampón de hibridación conteniendo la sonda marcada. El tampón de hibridación incluye reactivos tales como formamida y sales (por ejemplo, cloruro de sodio y citrato de sodio), lo que permite la hibridación específica *in situ* de las sondas de ADN o ARN con sus moléculas ARNm diana, mientras se evita la unión no específica de la sonda. Los expertos en la materia son capaces de ajustar las condiciones de hibridación (es decir, temperatura, concentración de sales y de formamida, y similares) a las sondas específicas y los tipos de

65

células. Después de la hibridación, cualquier sonda no unida se elimina mediante lavado, y el portaobjetos se somete a una emulsión fotográfica que revela las señales generadas utilizando sondas radiomarcadas o a una reacción colorimétrica, que revela las señales generadas utilizando sondas marcadas ligadas a enzima.

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

10 La muestra de ácido nucleico que incluye a la región candidata que se analizará se aísla, amplifica y marca con un grupo indicador. Este grupo indicador puede ser un grupo fluorescente tal como ficoeritrina. Después se incuba el ácido nucleico marcado con las sondas inmovilizadas en el chip, utilizando una estación hidráulica. Por ejemplo, Manz *et al.* (1993) Adv in Chromatogr 1993; 33: 1-66, describe la fabricación en sustratos de sílice o de vidrio de dispositivos hidráulicos, y en particular dispositivos microcapilares.

15 Una vez acabada la reacción, se inserta el chip en un escáner y se detectan los patrones de hibridación. Los datos de hibridación se recogen como una señal emitida a partir de un grupo indicador ya incorporado en el ácido nucleico, que ahora está unido a las sondas adheridas al chip. Las sondas que se emparejan de forma perfecta a una secuencia de la muestra de ácido nucleico, en general producen señales más fuertes que aquellas que tienen desapareamientos. La identidad del ácido nucleico hibridado a una dada sonda se puede determinar debido a que se conoce la secuencia y la posición de cada sonda inmovilizada en el chip.

20 Preferentemente, las sondas de oligonucleótidos utilizadas por las diversas técnicas de hibridación descritas anteriormente en el presente documento, son capaces de hibridar con miARN 9 o 9* en condiciones de hibridación rigurosas.

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

30 Por ejemplo, una molécula micro-ARN que tiene una secuencia de ácido nucleico como se indica en SEC ID N°: 1 puede detectarse usando una sonda de oligonucleótidos que tenga una secuencia de ácido nucleico como se indica en SEC ID N°: 3. Por ejemplo, una molécula de micro-ARN que tiene una secuencia de ácido nucleico como se indica en SEC ID N°: 2 puede detectarse usando una sonda de oligonucleótidos que tenga una secuencia de ácido nucleico como se indica en SEC ID N°: 4.

35 Como se menciona anteriormente, también se puede detectar miARN-9 o 9* usando métodos basados en transcripción inversa. La transcripción inversa utiliza el molde de ARN, cebadores (específicos o al azar), transcriptasa reversa (por ejemplo, MMLV-RT) y desoxirribonucleótidos para formar (es decir, sintetizar) una molécula de ADN complementaria (ADNc) a base de la secuencia del molde de ARN. Una vez sintetizada, la molécula de ADNc monocatenaria o la molécula de ADNc bicatenaria (que se sintetiza a base del ADNc monocatenario) puede usarse en diversos métodos de detección basados en ADN tales como análisis de RT-PCR.

40 45 50 55 60 65 Análisis de RT-PCR - Este método usa la amplificación por PCR de moléculas de ARN relativamente poco frecuentes. Primero, las moléculas de ARN se purifican de células y se convierten en ADN complementario (ADNc) usando una enzima transcriptasa inversa (tal como una MMLV-RT) y cebadores tales como oligo-dT, hexámeros al azar, o cebadores específicos de genes. Después, se realiza una reacción de amplificación por PCR en una máquina de PCR mediante la aplicación de cebadores específicos de genes y de polimerasa de ADN Taq. Los expertos en la materia son capaces de seleccionar la longitud y la secuencia de los cebadores específicos de genes y las condiciones de PCR (es decir, temperaturas de hibridación, número de ciclos, y similares) que sean adecuados para la detección de moléculas de ARN específicas. Se apreciará que también puede emplearse una reacción RT-PCR semicuantitativa, mediante el ajuste del número de ciclos de PCR y la comparación de los productos de amplificación con controles conocidos.

- 5 Tinción de RT-PCR *in situ* - Este método se describe por: Nuovo, G. J. *et al.* (1993). (Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. *Am J Surg Pathol* 17, 683-690); y Komminoth, P. *et al.* (1994) (Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* RT-PCR. *Pathol Res Pract* 190, 1017-1025). Brevemente, la reacción de RT-PCR en células fijadas implica la incorporación de nucleótidos marcados en la reacción. La reacción se efectúa usando un aparato de RT-PCR *in situ* específico, tal como el sistema de microdissección de captura por láser PixCell II™ Laser Capture Microdissection (LCM) disponible de Arcturus Engineering (Mountainview, California, USA).
- 10 Las sondas y cebadores (es decir, agentes de detección) que se usan para determinar de forma específica un nivel de miARN-9 o miARN-9* se pueden envasar en un kit y etiquetar para el uso en el diagnóstico de una enfermedad de neuronas motoras. Los kits comprendiendo cebadores pueden incluir, adicionalmente, una enzima polimerasa de ADN, tal como una polimerasa de ADN termoestable, una enzima transcriptasa inversa, una mezcla de dNTP, un tampón de reacción en cadena de la polimerasa concentrado y un tampón de transcripción inversa concentrado.
- 15 agentes de detección pueden incluir análogos de nucleótido y/o un resto de marcaje, por ejemplo, resto detectable de forma directa tal como un fluoróforo (fluorocromo) o un isótopo radiactivo, o un resto detectable de forma indirecta, tal como un miembro de par de unión, tal como biotina, o una enzima capaz de catalizar una reacción colorimétrica o luminométrica no soluble. El kit también puede comprender, para ejecutar RT-PCR, al menos un gel profundido. Además, el kit puede incluir de forma adicional al menos un recipiente conteniendo reactivos para la
- 20 detección de ácidos nucleicos sometidos a electroforesis. Dichos reactivos incluyen a aquellos que detectan ácidos nucleicos de forma directa, tales como agentes intercalantes fluorescentes o reactivos de tinción de plata, o aquellos reactivos dirigidos a la detección de ácidos nucleicos marcados, tales como, pero sin limitación, reactivos ECL. Preferentemente, el kit incluye, asociada con él, información en una forma prescrita por una agencia gubernamental regulando la fabricación, uso o venta de kits diagnósticos. También se pueden proporcionar con el kit instrucciones
- 25 detalladas para el uso, almacenamiento y de solución de problemas.
- Como se menciona, el diagnóstico de la ENM también se puede efectuar mediante el análisis de una actividad de miARN-9 o miARN-9*.
- 30 Dado que los miARN son polinucleótidos que se unen a transcritos diana en una manera específica de secuencia, provocando la destrucción de los mismos, es posible canalizar una actividad de miARN-9 o miARN-9* mediante el análisis de una expresión de al menos uno de sus transcritos diana. Una regulación negativa de la actividad de miARN-9 debería conducir de forma inevitable a una regulación positiva en la expresión de su transcrito diana.
- 35 Se conocen en la técnica los métodos para determinar las dianas para ARN-9 o miARN-9*. Por ejemplo, están disponibles diversas herramientas bioinformáticas para analizar secuencias génicas y determinar si comprenden un sitio de unión de miARN (es decir, dianas).
- 40 Las herramientas ejemplares incluyen, pero sin limitación, 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, *et al.* (2005) *Nat Genet* 37: 495-500] (<http://genom-edotucscdotedu>).
- 45 Para asegurarse que no ocurran asignaciones de miR a dianas falso positivo, las dianas se pueden seleccionar en base a 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 utilizando métodos bioinformáticos, por ejemplo un test de tolerancia a interferencia.
- 50 De acuerdo con un caso, el transcrito diana analizado no es la subunidad pesada del neurofilamento (NFP).
- Se apreciará que el análisis de una expresión de un transcrito diana puede efectuarse en el nivel de ARN o de proteína.
- 55 Se pueden determinar los niveles de expresión de proteínas usando métodos conocidos en las técnicas.
- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA): Este método implica la fijación de una muestra (por ejemplo, células fijadas o una solución proteica) conteniendo un sustrato de proteína a una superficie tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Se aplica un anticuerpo específico de sustrato acoplado a una enzima y se permite que se una al sustrato. Después se detecta la presencia del anticuerpo y se cuantifica mediante una reacción colorimétrica empleando la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas normalmente empleadas en este método incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Si está bien calibrado y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producido. En general se emplea un sustrato estándar para mejorar la precisión cuantitativa.
- 60
- 65

Transferencia de Western: Este método implica la separación de un sustrato de otra proteína por medio de un gel de acrilamida seguido de la transferencia del sustrato a una membrana (por ejemplo, nylon o PVDF). Después se detecta la presencia del sustrato mediante anticuerpos específicos para el sustrato, los que a su vez se detectan mediante reactivos de unión al anticuerpo. Los reactivos de unión a anticuerpo pueden ser, por ejemplo, proteína A, u otros anticuerpos. Los reactivos de unión a anticuerpo pueden estar radiomarcados o ligados a enzima como se describe anteriormente en el presente documento. La detección puede ser mediante autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite la cuantificación de una cantidad de sustrato y la determinación de su identidad mediante una posición relativa en la membrana, lo que es indicativo de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

Radioinmunoensayo (RIA): En una versión, este método implica la precipitación de la proteína deseada (es decir, el sustrato) con un anticuerpo específico y proteína de unión a anticuerpo radiomarcada (por ejemplo, proteína A marcada con I^{125}) inmovilizado en un transportador precipitable tal como esferas de agarosa. El número de cuentas en el sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de sustrato.

En una versión alternativa del RIA, se emplea un sustrato marcado y una proteína de unión a anticuerpo no marcada. Una muestra conteniendo una cantidad desconocida de sustrato se añade en diversas cantidades. La disminución en las cuentas precipitadas del sustrato marcado es proporcional a la cantidad de sustrato en la muestra añadida.

Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS): Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células mediante anticuerpos específicos para el sustrato. Los anticuerpos específicos para el sustrato están ligados a fluoróforos. La detección es por medio de una máquina de clasificación celular que lee la longitud de onda de la luz emitida de cada célula según esta pasa a través de un haz de luz. Este método puede emplear uno o más anticuerpos de forma simultánea.

Análisis inmunohistoquímicos: Este método implica la detección de un sustrato *in situ* en células fijadas mediante anticuerpos específicos para sustrato. Los anticuerpos específicos para sustrato pueden estar ligados a enzima o ligados a fluoróforos. La detección es mediante microscopia y evaluación subjetiva o automática. Podría necesitarse una reacción colorimétrica si se emplean anticuerpos ligados a enzima. Se apreciará que la inmunohistoquímica a menudo es seguida de tinción de cuentas del núcleo celular utilizando, por ejemplo, tinción de Hematoxilina o Giemsa.

Ensayo de actividad *in situ*: De acuerdo con este método, se aplica un sustrato cromogénico en las células conteniendo una enzima activa, y la enzima cataliza una reacción en la que el sustrato se descompone para producir un producto cromogénico visible por un microscopio óptico o uno fluorescente.

Ensayos de actividad *in vitro*: En estos métodos, la actividad de una enzima particular se mide en una mezcla de proteínas extraída de las células. La actividad se puede medir en un espectrofotómetro usando métodos colorimétricos o puede medirse en un gel de acrilamida no desnaturante (es decir, gel de actividad). Después de la electroforesis el gel se remoja en una solución conteniendo un sustrato y reactivos colorimétricos. La banda teñida resultante corresponde a la actividad enzimática de la proteína de interés. Si está bien calibrado y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de enzima presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producida. Para mejorar la precisión cuantitativa, en general se emplea un estándar de enzima.

Como se mencionó, un diagnóstico para una ENM puede considerarse positivo cuando hay una regulación negativa de miARN-9 o miARN-9*.

De forma típica, el nivel de miARN-9 o miARN-9* en la muestra de pacientes se compara con el de, al menos, un sujeto sano (es decir, un control libre de ENM). Una regulación negativa de al menos 1,5 veces es indicativa de una ENM. De acuerdo con otra realización, una regulación negativa de al menos 2 veces es indicativa de una ENM. 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). De forma alternativa, los datos del control se pueden tomar de bases de datos y de la bibliografía. Se apreciará que también puede tomarse la muestra de control del sujeto enfermo en un momento particular para analizar la progresión de la enfermedad.

Después del análisis de la actividad y/o expresión de miARN-9 o miARN-9*, de forma típica los resultados se registran y se informa al sujeto. Se puede verificar el diagnóstico con otros medios, incluyendo aquellos que conforman los criterios de El Escorial. Otros métodos de diagnóstico que pueden usarse en conjunción con el método divulgado son aquellos que implican estimulación magnética transcraneal (EMT). Este procedimiento no invasivo crea un pulso magnético dentro del cerebro que estimula la actividad motora en una cierta área del cuerpo. Electrodo adheridos a diferentes áreas del cuerpo recogen y registran la actividad eléctrica en los músculos.

También se apreciará que el método diagnóstico divulgado puede ser verificado con otras pruebas para descartar la implicación de otras enfermedades o para medir el alcance de la implicación del músculo. A continuación hay una lista de tales pruebas:

1. La electromiografía (EMG) se usa para diagnosticar disfunción muscular y nerviosa y enfermedad de la médula espinal. También se usa para medir la velocidad a la que los impulsos viajan a lo largo de un nervio en particular. La EMG registra la actividad eléctrica desde el cerebro y/o la médula espinal a una raíz nerviosa periférica (encontrada en los brazos y las piernas) que controla a los músculos durante la contracción y en reposo. Se insertan en un músculo electrodos de alambre muy finos uno a uno, para valorar los cambios en el voltaje eléctrico que ocurren durante el movimiento y cuando el músculo están en reposo. Los electrodos están adheridos a un instrumento de registro. Normalmente, la prueba dura de forma aproximada una hora o más, dependiendo del número de músculos y nervios a probar.

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

2. Las pruebas de laboratorio de exploración de sangre, orina, y otras sustancias pueden descartar enfermedades musculares y otros trastornos que pueden tener síntomas semejantes a los de ENM. Por ejemplo, el análisis del fluido que rodea al cerebro y la médula espinal puede detectar diversos trastornos, incluyendo PPS. Pueden ordenarse pruebas de sangre para medir los niveles de la proteína creatina quinasa (que es necesaria para las reacciones químicas que producen energía para las contracciones musculares); los niveles altos pueden ayudar a diagnosticar enfermedades musculares tales como la distrofia muscular.

3. La formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) usa ondas radioeléctricas generadas por ordenador y un campo magnético poderoso para producir imágenes detalladas de estructuras corporales incluyendo tejidos, órganos, huesos, y nervios. Estas imágenes pueden ayudar a diagnosticar tumores cerebrales y médula espinal, enfermedad ocular, inflamación, infección, e irregularidades vasculares que pueden conducir a ictus. La IRM también puede detectar y controlar trastornos degenerativos tales como esclerosis múltiple, y puede certificar lesión cerebral a partir de traumatismo. La IRM a menudo se usa para descartar enfermedades diferentes a las ENM, que afectan a la cabeza, el cuello, y la médula espinal.

4. La biopsia de músculos o de nervios puede ayudar a confirmar la enfermedad nerviosa y la regeneración nerviosa. Una pequeña muestra del músculo o nervio se retira con anestesia local y se estudia en un microscopio. La muestra puede ser retirada de forma quirúrgica, a través de una abertura hecha en la piel, o mediante biopsia con aguja, en la que una aguja hueca fina se inserta a través de la piel y dentro del músculo. Una pequeña pieza de músculo permanece en la aguja hueca cuando esta se retira del cuerpo. Aunque esta prueba puede proporcionar información valiosa acerca del grado del daño, es un procedimiento invasivo que puede provocar por sí mismo efectos secundarios neuropáticos. Muchos expertos no creen que sea siempre necesaria una biopsia para el diagnóstico.

Dado que los presentes inventores demostraron que miARN-9 y 9* están regulados negativamente en modelos de ratón de ENM, los presentes inventores también proponen que estos miARN pueden usarse para tratar tales enfermedades.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto divulgado, se proporciona el tratamiento de una enfermedad de neuronas motoras (ENM), mediante la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que regula de forma positiva una actividad o cantidad de miARN-9 o miARN-9*, tratando así la ENM.

Los agentes de la presente divulgación que regulan de forma positiva una actividad o cantidad de miARN-9 o miARN-9* incluyen, pero sin limitación, productos químicos, compuestos antibióticos que se sabe que modifican la expresión génica, polinucleótidos modificados o no modificados (incluyendo oligonucleótidos), polipéptidos, péptidos, moléculas de ARN pequeñas y miARN.

Los micro-ARN se procesan a partir de pre-miR (precursores pre-micro-ARN). Los pre-miR son un conjunto de moléculas miARN precursoras que transcribe la ARN polimerasa III, que se procesan de forma eficaz en miARN funcionales, por ejemplo, tras la transfección en células de cultivo. Por consiguiente, un pre-miR puede usarse para suscitar actividad miARN específica en tipos celulares que normalmente no expresan este miARN, dirigiendo así la función de su diana mediante la regulación negativa de su expresión en un experimento de "ganancia de (miARN), función". Existen diseños de pre-miR para todos los miARN conocidos enumerados en el Registro de miARN, y cualquier investigador puede diseñarlos fácilmente.

Por lo tanto, la regulación positiva de la función y/o actividad de los miARN divulgados se efectúan usando un polinucleótido que comprende al menos 25 nucleótidos consecutivos de la secuencia de ácido nucleico indicada en SEC ID N°: 5, 6 o 7, más preferentemente, al menos 30, más preferentemente, al menos 35, más preferentemente, al menos 40, más preferentemente, al menos 45, más preferentemente, al menos 50, más preferentemente, al menos 55, más preferentemente, al menos 60, más preferentemente, al menos 65, más preferentemente, al menos 70, más preferentemente, al menos 75, más preferentemente, al menos 80, más preferentemente, al menos 85 nucleótidos consecutivos de la secuencia de ácido nucleico indicada en SEC N°: 5, 6 o 7.

Los pre-miARN de origen natural se generan a partir de transcritos primarios más largos (pri-miARN - número de acceso a la miRbase = MI0000466; MI0000467; MI0000468) mediante una ribonucleasa, por ejemplo, Drosha.

5 Como se usa en el presente documento, el término “pri-miARN” se refiere a ARN precursores de pre-miARN, por ejemplo, ARN precursores que contienen miARN y se escinden mediante 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.

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

15 Por lo tanto, la regulación positiva de la función de los miARN divulgados se efectúa usando un polinucleótido que comprende al menos 21 nucleótidos consecutivos de la secuencia de ácido nucleico indicada en SEC ID N°: 1 o 3, más preferentemente, al menos 22, más preferentemente, al menos 23 nucleótidos consecutivos de la secuencia de ácido nucleico indicada en SEC N°: 1 o 3.

20 El término “polinucleótido” se refiere a un oligómero o polímero monocatenario o bicatenario de ácido ribonucleico (ARN), de ácido desoxirribonucleico (ADN), o de miméticos de los mismos. Este término incluye polinucleótidos y/o oligonucleótidos obtenidos de moléculas de ácidos nucleicos de origen natural (por ejemplo, ARN o ADN), moléculas de polinucleótidos y/o oligonucleótidos sintéticos que constan de bases de origen natural, azúcares, y enlaces internucleósidos covalentes (por ejemplo, estructura), así como polinucleótidos y/o oligonucleótidos sintéticos que tienen porciones que no son de origen natural, que actúan de forma semejante a las porciones de origen natural respectivas.

25 Los polinucleótidos (incluyendo oligonucleótidos) diseñados de acuerdo con las explicaciones de la presente invención pueden generarse de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, incluyendo síntesis enzimática o síntesis en fase sólida. El equipo y los reactivos para ejecutar la síntesis en fase sólida están disponibles de forma comercial de, por ejemplo, Applied Biosystems. Para tal síntesis se puede emplear cualquier otro medio; la síntesis existente de oligonucleótidos está bien dentro de las capacidades de alguien experto en la materia y puede ser llevada a cabo a través de metodologías establecidas como se detalla en, por ejemplo: Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001), “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”; Ausubel, R. M. *et al.*, 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”; utilizando química en fase sólida, por ejemplo cianoetil fosforamidita seguido de desprotección, desalinización, y purificación mediante, por ejemplo, un método automatizado de introducción de tritilo o HPLC.

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

Por ejemplo, los oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención pueden comprender nucleósidos heterocíclicos que consisten de bases purínicas y pirimidínicas, enlazadas en una unión fosfodiéster 3'-5'.

45 Preferentemente los oligonucleótidos o polinucleótidos utilizados son aquellos modificados ya sea en su estructura, uniones internucleósido, o bases, como se describe en sentido amplio a continuación en el presente documento.

50 Los ejemplos específicos de oligonucleótidos o polinucleótidos preferidos, útiles de acuerdo con este aspecto de la presente invención, incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos conteniendo estructuras modificadas o uniones internucleósido no naturales. Los oligonucleótidos o polinucleótidos que tienen estructuras modificadas incluyen a aquellos que conservan un átomo de fósforo en la estructura, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos n.º.: 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

55 Las estructuras modificadas de oligonucleótidos o polinucleótidos incluyen, por ejemplo: fosforotioatos; fosforotioatos quirales; fosforoditioatos; fosfotriésteres; fosfotriésteres de aminoalquilo; metilo y otros fosfonatos de alquilo, incluyendo 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales; fosfinatos; fosforamidatos, incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos; tionofosforamidatos; tionoalquilfosfonatos; tionoalquilfosfotriésteres; y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de estos, y aquellos que tienen la polaridad invertida en los que los pares adyacentes de las unidades de nucleósido están unidas 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se pueden usar diversas sales, sales mixtas, y formas de ácido libres de las modificaciones anteriores.

65 De forma alternativa, las estructuras de oligonucleótidos o polinucleótidos modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en ellas tienen estructuras formadas por uniones internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y uniones internucleósido de alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones de internucleósido heteroatómica o heterocíclica de cadena corta. Estas incluyen a aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en

parte de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras de xilosano; estructuras sulfuro, sulfóxido, y sulfona; estructuras formaceto y tioformaceto; estructuras metileno formaceto y tioformaceto; estructuras conteniendo alqueno; estructuras sulfamato; estructuras metilenoimino y metilenoimidazino; estructuras sulfonato y sulfonamida; estructuras amida; y otras que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂, como se divulga en las Patentes de Estados Unidos n.º: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

Otros oligonucleótidos o polinucleótidos que pueden usarse de acuerdo con la presente invención son aquellos modificados en el azúcar y en la unión internucleósido, es decir, la estructura de las unidades de nucleótido se reemplaza con grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la complementación con la diana polinucleótido apropiada. Un ejemplo de tal mimético de oligonucleótido incluye un péptido ácido nucleico (PAN). Un oligonucleótido PAN se refiere a un oligonucleótido donde la estructura de azúcares se reemplaza con una estructura que contiene amidas, en particular una estructura de aminoetilglicina. Estas bases se conservan y se unen de forma directa o indirecta a átomos aza-nitrógeno de la porción amida de la estructura. Las patentes de Estados Unidos que explican la preparación de compuestos PAN incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Otras modificaciones de la estructura que pueden usarse en la presente invención se divulgan en la Patente de Estados Unidos n.º 6.303.374.

Los oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases. Como se usa en el presente documento, las bases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases "modificadas" incluyen, pero sin limitación, 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 y guaninas 8-sustituidas; 5-halo, de forma particular 5-bromo, 5-trifluorometilo, y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-deazaguanina y 7-deazaadenina; y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Las bases modificadas adicionales incluyen aquellas divulgadas en: Patente de Estados Unidos n.º 3.687.808; Kroschwitz, J. I., ed. (1990), "The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering", páginas 858-859, John Wiley & Sons; Englisch *et al.* (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. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas, y purinas N-2, N-6, y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, y 5-propinilcitosina. Las sustituciones 5-metilcitosina han mostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácidos nucleicos por 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S. *et al.* (1993), "Antisense Research and Applications," páginas 276-278, CRC Press, Boca Raton), y son actualmente las sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcares 2'-O-metoxietilo.

Se apreciará 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 ácido nucleico que codifica el polinucleótido de la divulgación (por ejemplo, SEC ID N.º: 1, 3, 5, 6 o 7) se liga preferentemente en una construcción de ácido nucleico. Dicha construcción de ácido nucleico incluye una secuencia promotora para dirigir en la célula la transcripción de la secuencia de polinucleótido en una manera constitutiva o inducible.

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

La construcción de ácido nucleico (que también recibe el nombre en el presente documento de un "vector de expresión") divulgada incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para la replicación y la integración en procariontes, eucariontes, o preferentemente ambos (por ejemplo, vectores lanzadera). Además, los vectores de clonación típicos también pueden contener una secuencia de iniciación de la transcripción y la traducción, un terminador de la transcripción y la traducción, y una señal de poliadenilación.

Los promotores eucarióticos típicos contienen dos tipos de secuencias de reconocimiento, la caja TATA y elementos promotores cadena arriba. Se piensa que la caja TATA, localizada 25-30 pares de bases cadena arriba del sitio de iniciación de la transcripción, está implicada en dirigir a la polimerasa de ARN para comenzar la síntesis de ARN. Los otros elementos promotores cadena arriba determinan la velocidad a la que la transcripción se inicia.

De forma preferente, el promotor utilizado por la construcción de ácido nucleico de la divulgación está activo en la población de células específica transformada. Ejemplos de promotores específicos de tipo celular y/o específicos de tejido incluyen promotores tales como albúmina que es específico de hígado [Pinkert *et al.*, (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277], promotores específicos linfoides [Calame *et al.*, (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275]; en particular promotores de receptores de células T [Winoto *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8: 729-733] y de inmunoglobulinas; [Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor del neurofilamento [Byrne *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch *et al.* (1985) *Science* 230: 912-916] o promotores específicos de glándula mamaria tales como el promotor de suero de la leche (Patente de Estados Unidos n.º 4.873.316 y la Solicitud de Publicación Europea n.º 264.166).

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

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

El miARN de este aspecto de la divulgación (o los vectores de expresión que codifican el mismo) se puede administrar al paciente *per se* o como parte de una composición farmacéutica, donde está mezclado con transportadores o excipientes adecuados.

Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como transportadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento la expresión "ingrediente activo" se refiere al miARN responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo en este documento, las frases "transportador fisiológicamente aceptable" y "transportador farmacéuticamente aceptable" que pueden ser usados indistintamente se refieren a un transportador o a un diluyente que no provoca a un organismo irritación significativa y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante está incluido en estas frases.

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 ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

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

Las vías de administración adecuadas pueden, por ejemplo, incluir la administración oral, rectal, transmucosa, de forma especial transnasal, intestinal o aplicación parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares así como intratecales, intraventriculares directas, intracardiaca, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, inyecciones en la arteria coronaria común, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Los criterios convencionales para la administración de fármacos en el 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 por una molécula de superficie celular endotelial en combinación con un agente que es capaz por sí mismo de cruzar la barrera hematoencefálica) en un intento de aprovechar una de las rutas de transporte endógenas de la barrera hematoencefálica; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua a transportadores lipídicos o de colesterol); y la alteración transitoria de la integridad de la barrera hematoencefálica mediante alteración hiperosmótica (que se produce por 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 tienen limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados con un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación inherente a los sistemas de transporte endógenos, efectos

secundarios biológicos potencialmente no deseados asociados con la administración sistémica de una molécula química que consta de un motivo transportador que podría ser activo fuera del SNC, y el posible riesgo de daño cerebral en regiones del cerebro donde la barrera hematoencefálica está alterada, lo que hace que sea un método de administración subóptimo.

5 De forma alternativa, uno puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en vez de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la composición farmacéutica de forma directa en una región de un tejido de un paciente.

10 El término “tejido” se refiere a una parte de un organismo que consiste de un agregado de células que tienen una estructura semejante y/o una función común. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, tejido cerebral y tejido muscular.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezcla convencional, disolución, granulado, elaboración de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

20 Las composiciones farmacéuticas para su uso en conformidad con la presente invención pueden de esta forma formularse en una manera convencional usando uno o más transportadores fisiológicamente aceptables comprendiendo excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica. Las formulaciones convenientes dependen de la vía de administración elegida.

25 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, de forma preferente en tampones compatibles fisiológicamente tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón fisiológico salino. Para la administración transmucosal, en la formulación se usan penetrantes apropiados para infiltrar la barrera. En general dichos penetrantes se conocen en la técnica.

30 Para la administración oral, se puede formular la composición farmacéutica fácilmente mediante la combinación de compuestos activos con transportadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales transportadores permiten formular la composición farmacéutica como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones, y similares, para la ingestión oral del paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, de forma opcional triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir si se desea auxiliares adecuados, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; las preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato de sodio.

40 Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentrados que pueden contener de forma opcional goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se puede añadir a los revestimientos de comprimidos y tabletas, colorantes o pigmentos para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

45 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse de forma oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión preparadas con gelatina así como cápsulas blandas, selladas, preparadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos en combinación con rellenos tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, de forma opcional, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para la administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

55 Para la administración bucal, las composiciones pueden presentarse en forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

60 Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran de forma conveniente en la forma de una presentación de aerosol de pulverización de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorodifluorometano, 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. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dosificador, se pueden formular conteniendo una mezcla de polvos del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, de forma opcional, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. De forma adicional, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones apropiadas de base oleosa o acuosa de inyección. Los disolventes o vehículo lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. De forma opcional, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

De forma alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvos para su constitución con un vehículo adecuado antes de su uso, por ejemplo, una solución acuosa estéril, sin pirógenos.

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

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos se contienen en una cantidad eficaz para obtener el propósito pretendido. De forma más específica, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de los ingredientes activos (miARN) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una ENM (por ejemplo, ELA) o prolongar la supervivencia del sujeto tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la habilidad de los expertos en la materia, de forma especial a la vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación utilizada en la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar de forma inicial a partir de ensayos *in vitro* y de cultivos celulares. Por ejemplo, se puede formular una dosis en un modelo animal para obtener una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos.

Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de laboratorio. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y en cultivos celulares y de estudios en animales, se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano. La dosificación puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Las formulaciones exactas, vías de administración y dosificación, las puede elegir el médico tratante en función del estado del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1).

La cantidad e intervalo de dosificación se puede ajustar de forma individual para permitir que los niveles del ingrediente activo sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de los datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para obtener la CEM dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la severidad y de la respuesta de la afección tratada, la dosificación puede ser de una única o de una pluralidad de administraciones, con el ciclo del tratamiento de una duración desde varios días a varias semanas, o hasta que se efectúa la curación o se obtiene la disminución de la patología.

Por supuesto, la cantidad de una composición a administrarse, dependerá del sujeto tratado, de la severidad de la afección, de la manera de administración, del juicio del médico que prescribe, etc.

Si se desea, las composiciones pueden presentarse en un paquete o dispositivo dosificador, tal como un kit aprobado por la FDA (acrónimo de *Food and Drug Administration*: Administración de Alimentos y Fármacos), que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias conteniendo al ingrediente activo. El paquete o dispositivo dosificador puede, por ejemplo, comprender láminas de metal o de plástico, tal como un paquete blíster. El paquete o dispositivo dosificador puede tener adjuntas instrucciones para la administración. El paquete o dosificador también puede adecuarse mediante una notificación asociada con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya notificación es reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones, o de la administración al ser humano o veterinaria.

Dicha notificación, por ejemplo, puede ser un etiquetado aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos para la prescripción de fármacos, o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación para su uso en la invención formulada en un transportador farmacéutico compatible, también se pueden preparar, poner en un recipiente apropiado, y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla anteriormente de forma adicional.

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

Puesto que las ENM 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 agentes candidatos para el tratamiento de una ENM se puede hacer en base a su capacidad para regular positivamente miARN-9 y/o miARN-9*.

Por lo tanto, de acuerdo con todavía otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método de identificación de un agente para el tratamiento de una ENM, comprendiendo el método:

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

La neurona motora puede aislarse de cualquier animal, incluyendo un ratón, una rata o un ser humano. De forma alternativa, la motora neurona puede ser parte de una línea celular de neuronas motoras - tal como, por ejemplo, la línea celular de neuronas motoras murinas, NSC19 [Smirnova IV Spine (Phila Pa 1976). 1998 Jan 15; 23(2): 151-8].

No obstante, de forma alternativa, la neurona motora puede diferenciarse a partir de una célula madre. De acuerdo con un caso de realización divulgada, la célula madre es una célula madre embrionaria (CME) que no es de ser humano. Dichas células madre embrionarias se pueden aislar a partir de animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sirven como modelos para las ENM. Por ejemplo, se pueden aislar células madre embrionarias a partir de un ratón Tg(Hlxb9-GFP)1Tmj Tg(SMN2)89Ahmb *Smn1*^{tm1Msd/J} (número de almacenamiento del laboratorio de Jackson 006570). De forma alternativa, las células madre embrionarias se pueden aislar a partir de animales transgénicos, que comprenden una genosupresión colinérgico específica de DICER. Este modelo para ENM se describe adicionalmente más adelante en el presente documento.

Se conocen diversos métodos para la diferenciación de células madre embrionarias en neuronas motoras, tales como, por ejemplo, aquellos que describen Wichterle, H., *et al.*, [Cell 110, 385-97 (2002)].

Los agentes candidatos ejemplares incluyen agentes de molécula pequeña, agentes polinucleótido, productos químicos, compuestos antibióticos que se sabe que modifican la expresión génica, polinucleótidos modificados o no modificados (incluyendo oligonucleótidos), polipéptidos, péptidos, moléculas de ARN pequeñas y miARN.

Se apreciará que los métodos de puesta en contacto, de acuerdo con este aspecto de la divulgación, dependen de forma típica del tipo de agente candidato probado. Así, por ejemplo un agente polinucleótido de forma típica se pone en contacto con la neurona motora junto con un agente de transfección. Un producto químico pequeño se pone de forma típica en el medio de cultivo de la neurona motora sin agentes adicionales.

Después de la selección de un agente candidato como un agente terapéutico para el tratamiento de una ENM, el agente puede probarse - por ejemplo en un modelo animal para la enfermedad y en última instancia el agente puede probarse en seres humanos. Después la validación de la eficacia terapéutica puede conducir a la preparación del agente candidato como una composición farmacéutica.

Como se menciona, los presentes inventores han demostrado que los animales transgénicos que comprenden una genosupresión de DICER colinérgico específica pueden servir como modelos vivos para las ENM, dado que muestran, entre otros fenotipos relevantes, una atrofia muscular en comparación con sus correspondientes mamíferos de tipo silvestre.

Por lo tanto, de acuerdo con todavía otro aspecto de la divulgación, se proporciona un mamífero transgénico que no es ser humano, que comprende una genosupresión de DICER colinérgico específica, en la que el mamífero muestra atrofia muscular en comparación al mamífero de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, el término "DICER" se refiere a una enzima endonucleasa capaz de escindir moléculas de ARN bicatenarias largas en fragmentos de 21-23 pares de bases. Dicer se expresa a partir del gen AF430845 en el chr12:102,185,761-102,246,274 de ratón).

Un “animal transgénico” indica un animal que no es ser humano, preferentemente un mamífero elegido entre el grupo de los roedores, y de forma particular el ratón, rata, hámster y cobaya. El ratón es apreciado de forma particular debido a que su sistema inmunitario se ha estudiado en detalle. De forma alternativa, el animal transgénico se elige de entre animales de cría y de forma particular de porcinos, ovinos, caprinos, bovinos, équidos y de forma particular caballos, y lagomorfos, de forma particular conejos. El animal transgénico, de acuerdo con la divulgación, también puede elegirse de entre primates, particularmente monos tales como el macaco, chimpancé y el babuino.

Los animales transgénicos de la presente divulgación pueden categorizarse como “genosuprimidos”. Un “genosuprimido” tiene una alteración en el gen diana a través de la introducción de secuencias transgénicas que da como resultado una disminución de la función del gen diana, de manera que, de forma preferente, la expresión del gen diana es insignificante o no detectable.

De acuerdo con un caso, los animales transgénicos de la divulgación comprenden una deleción en al menos parte del gen DICER, de tal forma que la proteína codificada de esta manera se hace no funcional. Esto se puede obtener a través de mutación al azar (estrategia de retención de genes, mutagénesis química) o inserción en una diana (recombinación homóloga).

De acuerdo con un caso, la genosupresión está mediada por recombinación Cre-loxP.

De acuerdo con este caso, la preparación de mamíferos transgénicos que comprenden una genosupresión de DICER colinérgico específica, requiere la introducción en una célula no diferenciada de i) un polinucleótido que codifica Cre ligado operativamente a un promotor colinérgico específico y ii) un polinucleótido que codifica DICER flanqueado por sitios lox-P.

De forma típica, tal célula es una célula madre embrionaria (ME) que no es de ser humano. Después, se inyecta en un embrión de mamífero la célula ME transformada, donde se integrará en el embrión en desarrollo. Después se implanta el embrión en una madre adoptiva durante la duración de la gestación.

Las células madre embrionarias se seleccionan de forma típica por su capacidad de integrarse en, y formar parte de, la línea germinal de un embrión en desarrollo de manera que se crea la transmisión en la línea germinal de la construcción génica heteróloga. Por lo tanto, cualquier línea de células ME que tenga esta habilidad, es adecuada para su uso en el presente documento. Una cepa de ratón que se usa de forma típica para producción de células ME es la cepa 129J. Una línea de células ME preferida es la línea celular murina D3 (nº de catálogo de la Colección Americana de Cultivos Tipo CRL 1934). Las células se cultivan y se preparan para la inserción de ADN, utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como aquellos indicados por Robertson (Robertson, In: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D. C., 1987.).

Los ejemplos de promotores colinérgicos específicos incluyen, pero sin limitación, al promotor del transportador de Acetilcolina Vesicular.

De forma típica, los animales transgénicos generados de acuerdo con este aspecto de la divulgación presentan síntomas de una ENM. Dichos síntomas pueden incluir al menos uno de los siguientes: esclerosis de los cuernos ventrales de la médula espinal, arquitectura anómala de la placa motora y atrofia muscular con signos de denervación.

Se apreciará que los animales transgénicos de este aspecto de la divulgación pueden usarse para ensayar una eficacia de un agente candidato para el tratamiento de una ENM. Las funciones motoras del ratón se pueden analizar después de la administración del agente candidato al ratón. Si las funciones motoras mejoran, el agente candidato puede seleccionarse como un agente terapéutico y confeccionarse como composiciones farmacéuticas.

Como se usa en el presente documento el término “aproximadamente” se refiere a \pm el 10 %.

Las expresiones “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “tiene”, y sus conjugados, significan “incluyendo pero sin limitación”.

La expresión “que consiste de” significa “incluyendo y limitado a”.

La expresión “que consiste de forma esencial de” significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran de forma material las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicados.

Como se usa en el presente documento, la forma singular “un”, “una”, “el” y “la”, incluye referencias plurales a menos que el contexto estipule de forma clara lo contrario. Por ejemplo, la expresión “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

En toda esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención se pueden presentar en un formato de intervalo. Por consiguiente, la descripción de un intervalo debería considerarse que ha divulgado de forma específica todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como desde 1 a 6 debería considerarse que ha divulgado de forma específica subintervalos tales como desde 1 a 3, desde 1 a 4, desde 1 a 5, desde 2 a 4, desde 2 a 6, desde 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica de forma independiente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, esto significa que incluye cualquier cifra citada (fracción o número entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "variando/que varía entre" un número indicado en primer lugar y un número indicado en segundo lugar y "variando/que varía de" un número indicado en primer lugar "hasta" un número indicado en segundo lugar, se usan en el presente documento indistintamente y pretende incluir a los números indicados en primer y segundo lugar y a todas las cifras expresadas como fracción y como números enteros entre los mismos.

Como se usa en el presente documento el término "método" se refiere a las maneras, los medios, las técnicas y los procedimientos para llevar a cabo una dada tarea incluyendo, pero sin limitación, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sea conocidos, o desarrollados de forma fácil a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos que conocen los facultativos de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir de forma sustancial, retrasar o revertir la evolución de una afección, mejorar de forma sustancial los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir de forma sustancial la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se define anteriormente en este documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones, encontrarán más adelante respaldo experimental en los siguientes ejemplos.

30 Ejemplos

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

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican de forma minuciosa en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", volúmenes. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías indicadas en las patentes de Estados Unidos n.º: 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 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" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen de forma extensa en la patente y la bibliografía científica, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º: 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y 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 *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996);. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de todo este documento. Se cree que los procedimientos que contienen son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

60 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Animales: el gen Dicer se genosuprimió de forma específica en NM post mitóticas cruzando un ratón que porta un alelo condicional de Dicer, con un transgén de recombinasa Cre, dirigido por un promotor colinérgico específico (transportador de Acetilcolina Vesicular; TACV-Cre). Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con comida y agua a voluntad. Se controló diariamente la viabilidad de los ratones, y se los pesó de forma regular.

Exámenes conductuales

- De campo: La distancia total recorrida en un aparato de campo que consiste en una caja (50x50x22 cm) de Plexiglas iluminada con luz blanca de 120 lux y el número de sucesos de levantamiento sobre las patas traseras se cuantificó a lo largo de una prueba de cinco minutos para cada ratón individual, en tres sesiones de prueba independientes durante la fase de oscuridad del ciclo luz-oscuridad, mediante un sistema de rastreo de video automatizado (VideoMot2; TSE Systems, GmbH, Bad Homburg, Alemania). Por simplicidad, los datos se normalizaron al promedio del desempeño del tipo silvestre por intervalos de tiempo. Sin embargo, antes de la normalización se realizó un análisis estadístico sobre los datos.
- Prueba del poste vertical: Se pusieron los ratones en un poste vertical de superficie rugosa (diámetro 2 cm; altura 40 cm) orientados hacia el borde superior. Se midió el tiempo tomado en girar hacia abajo y el tiempo tomado en descender el poste. Los datos se promediaron entre tres experimentos por ratón por periodo de tiempo.
- Locomoción en la caja de residencia: Los ratones se alojaron individualmente, y la actividad locomotora se examinó de forma automática en un periodo de 48 horas usando el sistema InfraMot (TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).
- Electromiografía: Se anestesiaron los ratones con ketamina/xilacina intraperitoneal, y se realizó la EMG de aguja con un electrodo de aguja de EMG bipolar insertado en múltiples sitios en los músculos interóseo y gastrocnemio de la extremidad posterior. Se realizó el registro con un aparato de EMG convencional (Medelec, GB). Se clasificaron los hallazgos del EMG para cada ratón, en una escala de 1-7 denominada el "Índice de Patología EMG" que refleja la intensidad y frecuencia de los potenciales de fibrilación. Se procesaron capturas de pantalla representativas de los rastros de EMG usando Photoshop (Adobe).
- Preparación y tinción de tejidos: Se anestesió de forma profunda a los ratones con hidrato de cloral (1,4 µg/g de peso corporal, intraperitoneal) o ketamina/ xilasina (0,25 ml, al 10 % intraperitoneal) y se procesaron de forma directa o se perfundieron de forma transcardiaca con 10 ml de PBS, seguido de 100 ml de paraformaldehído (PFA) al 2,5 %. Los tejidos se equilibraron en una mezcla de PFA al 1,25 % y sacarosa al 15 % durante 24 horas. Secciones coronales espinales "flotantes" de 20 mm se recogieron y conservaron en PBS a 4 °C.
- Para el análisis del pericarion lumbar, se tiñeron secciones de médula espinal con violeta de cresilo y se contaron las células grandes (diámetro mayor que ~ 20 µm) Nissl positivas y se presentó como el número medio por cuerno ventral. Se usó para el recuento cada sexta sección de la médula espinal lumbar L2-L3 (~15 secciones por animal).
- Para detectar la Proteína Ácida Fibrilar Glial (PAFG), secciones flotando libres se preincubaron en una solución de PBS conteniendo suero equino normal al 20 % y tritón X-100 al 0,3 % durante 1 hora y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con anti-PAFG de conejo policlonal (1:200, Dako). Para la detección secundaria se usó anticuerpo contra IgG de conejo conjugado con cianina2 (Cy2) altamente absorbidos de forma cruzada (1:300, Jackson). Para cuantificar la intensidad de PAFG se usó el programa informático Image-Pro plus 4.1 en una región oval englobando la parte lateral de cada cuerno ventral en 3 secciones lumbares de L2 por ratón.
- Procesamiento y análisis de las raíces ventral y dorsal: Las raíces ventral y dorsal se disecaron a un nivel de L5 con los ganglios de la raíz dorsal, se fijaron y se incluyeron en parafina. Las extracciones de antígeno de secciones rehidratadas de 3 µm se sumergieron en ácido cítrico y se trataron en el microondas durante tres minutos. Los tejidos se bloquearon con suero equino normal al 20 % conteniendo tritón X-100 al 0.2 % durante 1,5 horas y se incubaron durante una noche con policlonal de conejo anti subunidades del neurofilamento pesada, media o ligera (1:200, Novus Biologicals) junto con anti-MBP de rata (1:50, Abcam). Después se lavaron las secciones 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 fluorescentes digitales de 0,08 y 0,5 mm² de raíces en un microscopio E600 Nikon (Nikon, Tokio, Japón) equipado con objetivos Plan Fluor y conectado a una cámara CCD (DMX1200F, Nikon). La densidad media de la tinción de axones individuales y el número de axones en las raíces se analizó utilizando el programa informático Image-Pro plus 4.1.
- Análisis del músculo y del punto de unión neuromuscular: Se sumergieron los músculos gastrocnemio medial y tibial anterior en bungarotoxina marcada con rodamina durante cinco minutos (Molecular Probes; 1:200 en PBS), y después se disecaron. Los músculos disecados se aclararon en PBS, se fijaron en PFA-PBS al 1 % (pH 7,3) durante 1 hora y se equilibraron en sacarosa al 30 %. Se incubaron secciones congeladas de músculo de un espesor de 40 µm durante una noche con anticuerpos policlonales suscitados en conejo contra el neurofilamento (Novus) o sinaptofisina (Dako). Para la detección secundaria se usó anti conejo conjugado con Cy2 (1:200, Jackson).
- Para el análisis de la fibra angular, se tiñeron con hematoxilina y eosina secciones incluidas en parafina de los músculos gastrocnemio medial y tibial anterior.
- Diferenciación de neuronas motoras y micromatrices de miARN: Se diferenciaron células madre embrionarias de ratón (CME_m) de un ratón Tg(H1xb9-GFP)1Tmj Tg(SMN2)89Ahmb *Smn1*^{tm1Msd}/J (número de almacenamiento del

laboratorio Jackson 006570), en neuronas motoras como se describió previamente [Wichterle, H., *et al.*, Cell 110, 385-97 (2002)]. Después de la disociación de los cuerpos embrioides, las neuronas motoras GFP+ se purificaron a través de un separador de células de alta velocidad MoFlo (Beckman Coulter) utilizando una boquilla de 100 μm a 2,04 atm. Las neuronas motoras se sembraron en portaobjetos recubiertos de poli-d-lisina y laminina (BioCoat Cellware) y se pusieron en pocillos orientadas hacia una monocapa de células astrogiales primarias de ratón para proporcionar soporte trófico.

El ARN total de neuronas motoras se extrajo utilizando TRI-Reagent (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se evaluó la integridad del ARN usando el bioanalizador Agilent 2100. Muestras independientes de ARN de SMN1^{mut} y los controles se marcaron con un kit de marcaje miRCURY Hy3/Hy5 (Exiqon) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar el sesgo asociado al colorante, el diseño experimental implicó la alternancia del marcador colorante en la mitad de las muestras. La hibridación sobre un portaobjetos de micromatriz de miRCURY LNA se siguió de exploración en un escáner de mitromatrices de ADN Agilent (Agilent Technologies). Después de la exploración de las micromatrices, los datos de intensidad sin procesar se extrajeron usando el lector Spot- Reader (Niles Scientific).

Análisis de expresión de miARN por RT-PCR: Se obtuvo y analizó la expresión cuantitativa miARN en neuronas motoras derivadas usando un sistema de PCR en Tiempo Real LightCycler 480 de Roche (Roche Applied Science). Se realizaron ensayos Taqman de micro-ARN para miR-9 y miR-9* (Applied Biosystems), como se describió de forma previa [Chen *et al.*, Nucleic Acids Res 33, e179 (2005)]. Como control interno se usó el ARN pequeño sno234.

Clonación de las 3' UTR de las subunidades del neurofilamento y de Onecut2: las secuencias 3' UTR de NFP (SEC ID N°: 8), de NFM (SEC ID N°: 9), de NFL (SEC ID N°: 10) y de Onecut2 (SEC ID N°: 11) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de ratón. La secuencia de la 3' UTR de NFH mutada, careciendo de todas las secuencias semillas de miR-9, se sintetizó con protuberancias de Xba1 y se insertó en el plásmido PBluscript (Epoch Biolabs) (SEC ID N°: 12).

Los fragmentos 3' UTR se ligaron en el vector pGem-T easy (Promega) de acuerdo con las directrices del fabricante, y adicionalmente se subclonaron en el sitio Xba1 en el extremo 3' de luciferasa en el vector de destino pGL3-control (Promega). La orientación de clonación se verificó mediante cortes diagnósticos y mediante secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa: Las células HEK 293T crecieron en formato de 24 pocillos en poli-1-lisina hasta una confluencia del 70-85 % y se transfectaron usando Polietilenimina con los siguientes plásmidos: 20 ng de plásmido de beta-galactosidasa, 10 ng de plásmido pGL3-control-3' UTR y 430 ng de los plásmidos de sobreexpresión de miR-9 o miR-vec vacío. Los datos del ensayo de luciferasa Firefly (Promega) realizado 48 horas después de la transfección, se normalizaron con los niveles de betagalactosidasa y se promediaron entre repeticiones de seis pocillos por condición.

Análisis estadísticos: Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (EE). Para la comparación de los dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student. El valor estadístico se realizó usando el programa informático SPSS (SPSS Inc., Chicago). Para los datos de la matriz de miARN el análisis se realizó usando el paquete Limma del proyecto Bioconductor (<http://www.dotbioconductor.org>). Dentro de las matrices se aplicó la normalización LOESS y entre las matrices la normalización Aquantile. El control de calidad estándar se realizó usando las funciones de representación de Limma.

EJEMPLO 1

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

Para evaluar la implicación de miARN en las patologías de neuronas motoras (NM), los presentes inventores eliminaron de forma específica Dicer1 en NM postmitóticas postnatales, cruzando un alelo Dicer1 condicional con un transgén de recombinasa de Cre, dirigido por un promotor colinérgico específico que se expresa en NM postmitóticas pero en desarrollo (transportador de Acetilcolina Vesicular; TACV-Cre). Dado que se necesita la actividad de Dicer para el procesamiento *in vivo* de miARN, los animales TACV-Cre; Dicer^{flx/flx} (también denominados posteriormente como "NMDicer^{mut}") perdieron la capacidad de producir miARN funcionales en un subconjunto de NM somáticas postmitóticas y, por lo tanto, proporcionan un modelo convincente para la pérdida de función de miARN en NM.

Mientras que los animales heterocigotos TACV-Cre; Dicerflx/+ ("controles") son aparentemente normales, los ratones NMDicer^{mut} presentan una esperanza de vida significativamente más corta y una pérdida de peso progresiva (Figuras 1A-B). Para entender mejor la patología de estos ratones, se realizó una extensa serie de pruebas funcionales para evaluar su actividad cinética. A partir de los dos meses de edad los ratones NMDicer^{mut} fueron inferiores que los controles en una "prueba del poste vertical" (Figura 1C). El ensayo "de campo" controlado por video reveló que los ratones NMDicer^{mut} recorrían de forma progresiva menores distancias y se levantaban menos que los controles sobre las patas traseras (Figuras 1D-E). Adicionalmente, un estudio en la jaula a través del ciclo circadiano, usando el sistema InfraMot, indicó que la actividad locomotora de los NMDicer^{mut} se deteriora de forma

gradual en comparación con los controles (Figuras 1F-H). Se podría hacer la hipótesis de que este deterioro evidente en la fuerza física es probable que sea consecuencia de la atrofia muscular.

EJEMPLO 2

5

El NMDicer^{mut} muestra atrofia muscular por denervación

10

Para caracterizar de forma directa el fenotipo muscular, se realizó un estudio electromiográfico (EMG) que mostró potenciales de fibrilación frecuentes. Estos datos son coherentes con un proceso de denervación en curso, que probablemente es subyacente a la atrofia muscular (Figuras 2A-B). En la histología muscular los NMDicer^{mut} muestran también miofibras angulares, un signo patognomónico de atrofia muscular relacionado con denervación (Figura 2C), y temblor que también puede atribuirse a denervación (datos no mostrados). Considerado en su conjunto, se podría concluir que los animales NMDicer^{mut} sufren atrofia muscular por denervación, lo que sugiere pérdida de NM.

15

EJEMPLO 3

En los NMDicer^{mut} se pierden neuronas motoras

20

Mediante histología de la médula espinal se observó un descenso en los números de pericariones grandes (>20 mm de diámetro) en el cuerno ventral de la médula espinal lumbar (tinción de Nissl, Figuras 3A-C). La inmunorreactividad negativa para TUNEL y para caspasa-3 activada (datos no mostrados), es consistente con un perfil típico de muerte lenta de NM encontrado en muchas enfermedades de neuronas motoras (ENM). A menudo la astrocitosis reactiva se toma como una indicación de toxicidad neuronal o de muerte neuronal, por lo tanto, se cuantificaron los niveles de expresión de la proteína ácida fibrilar glial (PAFG) en secciones de médulas espinales lumbares. Se observó inmunorreactividad de PAFG potenciada en las facetas lateroventrales de las secciones de médula espinal lumbar, lo que implica astrocitosis reactiva y respaldo adicional a la pérdida de NM (Figuras 3D-F).

25

EJEMPLO 4

30

Signos de axonopatía de degeneración ("dying back") en los NMDicer^{mut}

35

La disfunción y/o degeneración del punto de unión neuromuscular (PNM) acompaña e incluso precede la pérdida de cuerpos de neuronas motoras en algunos modelos de ELA. Por lo tanto, los presentes inventores procedieron a evaluar defectos potenciales de axonales distales en los NMDicer^{mut}. A los cuatro meses de edad, la arquitectura aberrante de la placa motora fue el doble de frecuente en los puntos de unión neuromusculares del músculo Tibial en ratones NMDicer^{mut} con respecto a los controles (Figura 3G-M). Estos datos implican que se puede documentar la disfunción de la neurona motora en axones vivos de ratones NMDicer^{mut}, de manera semejante a la patofisiología de degeneración observada de forma previa en otros modelos de ENM. Esto es interesante, dado que se sabe que los miARN tienen función distal perisináptica, lo que sugiere que una neuropatía de aparición temprana, relacionada con miARN, puede preceder a la muerte pericarial en el modelo Dicer. Por consiguiente, se evaluó una población específica de axones motores proximales en la raíz ventral, antes de que se unan con los axones sensoriales. Cuando se compararon con los controles, los ratones NMDicer^{mut} mostraron una disminución significativo de axones de NM, mientras que los axones sensoriales de la raíz dorsal permanecieron intactos (Figuras 3N-P).

40

45

EJEMPLO 5

Los NMDicer^{mut} no logran coordinar la estequiometría de la subunidad del neurofilamento

50

La alteración de la regulación de la expresión coordinada de las subunidades ligera, media y pesada (NEFL, NEFM, NEFP, respectivamente) del neurofilamento (NF), provoca defectos en el citoesqueleto del axón. Por ejemplo, las mutaciones de NEFL provocan neuropatía motora Charcot-Marie-Tooth tipo 2E. Adicionalmente, la perturbación experimental del balance fino del neurofilamento en modelos de ratón, conduce a fenotipos que se asemejan de forma estrecha a patologías de neuronas motoras de ser humano, y se sugirió de forma previa como un componente de ELA de ser humano.

55

De forma más específica, la regulación postranscripcional de la expresión génica del neurofilamento desempeña una función clave en la salud neuronal, y se sugirió que la delección del tramo final de NEFP es un componente de la esclerosis lateral amiotrófica.

60

La expresión del NF se regula mediante la región no traducida 3' (3'UTR) del ARNm, la que parece que interactúa con un factor no caracterizado que actúa en *trans* que está atenuado en ELA [Ge *et al.*, J Biol Chem 278, 26558-63 (2003)]. Se analizaron los niveles de expresión relativos de las proteínas subunidades del NF en ratones NMDicer^{mut} y en controles hermanos. La cuantificación de la señal inmunofluorescente del NF en aproximadamente dos mil axones lumbares, reveló que los niveles de expresión de NEFL y NEFM eran comparables con el del tipo silvestre.

65

Sin embargo, la expresión de la subunidad pesada (NEFP) está regulada positivamente de forma específica en los NMDicer^{mut} (Figuras 4A-C).

EJEMPLO 6

5

Mediante miR-9 se obtiene la expresión coordinada de las subunidades del neurofilamento

Para valorar la posibilidad de una implicación de miARN en la regulación positiva de NEFP en los ratones NMDicer^{mut}, se buscaron en las secuencias de NF sitios potenciales de unión a miARN. Se encontró un único sitio de unión a miR-9 en el ARNm de NEFL. Por el contrario, el ARNm de NEFP aloja 9 sitios de unión a miR-9, dispersos en la 3'UTR del ARNm de NEFP y en la porción 3' de la región codificante (Figura 4D). De forma importante, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la interacción de miR-9 con sus sitios diana potenciales afecta al ARNm de NEFP en un ensayo de indicador heterólogo, en el que esto depende de la presencia de los sitios de unión semilla (Figura 4E). Estos datos sugieren fuertemente un modelo donde la pérdida de la expresión o la actividad de miR-9 puede dar como resultado la desrepresión de NEFP y, de forma subsecuente, la desregulación de la estequiometría del NF.

EJEMPLO 7

20 miR-9 está regulado negativamente de forma específica en un modelo de atrofia muscular espinal

Para relacionar estos resultados a la patogénesis observada en otros modelos de ENM, los niveles de expresión de miARN se caracterizaron en un modelo de atrofia muscular espinal (AME), una ENM pediátrica provocada por mutaciones en el gen SMN1. De forma notable, la desregulación de la expresión del neurofilamento, que recuerda a aquellas observadas en el modelo Dicer1, se notificó en mutantes de SMN1, y SMN1 está funcionalmente comprometido en los complejos miARN-proteína en células de ser humano. Células madre embrionarias alojando una mutación SMN1 se diferenciaron *in vitro* en neuronas motoras. A continuación, se exploró una micromatriz de miARN (oligoplateforma LNA, Exiqon) con ARN marcado extraído de NM de SMN1^{mut} purificadas por FACS. La comparación directa del ARN de NM del tipo silvestre y de SMN1^{mut} reveló que la expresión de solo algunos miARN disminuyó de forma significativa en NM de SMN1^{mut}. De forma interesante, los miARN regulados negativamente de forma más significativa resultaron ser miR-9 y miR-9* (Figura 4F). Estos dos miARN se procesan a partir de la misma horquilla, y la cuantificación por PCRc reveló una disminución de hasta 15 veces en sus niveles de expresión en NM de SMN1^{mut} (Figura 4G).

35 Considerado en su conjunto, los presentes inventores presentan un nuevo modelo para ENM, en base a la pérdida de función de Dicer1. En este modelo, la pérdida de actividad de miARN específica de NM da como resultado atrofia muscular por denervación. De forma adicional, probablemente contribuyen a la enfermedad los cambios en los niveles de expresión de las subunidades del neurofilamento. Este fenotipo se atribuye a la desregulación de miR-9, que se encuentra cadena arriba de los ARNm del neurofilamento. La importancia de miR-9 para las ENM radica en su expresión específica en neuronas, en su drástica regulación negativa en neuronas motoras deficientes en SMN1.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Yeda Research And Development Co. Ltd.
Hornstein, Eran
Chen, Alon
Haramati, Sharon
Chapnik, Elik

50 <120> MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE LAS NEURONAS MOTORAS

<130> P6036568EP1

55 <150> US 61/193.535
<151> 05-12-2008

<160> 12

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ARN

65 <213> Homo sapiens

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> miARN-9	
5	<400> 1	
	ucuuugguua ucuagcugua uga23	
	<210> 2	
	<211> 22	
10	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
15	<223> miARN-9*	
	<400> 2	
	auaaagcuag auaaccgaaa gu22	
20	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda de oligonucleótido de detección de miARN-9 ejemplar	
	<400> 3	
	tcatacagct agataaccaa aga23	
30	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda de oligonucleótido de detección de miARN-9* ejemplar	
	<400> 4	
40	acttcggtt atctagctt at22	
	<210> 5	
	<211> 89	
	<212> ARN	
45	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Horquilla precursora de hsa-mir-9-1	
50	<400> 5	
	cgggguuggu uguuauuuu gguuaucuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag	60
	cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca	89
55	<210> 6	
	<211> 87	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Horquilla precursora de hsa-mir-9-2	

ES 2 554 765 T3

<400> 6

ggaagcgagu uguuaucuuu gguuaucuag cuguauagagu guauuggucu ucauaaagcu 60

agauaaccga aaguaaaaac uccuuca 87

5 <210> 7
<211> 90
<212> ARN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> misc_feature
<223> Horquilla precursora de hsa-mir-9-3

<400> 7

15 **ggaggcccg uucucucuuu gguuaucuag cuguauagagu gccacagagc cgucauaaag 60**

cuagauaacc gaaaguagaa augauucuca 90

20 <210> 8
<211> 1206
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

25 <400> 8

ES 2 554 765 T3

ccctctagag gaggtaaaag ccaagaacc cccaagaag gtagaagaag agaagacact 60
 gcctacacca aagacagagg cgaaggagag taagaagac gaagctcca aggaggcccc 120
 gaagccaag gtggaggaga agaaggaaac tcccacggaa aagccaagg actctacagc 180
 agaagccaag aaggaagagg ctggagagaa gaagaaagcc gtggcctcag aggaggagac 240
 tcctgccaaag ttgggtgtga aggaagaagc taaacccaaa gagaagacag agacaaccaa 300
 gacagaagca gaagacacca aggccaaga acctagcaaa cccacagaga cggaaaagcc 360
 aaagaaagag gagatgccag cggcaccaga gaagaaagac accaaggagg agaagaccac 420
 agagtccagg aagcctgagg agaagcccaa aatggaggcc aaggtcaagg aggatgacaa 480
 gagcctttcc aaagagccta gcaaacccaa gacagaaaag gctgaaaaat cctctagcac 540
 agaccagaaa gaaagccagc cccagagaa gaccacagag gacaaggcca ccaagggaga 600
 gaagtaagag aacaagagaa acaccagaa tagccaaaga aactcaggac ggtcccagta 660
 ctcaggggtc ggcgtaataa attttatttc ttcccttccc tccgtaagaa gaaacactgc 720
 ttagatggtg ggccctgccct caccaaacag gaatttctat taagattaag ttagcaagag 780
 aagataaccc tgagccttgt cccccagcc gaaaaccctc ccaggtgat ggacaattat 840
 gatagcttct ttagcogaa cgtgatgtat gctgaacgct acgcgtaaaa cacgcgtcta 900
 aaaactgcc cctccttcc aagtaagtgc atttatttcc tgtatgtcca actgacagat 960
 gaccgcaata atgaatgagc agttagaaac gcattatgct tgaaatggtg taacctattc 1020
 ctgaatgoc tcttgtttc caaaggagt gtcaggccct tgcccagtac acgctcctgg 1080
 aagagctgca gcaggtgagg cagggcgctg gccactgaac cacgccaggg tgtactctcc 1140
 actgaagtcc actttcaatt gcttccatgc aataaaacca agtgcttctg aaataaatct 1200
 agaggg 1206

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

5

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

10

<400> 9

ccctctagaa tcggagtccg ttgcaaaagg ttaagccata cgacaatttc aaaatgcatg 60
 tgattgacag cttcaaaaca gaatgggttc tcccatgggg gctccagaca ttgtattttc 120
 ctttgtgoaa tatgagggaa ctgcatgcaa gctcagggtg cccccctcct cagtcttgg 180
 ggggaattca aatgcatgat cgtgtatgta cctagggaaat tcgccagttt cctgagctgt 240
 tggagaggg gcactcgggg gggatgtcct gagatgtatt atgcagagta ccaactgagc 300

ES 2 554 765 T3

caaaaataat aagtgaaca gaactctctt agcettaaga aagctatata tgaatactta 360
 cgtttacctc actggtgcat ttaaatgga cttctgttca tgggagaacc ttgctgatct 420
 gcacagttcg caaccttacc ttgatcgatg taaatgtca cagcagtcct tgctcaataa 480
 aggtcatact ggaacataa tctagaggg 509

5 <210> 10
 <211> 347
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 3' UTR de NFL clonada
 <400> 10

ccctctagaa gaagaaagat tgagccctat tcccaactat tocaggaaa gttctcccca 60
 atcaggtaa cctcatcacc aaccaaccag ttgagttcca gatcctatac aaattaagaa 120
 gtcaatacat gtataattct gagatgactt aggttggact ttcaatgttg tgctatgaat 180
 ttctctctta cgcagagtat ctgtttgctt gcagagtggc tttctggctt gctgccagcc 240
 tgtgcatggt ccatgcttat gagttcagga tctatggcaa tgtgaatcac acagatgttt 300
 acaataataa taaaaaaaaa accacacaca caacacgatc tagaggg 347

15 <210> 11
 <211> 1238
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> 3' UTR de Onecut2 clonada
 <400> 11

ES 2 554 765 T3

```

ccctctagac caaagaagca gaatactgca aaccaaaagac atttgttacc tgccattttc      60
tagcctacaa atactgtgat tactttttaga gatcagagca cctctgtaac tccgagtggc      120
attcggetct tgtcttgggc tcaccacctg gctgagcaga ccagctacat caatgacatt      180
agccaaatat cggggcagtg acttcgccac gccagccctg gttggtcacc tccccatagc      240
aagtgaaaga gggcccacag aactctggga gattacaaag gtcactatgt gcatatttac      300
cagtgaatgg ccccaggtgg gcaccaaggg gtgttcggag caagccaaaa gcttcgatga      360
ctctttacag acacttgaga ctgacttttg tatgaattgc ttaattgaaa ccaaagaaac      420
ttttttctg cacctacttc tgcaacaaac agaactgtcc cattgaatga gtaaattggt      480
ccaccaatca ctggaaatca ccatcaacag aaaaagcacg ctagaatgaa agaacaaca      540
aaaccaccga agacacactg tgttcaaaca gaccttttgg gacgctotta tttttatatt      600
ttttatttt tggaagcaga tttgaaagaa agggttgaga cacaaatcaa cagacgagcc      660

tcaatggctg ctgcttcata tgacaactca ctcggtaatc ttaacttga agattgtctt      720
taatttgtgc ctatgcagtt tttcaaaaga acatggaaac agagcaacag aaacctcaac      780
agctacaata ccaaatgaga ggattctcac acctttttgt ctcagttcat taccttcttt      840
tgcttggtc aaatacttat agcgtcattg atctgtacaa aggtaatcga ttttgtttct      900
ttaagcaaca aaaggaaagg gtcatttgtt tgattttatt gtttcccttt agttttgttt      960
tatggctttt acccaacatg gaatctcccc cctacacata aagttccatg gactccaaac     1020
ttgagatgtc gggatactga aaggtgtccc tttctctcct cagcagagca tgggaaatac     1080
gattgtcgtc tgaatgtctg tggcttaacc cttagacttg gttgcttctg tgttcagtgt     1140
tgtcattagg ggaggggaagg ggagcaagga tcaggggtag gagtctaggt gatccgcctt     1200
ttccagaacc aaagaattta tagagaaatt ctagagggg                               1238

```

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

5

<220>
 <223> vector de clonación pBluescript

10

<400> 12

ES 2 554 765 T3

gaatatctag agagaacaag agaaacaccc agaatagaac tcaggacggt cccagtactc	60
aggggtcggc gtaataaatt ttatttcttc ctttcctcc gtaagaagaa aactgctta	120
gatggtggc ctgccctcac caaacaggaa tttotattaa gattaagta gcaagagaag	180
ataaccctga gccttgcctc ccacgccgaa aaccctcccc aggtgatgga caattatgat	240
agcttcttgt agccgaacgt gatgtatgct gaacgctacg cgtaaaacac gcgtctaaa	300
actgccccct cctttccaag taagtgcatt tatttctctg atgtccaact gacagatgac	360
cgcaataatg aatgagcagt tagaaacgca ttatgcttga aatggtgtaa cctattcctg	420
aatgccttct tgttttgagt ggtcaggccc ttgccagta cacgctcctg gaagagctgc	480
agcaggtgag gcagggcgct ggccactgaa ccacgccagg gtgtactctc cactgaagtc	540
cactttcaat tgcttccatg caataaaacc aagtgttctt gaaataaatc tagaaaacac	600

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de miARN-9 o miARN-9* para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en un sujeto que lo necesite.
2. miARN-9 o miARN-9* para su uso en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en un sujeto que lo necesite.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1, o miARN-9 o miARN-9* de la reivindicación 2, donde dicho miARN-9 es como se indica en SEC ID N°: 1.
4. El uso de la reivindicación 1, o miARN-9 o miARN-9* de la reivindicación 2, donde dicho miARN-9* es como se indica en SEC ID N°: 2.
- 15 5. El uso de la reivindicación 1, o miARN-9 o miARN-9* de la reivindicación 2, donde el sujeto es un ser humano.

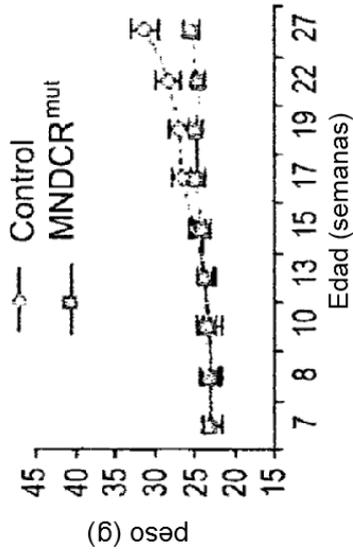


FIG. 1B



FIG. 1A

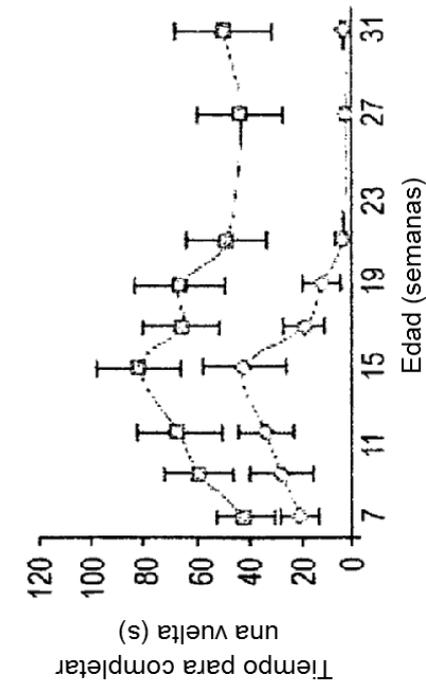


FIG. 1C

Control
MNDCR mut

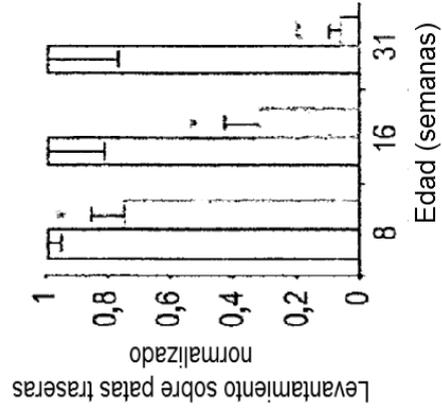


FIG. 1D

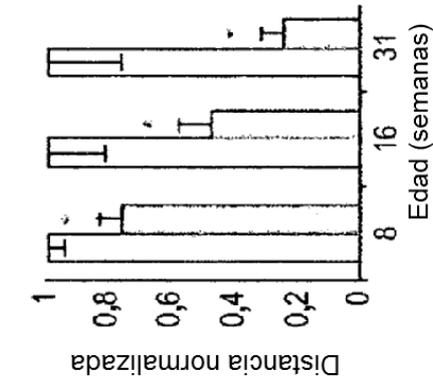


FIG. 1E

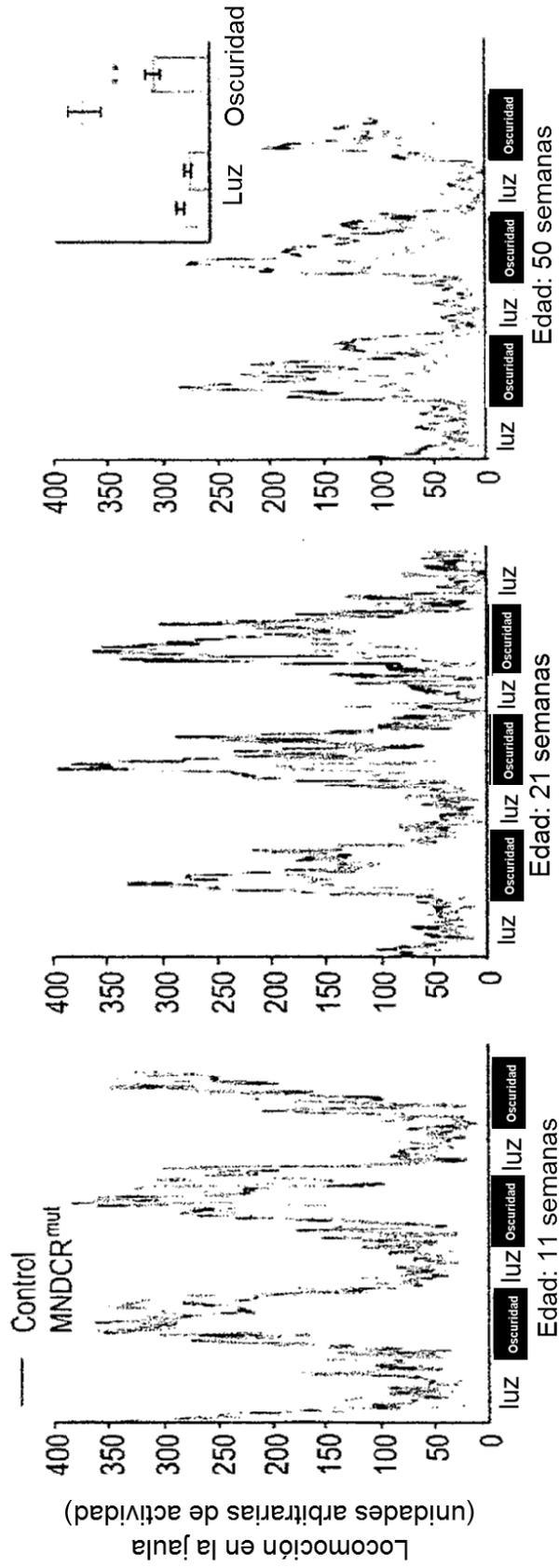


FIG. 1H

FIG. 1G

FIG. 1F

FIG. 2A



FIG. 2B

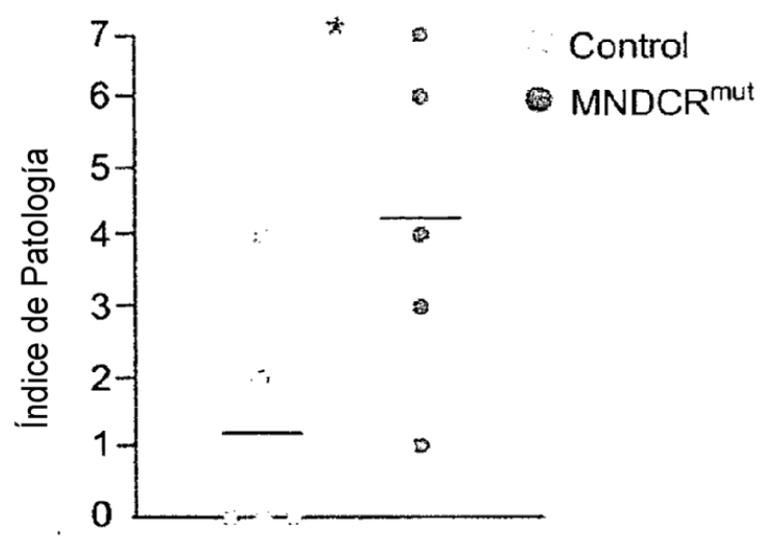
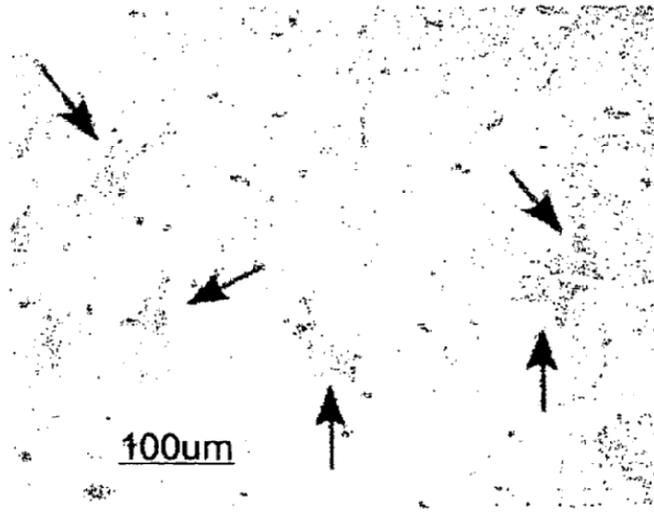


FIG. 2C



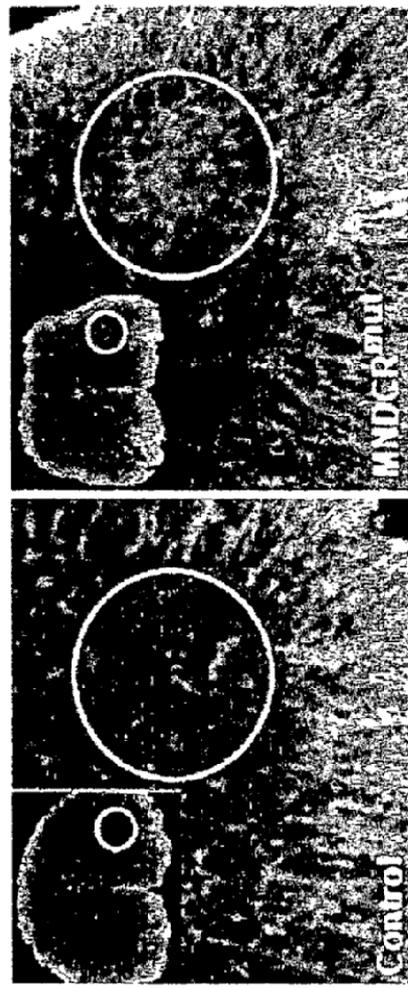
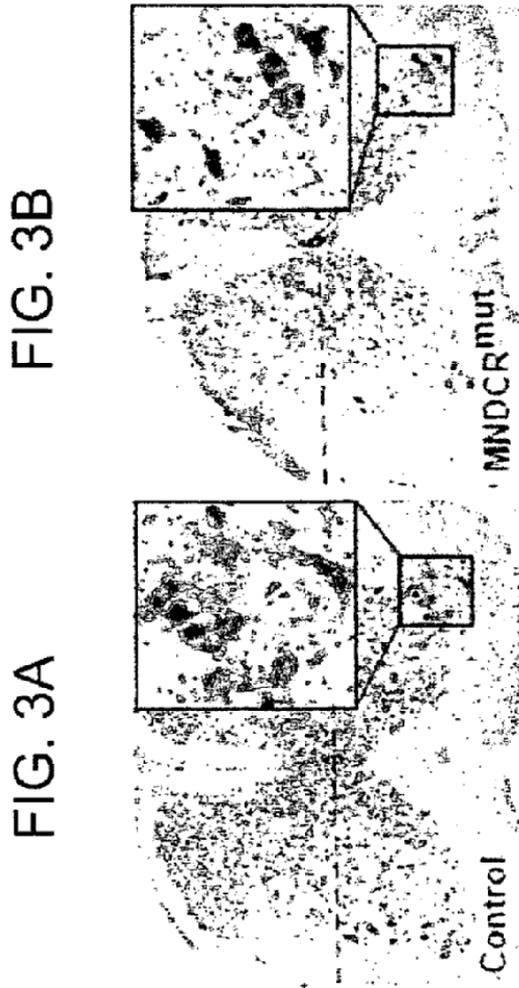
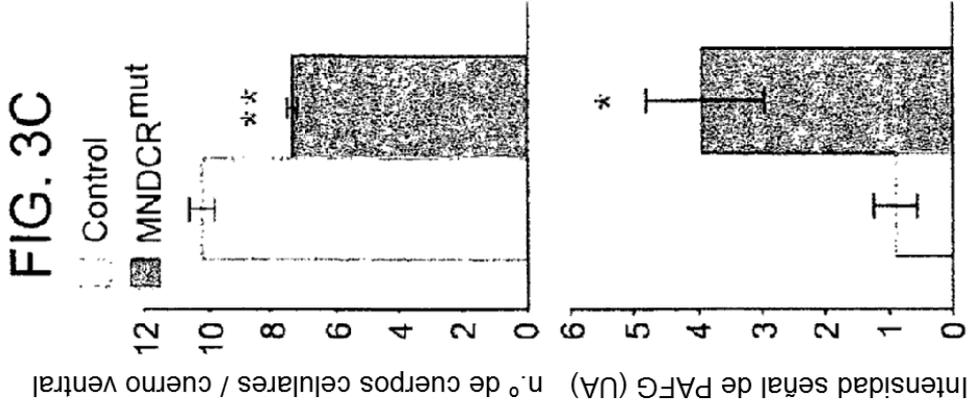


FIG. 3F

FIG. 3E

FIG. 3D



FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 3I



FIG. 3J

FIG. 3K

FIG. 3L

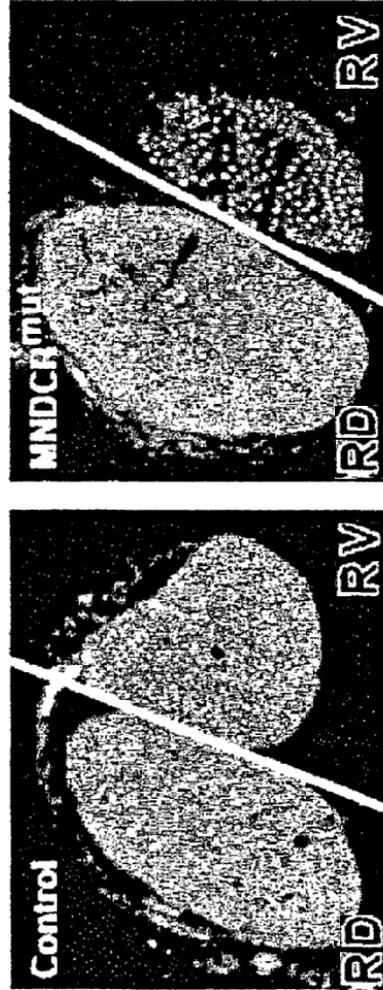


FIG. 3N

FIG. 3O

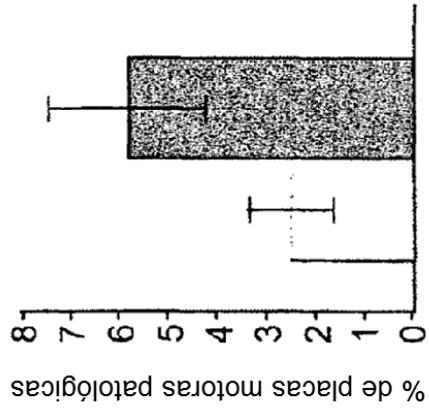


FIG. 3M

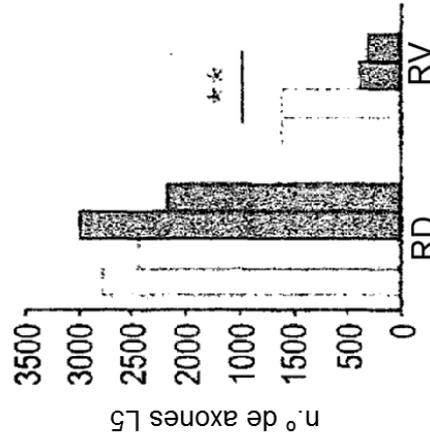


FIG. 3P

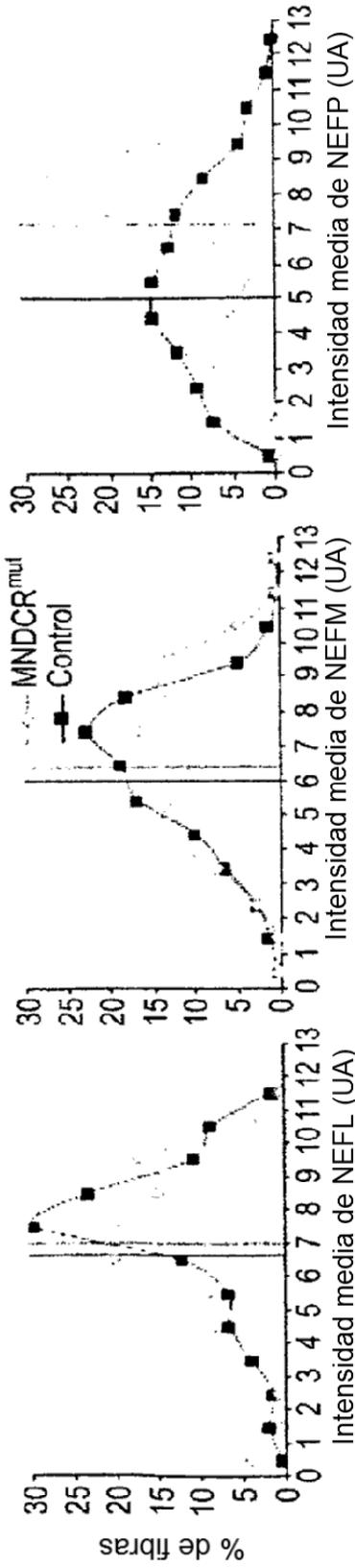


FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

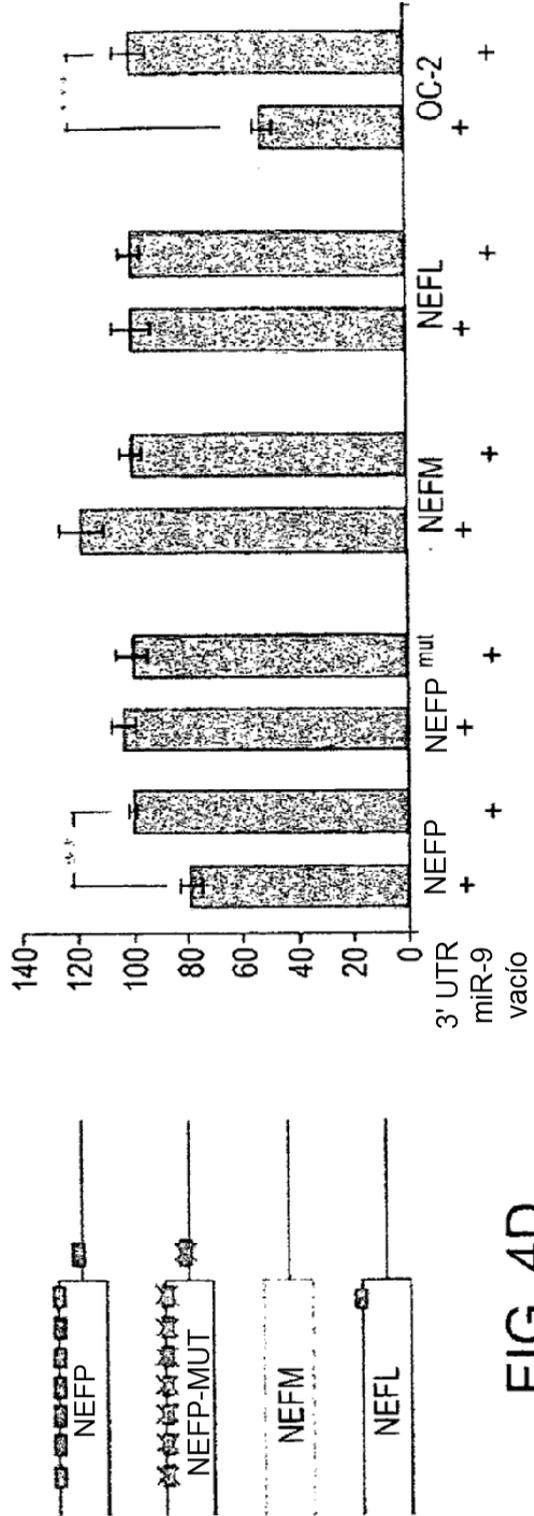


FIG. 4D

FIG. 4E

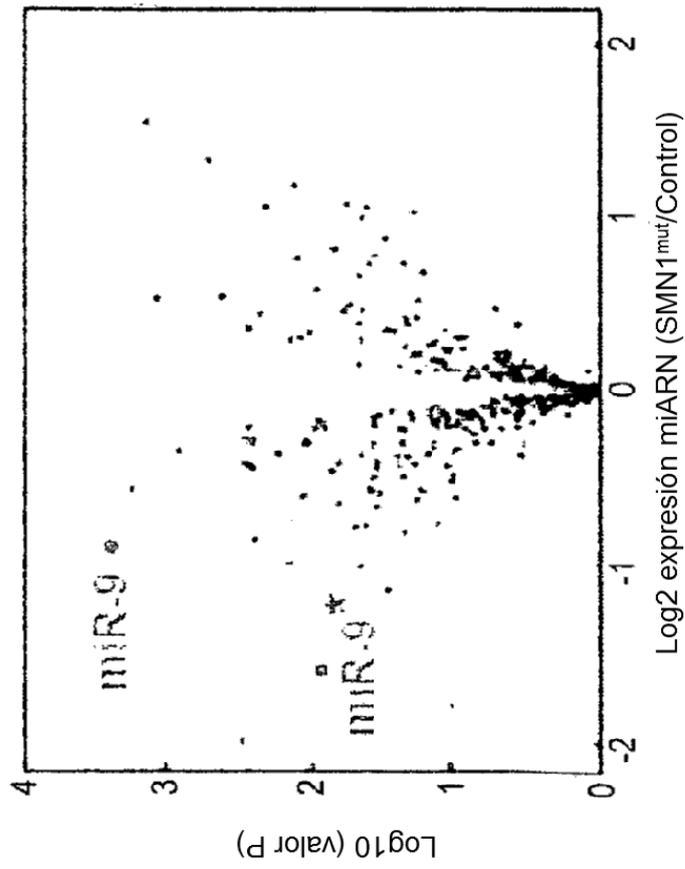


FIG. 4F

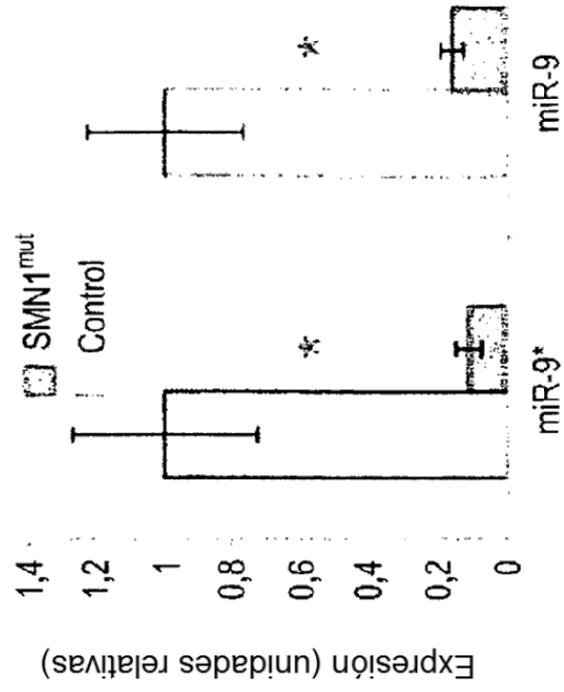


FIG. 4G