

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 499**

51 Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016 PCT/EP2016/063362**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198645**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16732520 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 3307392**

54 Título: **Métodos para el tratamiento y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y lesiones cerebrales traumáticas**

30 Prioridad:

12.06.2015 EP 15305913

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

22.11.2019

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris Cédex 13 , FR;

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE -CNRS- (33.3%) y

SORBONNE UNIVERSITÉ (33.3%)

72 Inventor/es:

LEVEILLARD, THIERRY;

SAHEL, JOSÉ-ALAIN y

CAMARA, HAWA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 732 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para el tratamiento y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y lesiones cerebrales traumáticas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento y diagnóstico de taupatías tales como la enfermedad de Alzheimer y lesiones cerebrales traumáticas.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer representa del 60% al 70% de los casos de demencia. Es una enfermedad neurodegenerativa crónica que por lo general comienza lentamente y empeora con el tiempo. El síntoma inicial más común es la dificultad para recordar hechos recientes (pérdida de memoria a corto plazo). A medida que avanza la enfermedad, los síntomas pueden incluir: problemas con el lenguaje, desorientación (que incluyen perderse con facilidad), cambios de humor, pérdida de motivación, la falta de manejo del autocuidado, y problemas de comportamiento. A medida que la afección de una persona disminuye, él o ella a menudo se aleja de la familia y la sociedad. Poco a poco, se pierden las funciones corporales, en última instancia se conduce a la muerte. Si bien la velocidad de progresión puede variar, la esperanza promedio de vida tras el diagnóstico es de tres a nueve años.

15 En 2010, había entre 21 y 35 millones de personas en todo el mundo con la enfermedad de Alzheimer. Con el envejecimiento de la población, en los países desarrollados, la enfermedad de Alzheimer es una de las enfermedades económicamente más costosas.

20 En los cerebros de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer, se halló que la proteína Tau (una proteína asociada a microtúbulos que tiene un papel en el montaje y la estabilización de los microtúbulos) estaba hiperfosforilada, lo que lleva a la agregación de la proteína y a una disminución de la unión de Tau a los microtúbulos, lo que da como resultado la muerte celular. La Tau fosforilada también es tóxica para las células neuronales.

Se han reportado otras enfermedades neurodegenerativas asociadas con la agregación patológica de Tau, y se designan de manera colectiva como "taupatías".

25 Se están haciendo progresos en la comprensión de los mecanismos subyacentes a las taupatías, tales como la enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, sigue habiendo una necesidad en la técnica de terapias eficaces y de biomarcadores de la enfermedad que permitan la detección de la enfermedad en una etapa muy temprana.

Compendio de la invención

30 La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento y diagnóstico de taupatías tales como la enfermedad de Alzheimer y lesiones cerebrales traumáticas. Más en particular, la presente invención se basa en el descubrimiento de que el silenciador de corte y empalme, HNRNPC, juega un papel en el corte y empalme aberrante del gen *NXNL2* en el cerebro de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer y que dicho corte y empalme aberrante está asociado con la enfermedad de Alzheimer.

35 La invención se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una ribonucleoproteína heterogénea nuclear C (HNRNPC, por su sigla en inglés) para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de una taupatía.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica HNRNPC.

40 En otro aspecto, la invención se refiere también a un método para la detección de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección del nivel de HNRNPC en una muestra obtenida de dicho paciente.

Descripción detallada de la invención

Vectores de expresión, composición farmacéutica y métodos terapéuticos de la invención

45 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "HNRNPC" o "ribonucleoproteína heterogénea nuclear C" se refiere a la proteína de unión al ARN codificada por el gen *HNRNPC* e identificada por Stone *et al.*, (JBC, 2002, 277, 15621-8). Abarca tanto isoformas como HNRNPC1 y HNRNPC2, que difieren en 13 aminoácidos.

50 La invención se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica HNRNPC para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de una taupatía. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica

HNRNPC.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "taupatía" tiene su significado general en la técnica. Se refiere a la clase de enfermedades neurodegenerativas asociadas con la agregación patológica de la proteína Tau en el cerebro. Las taupatías incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Alzheimer, una lesión cerebral traumática, la demencia frontotemporal, que incluyen el subtipo de demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17, por su sigla en inglés), la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal, la enfermedad de Pick, y la enfermedad de granos argirófilos.

En una forma de realización particular, dicha taupatía se selecciona entre el grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer y una lesión cerebral traumática.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, los términos "prevención" y "prevenir" se refieren al hecho de la detención/retraso de la aparición de una taupatía, la reducción del riesgo de una taupatía, o la ralentización del desarrollo de dicha taupatía. También se puede referir a la prevención o la ralentización de uno o más síntomas de una taupatía (tal como la agregación patológica de la proteína Tau).

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "vector de expresión" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico dada, que está unida de manera operativa a una secuencia o promotor de control de la expresión. En particular, un vector de expresión de acuerdo con la invención es un vector que permite la expresión de una secuencia de ácido nucleico dada en la proteína codificada por dicha secuencia de ácido nucleico en una célula huésped eucariota. El promotor de dicho vector de expresión de manera típica es un promotor eucariota.

Los vectores de expresión de la presente invención pueden ser un plásmido o un vector viral. Un plásmido es un bucle de ADN de doble cadena circular que es capaz de la replicación autónoma. Un vector viral es una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias virales que se pueden empaquetar en partículas virales. Una variedad de vectores virales son conocidos en la técnica y se pueden adaptar a la práctica de esta invención, que incluyen por ej., adenovirus, AAV, retrovirus, adeno-AAV híbrido, lentivirus y otros. Al llevar a cabo una experimentación rutinaria, aquéllos con experiencia en la técnica puede elegir entre la variedad de vectores disponibles, aquellos que son adecuados para llevar a cabo el método de la invención.

En una forma de realización particular, el vector de expresión es un vector adeno-asociado (AAV, por su sigla en inglés).

Los AAV se han sido descritos de manera amplia en la técnica como vectores adecuados para la administración de genes.

De hecho, los AAV no son patógenos y exhiben una amplia gama de especificidad de tejido. De manera típica, los AAV de acuerdo con la presente invención son los AAV que son capaces de dirigir el ácido nucleico que codifica HNRNPC al cerebro.

Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, AAV2, AAV2/8, AAV9, y AAV7m8.

El vector de expresión de la invención se puede combinar con excipientes aceptables para uso farmacéutico, y, de manera opcional, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Los términos "farmacéuticamente" o "aceptable para uso farmacéutico" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra cuando se administra a un mamífero, en especial un ser humano, de acuerdo con lo apropiado. Un portador o excipiente aceptable para uso farmacéutico se refiere a un sólido no tóxico, un agente de carga semi-sólido o líquido, un diluyente, un material de encapsulación o un auxiliar de formulación de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o de la mucosa, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma unitaria de administración, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas unitarias de administración apropiadas comprenden las formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Con preferencia, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son aceptables para uso farmacéutico para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser, en particular soluciones isotónicas, salinas estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, en especial liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables.

5 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

10 Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales aceptables para uso farmacológico se pueden preparar en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

15 Las soluciones inyectables estériles se preparan por medio de la incorporación del vector de expresión en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con uno o varios de los otros componentes enumerados con anterioridad, de acuerdo con lo requerido, seguido por la esterilización por medio de filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan por medio de la incorporación de los diversos componentes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados con anterioridad. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del componente activo más cualquier componente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por medio de la filtración del mismo.

20 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea efectiva para uso terapéutico. Las formulaciones se administran con facilidad en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas con anterioridad, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

25 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar de manera adecuada si es necesario y el diluyente líquido primero hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son en especial adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por aquéllos con experiencia en la técnica a la luz de la presente revelación. Por ejemplo, una dosificación se podría disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

30 Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas aceptables para uso farmacéutico incluyen, por ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente en uso.

35 En una forma de realización particular, el vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica HNRNPC se administra en combinación con otro agente activo.

40 De manera típica, el vector de expresión se puede administrar en combinación con un agente utilizado para evitar las taupatías, tal como un agente antioxidante. Los agentes antioxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes naturales tales como ácido ascórbico (AA, E300) y tocoferoles (E306), así como también antioxidantes sintéticos, tales como galato de propilo (PG, E310), butilhidroquinona terciaria (TBHQ), hidroxianisol butilado (BHA, E320) e hidroxitolueno butilado (BHT, E321).

45 De manera típica, el agente utilizado para evitar taupatía puede incluir, pero no se limita a, inhibidores de la colinesterasa tales como donepezil, galantamina y rivastigmina, y antagonistas de NMDA tales como memantina.

De manera típica, el vector de expresión y el otro agente activo se pueden formular por separado. De manera alternativa, se pueden formular juntos en una composición farmacéutica.

Métodos de diagnóstico de la invención

50 En otro aspecto, la invención se refiere también a un método para la detección de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección del nivel de HNRNPC en una muestra obtenida de dicho paciente.

55 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, un bovino, un equino, una oveja, un cerdo y un primate. Con preferencia, un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

La muestra biológica adecuada para llevar a cabo la invención puede ser un fluido corporal, tal como suero, plasma, sangre u orina. También puede ser una biopsia cerebral o una muestra de líquido cefalorraquídeo.

5 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el "nivel de expresión de HNRNPC" tiene su significado general en la técnica. Se puede referir a la actividad enzimática de HNRNPC, a la cantidad de proteína HNRNPC o la cantidad de ARNm que codifica HNRNPC en dicha muestra biológica.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, una "disminución del nivel de HNRNPC" es un nivel de HNRNPC que es más baja que la observada en la población general. Se considera que un nivel de HNRNPC es más bajo que la población por lo general, cuando es inferior al normal, por un factor de 1,5, con preferencia 2, incluso con mayor preferencia 2, 3... 10, o cuando no es detectable.

10 En una forma de realización, el nivel de HNRNPC se puede referir a nivel de actividad enzimática HNRNPC, es decir, a la capacidad de regular el corte y empalme del gen *Nxn12*.

En un aspecto, la invención se refiere por lo tanto a un método para la detección de una predisposición a una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección del nivel de actividad enzimática de HNRNPC en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

15 De manera típica, la actividad enzimática de HNRNPC se puede medir de acuerdo con las pruebas enzimáticas disponibles. Las pruebas enzimáticas adecuadas de los niveles HNRNPC pueden incluir, pero no se limitan a la medición del efecto de HNRNPC en el corte y empalme de los productos génicos de *Nxn12*.

De hecho, los inventores han demostrado que el nivel de HNRNPC se correlacionó con la cantidad de RdCVF2Lv2 aberrante empalmado de manera alternativa.

20 Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que la introducción de un retrotransposón (*AluSx*) 3' al gen *NXNL2* en los resultados de linaje de los primates por medio de la exonización en la producción del transcrito aberrante empalmado *NXNL2v2* de manera alternativa con el exón 2' en lugar del exón 2 que se traduce como una proteína RdCVF2Lv2 que ya no es capaz de interactuar con Tau contrariamente a RdCVF2Lv1. Este mecanismo se llama exonización.

25 Los inventores han demostrado que *NXNL2v2* se expresa de manera predominante en el cerebro de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer en comparación con los controles de la misma edad.

De manera típica, la relación de expresión $Nxn12\ v2 / (v1 + v2)$ se puede medir por medio de la realización de la siguiente prueba:

30 El ARN total de muestras de cerebro congeladas se purifica por medio de la centrifugación de cloruro de cesio (Delyfer *et al.*, 2013). La cuantificación se lleva a cabo por el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La relación de absorbancia 260/280 nm se utiliza para controlar las contaminaciones de proteínas. La integridad del ARN se controla por el uso de un Bioanalizador (Bioanalyzer 2100, Agilent). El ARN se valida cuando la relación de las dos bandas correspondientes al ARN ribosomal 28 Svedberg (S) y 18S es 2/1 y cuando el número de integridad del ARN (RIN, por su sigla en inglés) está cerca de 10. El ADNc se produce por el uso del kit de transcriptasa Superscript II
35 inversa (Life Technologie) por el uso de 2,5 µg de ARN. PCR se realiza por el uso de cebadores específicos. Los datos se normalizan con la expresión del gen ribosomal RPS6.

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

NXNL2v1 F: AAGTGGTCTTCGTGTAGCC (SEC. ID Núm. 1)

NXNL2v1 R: CCTCTTCCTCAGCTCATGCC (SEC ID Núm. 2)

40 NXNL2v2 F: GCCTGGCTGGCGCTG (SEC. ID Núm. 3)

NXNL2v2 R: AGGCTAAGGCTAGTTCCTCA (SEC. ID Núm. 4)

RPS6 F: TGCATTGTGGATGCAAATCT (SEC. ID Núm. 5)

RPS6 R: CTGGCGGACATCATCTTCTT (SEC ID Núm. 6)

45 En una forma de realización particular, la invención se refiere a un método para la predicción de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección de la relación de expresión $Nxn12\ v2 / (v1 + v2)$ en una muestra biológica obtenida de dicho paciente. De manera típica, un incremento en dicha relación en comparación con una relación estándar observada en una población de control o en la población general se asocia con un mayor riesgo de desarrollar una taupatía.

50 De manera típica, se considera que el nivel de actividad de HNRNPC disminuye si el nivel de actividad de HNRNPC medida en la muestra del paciente es inferior a un cierto umbral.

En otra forma de realización, el nivel de HNRNPC es el nivel de la proteína HNRNPC hallado en la muestra biológica.

5 En un aspecto, la invención se refiere por lo tanto a un método para la detección de una predisposición a taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección del nivel de la proteína HNRNPC en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En una forma de realización particular, los métodos de la invención comprenden la puesta en contacto de la proteína HNRNPC biológica presente en la muestra biológica. La pareja de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, con preferencia monoclonal. En otra forma de realización, la pareja de unión puede ser un aptámero.

10 Los anticuerpos policlonales de la invención o un fragmento de los mismos se pueden elevar de acuerdo con métodos conocidos por la administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ej., de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos adyuvantes conocidos en la técnica se pueden utilizar para mejorar la producción de anticuerpos. Si bien los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales.

15 Los anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento del mismo se pueden preparar y aislar por el uso de cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en el cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote *et al.*, 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, 1985).

20 De manera alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (véase por ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-HNRNPC. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos anti-HNRNPC que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar por medio de la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar por medio de la
25 reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. De manera alternativa, las bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv se pueden construir para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada a HNRNPC. Por ejemplo, se puede utilizar la presentación en fagos de anticuerpos. En tal método, los fragmentos Fv (scFv) de cadena única o Fab se expresan en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ej., M13. De manera breve, se eliminan las células de bazo de un huésped adecuado, por ej., ratón, que se ha
30 inmunizado con una proteína. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de aquellas células que están produciendo el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones codificantes se fusionan a continuación a un terminal de una secuencia del fago. Una vez que el fago se inserta en un portador adecuado, por ej., las bacterias, el fago muestra el fragmento de anticuerpo. La presentación en fagos de anticuerpos también se puede proporcionar por medio de métodos combinatorios conocidos por aquéllos con experiencia en la técnica. Los
35 fragmentos de anticuerpo que se muestran por un fago se pueden utilizar entonces como parte de un inmunoensayo.

Los anticuerpos contra HNRNPC están disponibles, por ejemplo, a partir del nombre:

El anticuerpo anti-hnRNP C1 + C2 (4F4) de ratón monoclonal (Abcam ref: ab10294)

40 En otra forma de realización, la pareja de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden ser aislados a través de Evolución Sistemática de Ligandos por medio de enriquecimiento EXponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias al azar, de acuerdo con lo descrito en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencia aleatoria se puede obtener por medio
45 de síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente limitadas mostradas por una proteína de plataforma, tal como la Tiorredoxina A de E. coli, que se seleccionan de bibliotecas combinatorias por medio de dos métodos híbridos (Colas *et al.*, 1996).

50 Las parejas de unión de la invención, tales como anticuerpos o aptámeros, se pueden etiquetar con una molécula detectable o sustancia, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otra etiqueta conocida en la técnica. En la técnica se conocen las etiquetas que por lo general proporcionan (de manera directa o indirecta) una señal.

55 De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, el término "etiquetado", con respecto al anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo del anticuerpo o aptámero por medio del acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o de indocianina (Cy5)) para el anticuerpo o aptámero, así como también el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por medio de la reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la

invención se puede etiquetar con una molécula radiactiva por medio de cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero no se limitan a, átomos radioactivos para estudios gammagráficos tales como I123, I124, In111, Re186, Re188.

5 Los ensayos mencionados con anterioridad por lo general implican la unión de la pareja de unión (es decir, el anticuerpo o el aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que se pueden utilizar en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ej., en forma de pocillos de membrana o de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ej., perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.

10 El nivel de la proteína HNRNPC se puede medir por el uso de técnicas de inmunodiagnóstico estándar, que incluyen inmunoensayos tales como competición, reacción directa, o ensayos de tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, pruebas de aglutinación; inmunoensayos etiquetados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

15 Más en particular, se puede utilizar un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos contra HNRNPC. Después se añade la muestra biológica a los pocillos recubiertos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, las placas se pueden lavar para eliminar restos no unidos y añadirse una molécula de unión secundaria etiquetada de forma detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta por
20 el uso de métodos muy conocidos en la técnica.

En una forma de realización particular, el método para la detección de un riesgo de desarrollar una taupatía de acuerdo con la presente invención comprende el paso de la detección de un fragmento de HNRNPC por Western blot semi-cuantitativa en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de dicho paciente.

25 Se han llevado a cabo enfoques similares con éxito para otros biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas (véase Huhmer *et al.*, 2006).

En una forma de realización alternativa, el nivel de HNRNPC se puede medir por medio de la medición de la cantidad de ARN mensajero (ARNm) que codifica HNRNPC.

30 En un aspecto, la invención se refiere por lo tanto a un método para la detección de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección del nivel de ARNm que codifica HNRNPC en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

De manera típica, dicho método puede comprender un paso de aislamiento de ARN total o ARNm total de dicha muestra biológica, antes de la detección del nivel de ARNm que codifica HNRNPC.

Aquéllos con experiencia en la técnica saben cómo llevar a cabo tales pasos de aislamiento por el uso de procedimientos estándar.

35 Los métodos para la detección de la presencia de ARNm son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras se extrae primero de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, por el uso de enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae por resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta entonces por medio de hibridación (por ej., análisis de Northern blot) y/o
40 amplificación (por ej., RT-PCR). En una forma de realización preferida, la expresión del gen *HNRNPC* o se detecta por RT-PCR, con preferencia RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa, incluso con mayor preferencia RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa en tiempo real.

45 Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por su sigla en inglés), la amplificación mediada por transcripción (TMA, por su sigla en inglés), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por su sigla en inglés) y la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA, por su sigla en inglés).

50 Los ácidos nucleicos que tienen por lo menos 10 nucleótidos y que exhiben complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en la presente memoria encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, pero de manera típica son por lo menos aproximadamente 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, con mayor preferencia 85% idénticos y aún con mayor preferencia de 90 a 95% idénticos. En ciertas formas de realización, será ventajoso emplear ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como una etiqueta detectable, para la detección de la hibridación. Una amplia variedad de indicadores apropiados son conocidos en la técnica, estos incluyen, ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ej., avidina/biotina).

55 Las sondas de manera típica comprenden ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 10 y 800, con mayor preferencia de entre 15 y 700, de manera típica de entre 20 y

500. Los cebadores de manera típica son ácidos nucleicos monocatenarios cortos, de entre 10 y 25 nucleótidos de longitud, diseñados para adaptarse perfectamente a, o casi a la perfección a, un ácido nucleico de interés, a amplificar. Las sondas y los cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos que se hibridan a, es decir, con preferencia se hibridan en condiciones de hibridación de rigurosidad alta (correspondiente a la temperatura más alta de fusión T_m , por ej., 50% de formamida, 5x o 6x SCC. SCC es un 0,15 M de NaCl, 0,015 M de Na-citrato).

Los cebadores de ácido nucleico o sondas utilizadas en el método de amplificación y detección con anterioridad pueden ser ensamblados como un kit. Dicho kit incluye cebadores de consenso y sondas moleculares. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones y enzimas de PCR; secuencias de control positivas, cebadores de control de reacción; e instrucciones para la amplificación y detección de las secuencias específicas.

En una forma de realización preferida, dicho kit comprende oligonucleótidos para la determinación del nivel de ARNm de HNRNPC por PCR cuantitativa. De manera típica, dicho kit puede comprender oligonucleótidos específicos para el ARNm de HNRNPC y los oligonucleótidos de normalización internos (genes constitutivos).

En una forma de realización adicional, el nivel de HNRNPC se puede ensayar indirectamente por medio del genotipado del gen HNRNPC.

En un aspecto, la invención se refiere por lo tanto a un método para la detección de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección de el nivel de HNRNPC en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que dicho nivel de HNRNPC se ensaya de manera indirecta por medio del genotipado del gen HNRNPC.

De manera típica, dicho método puede comprender un paso de aislamiento de ADN a partir de dicha muestra biológica, antes de la detección de mutaciones en el gen que codifica HNRNPC.

Aquéllos con experiencia en la técnica saben cómo llevar a cabo tales pasos de aislamiento por el uso de procedimientos estándar.

Una disminución de la expresión del gen *HNRNPC* que da como resultado niveles más bajos de ARNm que codifica HNRNPC y/o niveles más bajos de proteína HNRNPC puede ser debido a mutaciones en el promotor de HNRNPC o en la secuencia de codificación de HNRNPC. De manera alternativa, cierta disminución de la actividad de HNRNPC puede ser debido a mutaciones en la secuencia codificadora que no influyen en los niveles de expresión.

De acuerdo con lo utilizado en la presente memoria, la expresión "riesgo de desarrollar una taupatía" se refiere a la susceptibilidad o la propensión de un paciente para desarrollar una taupatía de cualquier tipo.

Dicho riesgo de desarrollar una taupatía puede ser predisposición puramente hereditaria (una mutación heredada, por ejemplo) o adquirida (mutaciones espontáneas, regulaciones epigenéticas etc.). Se ha demostrado que ciertas condiciones ambientales (tales como la exposición al estrés oxidativo) incrementan el riesgo de un paciente de desarrollar una taupatía. Un "riesgo de desarrollar una taupatía" se puede definir como un incremento del riesgo de desarrollar una taupatía, cuando se compara con la población general.

La invención se describirá de manera adicional por medio de los siguientes ejemplos y figuras, que no están destinados a limitar el alcance de la protección definido por las reivindicaciones.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Expresión disminuida de proteína inhibidora de HNRNPC de corte y empalme en el cerebro de pacientes con Alzheimer.

Western blot de HNRNPC1/C2 en extractos de proteínas cerebrales obtenidos a partir de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer (filas 13 a 22) y controles emparejados por la edad (filas 1 a 12).

Las dos bandas corresponden a las dos isoformas de C1 y C2 de la proteína HNRNPC.

Figura 2: Correlación entre la expresión de HNRNPC y la de NXNL2v2.

La relación de los transcritos de la expresión $v1/(v1 + v2)$ del gen NXNL2 se correlaciona con el nivel de expresión de HNRNPC en muestras de cerebro obtenidas a partir de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer. La línea de trazos representa la curva de regresión ($R^2 = 0,7513$) con base en los valores obtenidos para los pacientes con Alzheimer, con la exclusión de los 2 pacientes que presentaron un perfil diferente (véase los 2 círculos con una relación $v2 / (v1 + v2)$ de aproximadamente 0,2).

Los niveles de expresión de isoformas NXNL2v1 y NXNL2v2 se evaluaron por medio de RT-PCR cuantitativa.

Ejemplos

Los inventores han demostrado la implicación del gen *Nxn12* en la enfermedad de Alzheimer, con base en el comportamiento anormal de la *Nxn12*^{-/-} de ratón. La *Nxn12*^{-/-} de ratones envejecidos tienen déficit visual y olfativo (Jaillard *et al.*, 2012), pero curiosamente, estos ratones tienen déficits cognitivos que pueden ser calificados a los 2 meses de edad antes de que los animales muestren disfunción visual y olfativa (Jaillard *et al.*, Manuscrito en preparación). Estos fenotipos no se observaron en el *Nxn11*^{-/-} de ratón de acuerdo con su expresión restringida a la retina. El *Nxn12*^{-/-} de ratón está hiperactivo de acuerdo con lo demostrado por la prueba de campo abierto, y tiene ansiedad incrementada de acuerdo con lo mostrado por la prueba del laberinto elevado. Este ratón tiene déficits adicionales en la memoria de funcionamiento que se observa en la prueba del laberinto Y, el déficit de memoria contextual de acuerdo con lo observado en el condicionamiento del miedo, y en la memoria espacial en la prueba del laberinto de agua de Morris. Sin embargo, este ratón no tiene déficit motor, de acuerdo con lo juzgado por la prueba de rotarod. El laberinto de agua de Morris es un método estándar para la evaluación de la capacidad de aprendizaje y memoria espacial, y refleja directamente los defectos cognitivos asociados con la disfunción del hipocampo.

En cuanto a RdCVFL, uno de los productos del gen *Nxn11*, Tau interactúa con la proteína RdCVF2L similar a tiorredoxina, y no con el factor trófico RdCVF2. RdCVF2L inhibe la fosforilación de Tau. A los 18 meses de edad, se puede observar astrogliosis en el hipocampo del cerebro de *Nxn12*^{-/-}. A la misma edad, el análisis de extractos de cerebro enteros muestra la presencia de agregados de Tau de acuerdo con lo observado por un ensayo de unión de filtro, así como también formas oligoméricas de Tau. Si bien la expresión de Tau no se modifica por la inactivación del gen *Nxn12*, Tau se fosforila en el cerebro del *Nxn12*^{-/-} de ratón de acuerdo con lo mostrado por el uso de dos anticuerpos anti-fosfoTau distintos, AT8 y AT100. Curiosamente, la expresión de *NXNL2* se reduce en un 48% en la corteza frontal de pacientes fallecidos por la enfermedad de Alzheimer en comparación con los controles de la misma edad.

La expresión del gen *NXNL2* en muestras cerebrales de pacientes fallecidos por la enfermedad de Alzheimer se investigó y se comparó con las muestras de control. Los inventores observaron que el gen *NXNL2* en los tejidos del cerebro humano expresó una isoforma adicional e insospechada de corte y empalme. Con base en estas observaciones, se estudió la regulación de corte y empalme del gen *NXNL2*. La introducción de un retrotransposon (*AluSx*) en orientación inversa, 3' al gen *NXNL2* en los resultados del linaje de primates en la exonización en la producción del transcripto *NXNL2v2* aberrante empalmado de manera alternativa con el exón 2' procedente de la secuencia *AluSx* en lugar del exón normal 2. Esta transcripción se traduce como una proteína RdCVF2Lv2 que ya no es capaz de interactuar con Tau contrariamente a RdCVF2Lv1. La selección del sitio de corte y empalme se produce a través del reconocimiento coordinado de múltiples elementos en cis: el punto de ramificación, el 5' del sitio de corte y empalme (sitio del donante), el tracto de polipirimidina (PPT, por su sigla en inglés), el 3' del sitio de corte y empalme (sitio aceptor), y una variedad de elementos auxiliares (Hertel, 2014). El patrón de expresión *NXNL2v2* surge de la PPT muy eficiente rica en timidinas, proporcionada por la secuencia de *AluSx* en orientación inversa. Este mecanismo se llama exonización y se sabe que está regulado por el factor inhibidor de HNRNPC de corte y empalme (Zamack *et al.*, 2013). *NXNL2v2* se expresa de manera predominante en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con muestras de cerebro de control emparejadas por la edad y examinadas. Los inventores observaron una reducción de la expresión de HNRNPC en la corteza de los pacientes con Alzheimer que se correlaciona con la relación de la expresión ($v2/v1 + v2$). Ellos confirmaron la reducción de la expresión de HNRNPC por medio de inmunohistoquímica. Curiosamente, en células HEK293 el agente oxidante diamida incrementa la relación de la expresión ($v2/v1 + v2$). Además, los inventores hallaron que los resultados del tratamiento con diamida en la exclusión nuclear de HNRNPC. La electroforesis en gel de 2D mostró que este agente induce una modificación post-traducciona de la proteína HNRNPC, muy probablemente por una fosforilación inhibitoria (Stone y Collins, 2002). El incremento de la exonización de los genes *NXNL2* por el estrés oxidativo no alcanza la relación ($v2/v1 + v2$) y en consecuencia la expresión relativa de la RdCVF2Lv2 que ya no es capaz de interactuar con Tau (Camara *et al.*, Manuscrito en preparación). Esta es una clara demostración de un mecanismo epigenético de la progresión de la enfermedad de Alzheimer, donde la reducción del nivel de HNRNPC va a alterar la expresión de muchos genes con un retrotransposón *Alu*.

En conclusión, los inventores han demostrado que el inhibidor de corte y empalme HNRNPC es regulado por disminución en el tejido cerebral de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer, en comparación con pacientes de control emparejados por la edad (Figura 1).

También han demostrado, por el uso de transfección transitoria de siARN dirigido contra HNRNPC, que la disminución de la expresión de HNRNPC induce un incremento de *NXNL2v2* (datos no mostrados).

La relación de expresión $v1 / (v1 + v2)$ se correlaciona con el nivel de expresión de HNRNPC (Figura 2).

Referencias

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan como referencia en la presente descripción.

Camara, H., Argentini, M., Clerin, E., Blond, F., Ferracane, V., Millet-Puel, G., Ait-Ali, N., Kole, C., Sahel, J.A., y

- Léveillard, T. (manuscrito en preparación). Aberrant exonisation on the Nucleoredoxin-like 2 gene, a epigenetic mechanism in Alzheimer's Disease.
- Delyfer, M.N., Ait-Ali, N., Camara, H., Clérin, E., Korobelnik, J.F., Sahel, J.A., y Leveillard, T. (2013). Transcriptomic Analysis of Human Retinal Surgical Specimens Using jouRNAI. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- 5 Hertel, K.J. (2014). Spliceosomal pre-mRNA splicing methods and protocols (New York u.a.: Humana Press).
- Huhmer *et al.*, (2006). Protein analysis in human cerebrospinal fluid: Physiological aspects, current progress and future challenges. *Disease markers* 22, 3 a 26.
- Jaillard, C., Mouret, A., Niepon, M.L., Clérin, E., Yang, Y., Lee-Rivera, I., Ait Ali, N., mijo-Puel, G., Cronin, T., Sedmak, T., *et al.*, (2012). Nxn12 splicing results in dual functions in neuronal cell survival and maintenance of cell integrity. *Human molecular genetics* 21, 2298 a 2311.
- 10 Jaillard, C., Ouechtati, F., Clérin, E., Niepon, M.L., Meziane, H., Fridlich, R., Lambert, J.C., Amouyel, P., Sahel, J.A., y Léveillard, T. (Manuscrito en preparación). The inactivation of the Nxn12 gene in the mouse reveals its implication in Alzheimer's disease.
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., y Pan, T. (2015). N(6)- methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* 518, 560 a 564.
- 15 Stone, J.R., y Collins, T. (2002). Rapid phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 in response to physiologic levels of hydrogen peroxide in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 15621 a 15628.
- Zamack, K., Konig, J., Tajnik, M., Martincorena, I., Eustermann, S., Stevant, I., Reyes, A., Anders, S., Luscombe, N.M., y Ule, J. (2013). Direct competition between hnRNP C and U2AF65 protects the transcriptome from the exonization of Alu elements. *Cell* 152, 453 a 466.
- 20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> Métodos para el tratamiento y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y lesiones cerebrales traumáticas

<130> BIO14447 LEVEILLARD

<160> 6

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

20 aagtgtctt cgtgtagcc 19

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 2

cctctcctc agctcatgcc 20

30 <210> 3

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35 <400> 3

gcctggctgg cgctg 15

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

40 <213> Homo sapiens

<400> 4

aggctaaggc tagtcctca 20

45 <210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

50 <400> 5

tgcatgtgg atgcaaatct 20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

55 <400> 6

ctggcggaca tcattctt 20

60

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una ribonucleoproteína heterogénea nuclear C (HNRNPC) para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de una taupatía.
- 5 2. El vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho vector de expresión es un vector adeno-asociado (AAV).
3. El vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha taupatía es la enfermedad de Alzheimer o una lesión cerebral traumática.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una ribonucleoproteína heterogénea nuclear C (HNRNPC) y un excipiente aceptable para uso farmacéutico para su uso en un método para la prevención y/o el tratamiento de una taupatía en un paciente.
5. Un método para la detección de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende el paso de la detección del nivel de HNRNPC en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que una disminución del nivel de HNRNPC en comparación con la población general se asocia con un mayor riesgo de desarrollar un taupatía.
- 15 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha muestra biológica es una muestra de cerebro o una muestra de líquido cefalorraquídeo.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que dicho nivel de HNRNPC es el nivel de la proteína HNRNPC.
- 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que dicho nivel de HNRNPC es el nivel de ARNm que codifica HNRNPC.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que dicho nivel de HNRNPC se ensaya de manera indirecta por medio del genotipado del gen HNRNPC.
- 25 10. Un método para la predicción de un riesgo de desarrollar una taupatía en un paciente que comprende un paso de la detección de la relación de expresión $Nxnl2 \ v2 / (v1 + v2)$ en una muestra biológica obtenida de dicho paciente en el que una relación incrementada en comparación con una relación estándar observada en una población de control o en la población general se asocia con un mayor riesgo de desarrollar una taupatía.



Figura 1

● Alzheimer
▲ Control
 $R^2=0.75$

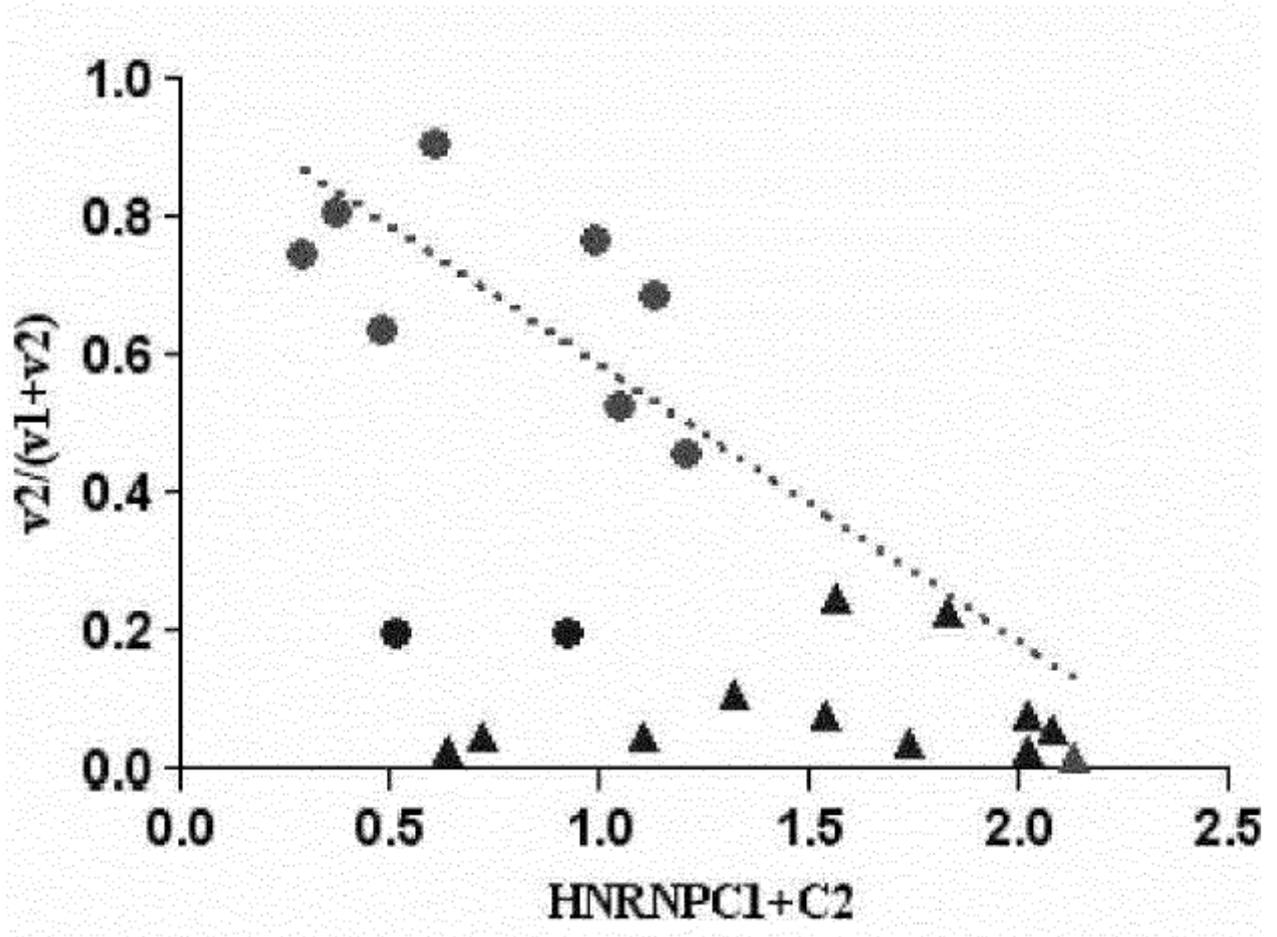


Figura 2