

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 045**

21 Número de solicitud: 201830615

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**21.06.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.12.2019**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (80.0%)  
C/ Ancha 16  
11001 Cádiz ES y  
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (20.0%)**

72 Inventor/es:

**MORENO LÓPEZ, Bernardo;  
GENTO CARO, Ángela;  
GARCÍA MORALES, Victoria;  
PORTILLO PACHECO, Federico Luis;  
CAMPOS CARO, Antonio y  
MOYA MOLINA, Miguel Ángel**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

Observaciones:

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

54 Título: **MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y/O TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

57 Resumen:

Métodos para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar al menos una enfermedad neurodegenerativa concreta en un sujeto, para monitorizar la eficacia de un tratamiento y/o para predecir la respuesta a un tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad neurodegenerativa y para identificar compuestos candidatos útiles para el tratamiento de pacientes que sufren alguna enfermedad neurodegenerativa. Por otro lado, la presente invención se refiere a dianas terapéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y además para compuestos capaces de inhibir dichas dianas terapéuticas con el objetivo de mejorar la salud de los pacientes que sufren alguna enfermedad neurodegenerativa.

**ES 2 736 045 A1**

**DESCRIPCIÓN**

**MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y/O TRATAMIENTO DE ENFERMADES NEURODEGENERATIVAS.**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se enmarca en el campo de la medicina. Concretamente, la presente invención hace referencia a un método de detección *in vitro* de al menos una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, para monitorizar la eficacia de un tratamiento y/o predecir la respuesta a un tratamiento en un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa. Por otro lado, la presente invención hace referencia a dianas terapéuticas para su uso en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas y de compuestos capaces de inhibir dichas dianas terapéuticas con el objetivo de mejorar el estado de salud de pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas.

10  
15

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El término “enfermedades neurodegenerativas” hace referencia a las enfermedades causadas por neurodegeneración (por ejemplo, la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas). Muchas enfermedades neurodegenerativas (incluyendo la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Esclerosis Múltiple, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer) ocurren como resultado de procesos neurodegenerativos. Tales enfermedades tienen como resultado una degeneración progresiva y/o muerte de las neuronas. A medida que avanzan las investigaciones, aparecen múltiples factores comunes que relacionan estas enfermedades entre sí a un nivel sub-celular. El descubrimiento de estas similitudes ofrece la posibilidad de desarrollo de avances terapéuticos que puedan tratar varias enfermedades simultáneamente. Hay múltiples paralelismos entre las diferentes enfermedades neurodegenerativas incluyendo un ensamblado atípico de proteínas, además de la muerte celular inducida. El proceso de neurodegeneración se produce en múltiples niveles de complejidad del circuito neuronal abarcando desde el nivel molecular al sistémico.

20  
25  
30

En particular, se considera una enfermedad de la neurona motora (ENM) a cualquiera de las enfermedades neurodegenerativas que afectan selectivamente a neuronas motoras, es decir, las células que actúan sobre los músculos de control voluntario

35

(musculo esquelético) del cuerpo. Estas enfermedades incluyen ELA, paraplejia espástica hereditaria (PEH), Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Atrofia Muscular Progresiva (AMP), Parálisis bulbar progresiva (PBP) y Parálisis Pseudobulbar. Por ello, una enfermedad de la neurona motora modelo seria la ELA. Se ha demostrado  
5 que la ELA es una enfermedad neurodegenerativa crónica con manifestaciones clínicas reconocibles. Por ejemplo, se ha demostrado que la degeneración de neuronas motoras corticales y del bulbo espinal juega un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. La ELA es la enfermedad neurodegenerativa conocida más letal. Sobre el 95% de los casos de ELA son esporádicos, siendo el 5% restante causado  
10 por una herencia autosómica dominante.

Se han dedicado grandes esfuerzos para el entendimiento de la etiología de las enfermedades de las neuronas motoras. Por ejemplo, se ha demostrado que niveles anormales de ciertos neurotransmisores excitotóxicos contribuyen adversamente al  
15 desarrollo de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo las enfermedades de las neuronas motoras. Concretamente, la excitotoxicidad mediada por glutamato ha sido reconocida como un factor crítico en el desarrollo de la ELA.

Se han realizado intentos para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas y  
20 las neuronas motoras. Sin embargo, la mayoría de las terapias no siempre impiden el desarrollo o severidad de estas enfermedades en los pacientes afectados.

Un esfuerzo importante por parte de los investigadores se ha enfocado en el desarrollo de métodos efectivos de detección de enfermedades neurodegenerativas en  
25 pacientes. Sin embargo, muchos de los métodos existentes no siempre son efectivos o fiables. Por ejemplo, algunos métodos han sido optimizados para analizar muestras post-mortem y aportan muy poco beneficio al paciente afectado. Otros métodos se basan en examinar en pacientes vivos habilidades motoras o cognitivas específicas. Sin embargo, estas pruebas pueden ser difíciles de realizar o interpretar en  
30 determinadas situaciones.

Por ello, existe una necesidad en este campo de desarrollar métodos fiables y efectivos para detectar o predecir enfermedades neurodegenerativas en pacientes vivos. Existe un reconocimiento general en que estos métodos impactarían de forma  
35 positiva en muchas de las terapias existentes. Sería particularmente deseable contar con métodos para detectar enfermedades neurodegenerativas específicas en un

paciente vivo antes de que la enfermedad comience o poder diagnosticarla en un estadio temprano de la progresión de la misma.

La presente invención está enfocada en resolver los problemas citados anteriormente, ya que está dirigida principalmente el desarrollo de un método *in vitro* para la  
 5 detección de enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, la presente invención se refiere a la identificación de dianas terapéuticas para tratamientos de enfermedades neurodegenerativas y a compuestos capaces de inhibir dichas dianas terapéuticas con el objetivo de mejorar la salud de pacientes que sufran enfermedades neurodegenerativas, particularmente, la ELA.

10

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un fosfolípido bioactivo derivado de membrana que puede actuar como molécula de señalización. Los receptores del ácido lisofosfatídico (LPARs) son un grupo de receptores acoplados a proteína G para LPA que incluyen: el  
 15 receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPAR1 o LPA1; anteriormente conocido como EDG2, GPR26, VGZ-1), el receptor 2 del ácido lisofosfatídico (LPAR2; anteriormente conocido como EDG4), el receptor 3 del ácido lisofosfatídico (LPAR3; anteriormente conocido como EDG7), el receptor 4 del ácido lisofosfatídico (LPAR4; anteriormente conocido como GPR23, P2RY9), el receptor 5 del ácido lisofosfatídico (LPAR5;  
 20 anteriormente conocido como GPR92) y el receptor 6 del ácido lisofosfatídico (LPAR6; anteriormente conocido como GPR87, P2RY5). El LPA1 es una proteína que en humanos está codificada por el gen LPA1. El LPA1 es un receptor ligado a proteína G que se une a la molécula de señalización lipídica LPA. La proteína integral de membrana codificada por este gen es un receptor para LPA de un grupo conocido  
 25 como receptores EDG. Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G.

La presente invención se basa en el hecho de que existe una desviación o variación estadísticamente significativa de la concentración de LPA, y/o niveles de expresión de  
 30 los LPARs, particularmente de LPA1, en pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas, particularmente que sufren enfermedades de las neuronas motoras, y específicamente en la ELA, en comparación con sujetos controles. En la realización preferida, la concentración de LPA y/o los niveles de expresión de LPARs, en particular de LPA1, es significativamente mayor en las neuronas motoras de la  
 35 médula espinal de pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas, particularmente de la enfermedad de la neurona motora, y específicamente de ELA, respecto a los sujetos controles sanos.

Particularmente, los inventores muestran en la presente invención como la supervivencia de neuronas motoras espinales en cultivo se ve afectada negativamente cuando se aplica una concentración concreta de LPA al medio (ver **figuras 1 y 4**). Los inventores muestran que el efecto tóxico del LPA sobre los cultivos es mediado principalmente por el receptor LPA1 (ver **figura 2**). Los inventores también demuestran en la presente invención que la expresión de LPARs, particularmente de LPA1, es significativamente mayor en un modelo de ELA comparado con los correspondientes controles del modelo (ver **figuras 3 y 5**). Además, los inventores demuestran en la presente invención que los LPARs, en concreto el LPA1, puede ser una diana terapéutica efectiva para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente de ELA. En la **figura 6** podemos ver representada la eficacia del tratamiento con un ARN de interferencia dirigido contra LPA1 ( $\text{siRNA}_{Lpa1}$ ). De hecho, la **figura 7**, muestra el efecto neuroprotector del  $\text{siRNA}_{Lpa1}$  en un modelo de ELA y la **figura 8** demuestra que el tratamiento con  $\text{siRNA}_{Lpa1}$  aumenta la esperanza de vida en el modelo de ELA.

De este modo, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la diagnosis y/o prognosis de enfermedades neurodegenerativas (preferiblemente enfermedades de la neurona motora) en pacientes, el cual comprende: (a) determinar al menos el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA en una muestra biológica aislada del paciente; (b) en donde la identificación de una variación o desviación significativa en los niveles de expresión de LPARs (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA en el paso (a) en comparación con la expresión de LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA identificada en un sujeto control sano de referencia, es indicativo de que el paciente sufre una enfermedad neurodegenerativa (preferiblemente una enfermedad de la neurona motora) o tiene un mal pronóstico. En una realización preferida del método de diagnóstico de la invención, la desviación o variación estadísticamente significativa en el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente el LPA1) y/o la concentración de LPA comparada con un sujeto o paciente de referencia control, se refiere a un aumento o disminución estadísticamente significativa en el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA comparada con dicho sujeto de referencia control sano. En una realización preferida del método de diagnóstico de la invención se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico o pronóstico de enfermedades de la neurona motora el cual comprende: (a) Medida al menos del nivel de expresión de LPA1 y/o la concentración

de LPA en una muestra biológica aislada del paciente; (b) donde si el nivel de expresión de LPA y/o la concentración de LPA determinada en el paso (a) es estadísticamente superior que el nivel de expresión de LPA1 y/o la concentración de LPA obtenido de un paciente control sano, ello es una indicación de que el paciente  
5 sufre una enfermedad de la neurona motora o tiene un mal pronóstico.

La segunda realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la monitorización de la eficacia de un tratamiento y/o para predecir la respuesta a un tratamiento en un paciente que sufre una enfermedad neurodegenerativa (preferiblemente una enfermedad de la neurona motora), el cual comprende: (a) Medir  
10 al menos el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o el nivel de concentración de LPA en una muestra biológica aislada del paciente después del tratamiento; (b) en donde si el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA determinada en el paso (a) es estadísticamente más bajo que el nivel de expresión de LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de  
15 LPA antes del tratamiento, esto es indicativo de que el paciente está respondiendo al tratamiento.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para identificar y producir compuestos candidatos con utilidad para el tratamiento de  
20 pacientes que sufren una enfermedad neurodegenerativa (preferiblemente una enfermedad de la neurona motora), el cual comprende: (a) medir al menos el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA en una muestra biológica aislada del paciente después de la administración del compuesto seleccionado; (b) si el nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la  
25 concentración de LPA determinada en el paso (a) es estadísticamente más baja que el nivel de expresión de LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA determinada antes de la administración del compuesto seleccionado, es indicativo de que el compuesto seleccionado es efectivo en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (preferiblemente de enfermedades de la neurona motora).

La cuarta realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* del nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o de la concentración de LPA como un biomarcador para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, para predecir la respuesta a un tratamiento en un paciente que sufre una enfermedad  
35 neurodegenerativa, para identificar y producir un posible compuesto útil en el tratamiento de pacientes con enfermedades neurodegenerativas o para la producción de compuestos útiles en el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades

neurodegenerativas. En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de la neurona motora, preferiblemente ELA.

La quinta realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de un kit de reactivos para la determinación del nivel de expresión de un LPAR (preferiblemente LPA1) y/o la concentración de LPA, para el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, para predecir la respuesta a un tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad neurodegenerativa, para identificar y producir compuestos candidatos útiles para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad neurodegenerativa o para la producción de compuestos útiles para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas. En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de la neurona motora, preferiblemente ELA.

La sexta realización de la presente invención se refiere a un LPAR, preferiblemente LPA1, para su uso como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en donde se inhibe o interrumpe el receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1). En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de la neurona motora, preferiblemente ELA.

La séptima realización de la presente invención se refiere a un compuesto capaz de actuar específicamente sobre el ARNm de un LPAR, preferiblemente LPA1, y para inhibir la traducción del ARNm, para uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de la neurona motora, preferiblemente ELA.

La octava realización de la presente invención se refiere a compuestos antagonistas de LPAR, preferiblemente compuestos antagonistas del LPA1, para el uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de la neurona motora, preferiblemente ELA.

En una realización preferida de la presente invención la enfermedad neurodegenerativa es seleccionada de la siguiente lista que comprende: ELA, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. La presente invención también se refiere a otras enfermedades de la neurona motora a parte de la ELA, por ejemplo: Paraplejia Espástica Hereditaria (PEH), Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Atrofia muscular

progresiva (AMP), Parálisis bulbar progresiva (PBP) y Parálisis Pseudobulbar. En una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere a la ELA. Además, LPA1 también sería una diana terapéutica para tratar la neurodegeneración causada por accidentes cerebrovasculares (ictus), ya que tras la rotura de la barrera hematoencefálica, como ocurre en un derrame, se produce un incremento en la concentración de LPA acompañado por muerte neuronal.

En una realización preferida de la presente invención, el LPAR es seleccionado de la lista que comprende: LPAR1, LPAR2, LPAR3, LPAR4, LPAR5 o LPAR6. En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere al LPAR1 (LPA1).

En una realización preferida, la muestra biológica es un fluido obtenido del sistema nervioso central del paciente. En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a fluido cerebroespinal o sangre.

En una realización particularmente preferida de la presente invención la enfermedad neurodegenerativa es ELA, el LPAR es el LPA1 y la muestra biológica es sangre o fluido cerebroespinal.

En una realización preferida, el ARN interferente pequeño (siRNA), interferencia mediada por ARN de doble cadena (ARNi) o/u oligonucleótidos anti-sentido (ASO) se utilizan para inhibir la traducción del ARNm para LPAR, preferiblemente del LPA1, con el objetivo de tratar enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente ELA.

En otras palabras, el LPA1 es identificado aquí como responsable, o al menos está implicado, en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, particularmente ELA. Así mismo, el LPA1 se define en la presente invención como una diana terapéutica cuya inhibición resultaría en la mejora de la salud de pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas, particularmente ELA. En consecuencia, en la presente invención, cualquier compuesto capaz de inhibir la traducción de ARNm para el gen LPA1 puede ser utilizado para inactivar dicho gen, de esta forma participando en el tratamiento de la enfermedad neurodegenerativa, particularmente ELA. En una realización preferida, dicho compuesto es un siRNA, un ARNi o un ASO. Alternativamente, cualquier compuesto antagonista de LPA1 puede ser utilizado en la presente invención, de esta forma participando en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, particularmente ELA. Ejemplos de antagonistas de LPA1 que pueden ser utilizados en la presente invención se desglosan en la patente

internacional WO2012/162592 que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Particularmente, la patente internacional WO2012/162592 desglosa los compuestos antagonistas de LPA1 en los párrafos [0022] a [0036], así como los regímenes de dosis y rutas de administración de dichos compuestos antagonistas de LPA1, los cuales son en consecuencia incorporados por referencia en su totalidad. Por otro lado, el documento [*Lysophosphatidic acid receptors (LPARs): Potential targets for the treatment of neuropathic pain. Velasco M, O'Sullivan C, Sheridan GK. Neuropharmacology. 2017*], el cual describe antagonistas de LPA1 que pueden ser utilizados en la presente invención también es incorporado en la presente invención en su totalidad. Particularmente, este documento describe en la tabla 1 antagonistas del LPA1 que pueden ser utilizados en la presente invención y en consecuencia esta Tabla 1 está incorporada por referencia a la divulgación de la presente invención.

En una realización preferida, los antagonistas del LPA1 que pueden ser utilizados en la presente invención son los siguientes:

- 2-[4-[4-[4-[[[(1R)-1-(2-chlorophenyl)ethoxy]carbonylamino]-3-methyl-1,2-oxazol-5-yl]phenyl]phenyl]acetic acid (AM966).
- (R)-1-(4'-(3-methyl-4-(((1-phenylethoxy)carbonyl)amino)isoxazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)cyclopropane-1-carboxylic acid (AM152).
- 2-({4-methoxy-3-[2-(3-methylphenyl)ethoxy]benzene}amido)-2,3-dihydro-1H-indene-2-carboxylic acid (SAR-100842).
- 3-(1-((2S,3S)-2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)methyl)-3-(3,5-dimethoxy-4-methylphenyl)-3-hydroxypropyl)-1H-pyrrol-3-yl)propanoic acid (ONO-0300302).
- (R)-2-(4'-(3-methyl-4-(((1-phenylethoxy)carbonyl)amino)isoxazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)acetate (AM095).
- Tetradecyl Phosphonate (CAS 4671-75-4).
- Ki16425 (CAS 355025-24-0).
- 2,3-Dihydro-2-[3-(4-nitrophenoxy)phenyl]-1,3-dioxo-1H-isoindole-5-carboxylic acid (H2L 5765834).

La novena realización de la presente invención se refiere a los compuestos citados anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente ELA, de forma que el tratamiento es aplicado una vez el paciente ha sido diagnosticado utilizando el método *in vitro* de diagnóstico definido anteriormente. De forma alternativa, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes que sufren una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente ELA, el

cual comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de los compuestos citados anteriormente. En una realización preferida, este método de tratamiento es aplicado después del diagnóstico del paciente con el método de diagnóstico *in vitro* definido anteriormente.

5

La décima realización de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende el compuesto citado anteriormente y opcionalmente un transportador farmacéutico, adyuvante o diluyente aceptable.

10 La composición farmacéutica de la invención es útil en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas, particularmente para ELA.

La composición farmacéutica de la invención puede ser para un uso diario por paciente de una dosis entre 0,001 µg/g y aproximadamente 50 µg/g de ingrediente activo, preferiblemente una dosis de ingrediente activo de entre 0,01 a 5,0 µg/g, una dosis de ingrediente activo más adecuada es de entre 0,15 a 0,5 µg/g.

15 La composición farmacéutica descrita anteriormente puede ser administrada siguiendo distintas rutas, por ejemplo: administración oral, nasal, intraperitoneal, intravenosa o intracerebroventricular.

Para el propósito de la presente invención:

- 20
- El término “comprende” quiere decir incluye, pero no está limitado únicamente a la palabra que sigue a “comprende”. De esta forma el término “comprende” indica que los elementos citados son requeridos u obligatorios pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.
  - Con “consistiendo de” queremos decir incluye, y limitado a lo que siga a la frase “consistiendo de”. De esta forma la frase “consistiendo de” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios y que ningún otro elemento estará presente.
  - El término “referencia”, “sujeto control sano” o “nivel control”, cuando se refieren al nivel de un LPAR y/o a la concentración de LPA, se refiere al nivel observado en pacientes que no sufren enfermedades neurodegenerativas. El paciente es probable que sufra una enfermedad neurodegenerativa con una sensibilidad y especificidad dada si el nivel de expresión de LAPR y/o la concentración de LPA en el paciente están por encima o por debajo de dicha “referencia” o “nivel control” (por ejemplo, cuando hay una desviación o variación con respecto a dicha referencia o nivel control). En algunas realizaciones, cuando se afirma sobre un método para monitorizar la eficacia de un tratamiento, para predecir la respuesta a un tratamiento o para
- 25
- 30
- 35

monitorizar la eficacia de un tratamiento, el nivel de expresión antes del tratamiento se utiliza como una “referencia” o “nivel control” para comprobar si el paciente está respondiendo al tratamiento.

- 5

La frase “la identificación de una desviación o variación estadísticamente significativa” se refiere a una situación donde el nivel de expresión o de concentración de LPA1 o LPA en un paciente que sufre una enfermedad de neurona motora es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% superior o inferior al nivel de expresión o concentración de LPA1 o LPA en un sujeto control sano. En una realización preferida, se refiere a una

10

situación en la cual el nivel de expresión o de concentración de LPA1 o LPA en el paciente que sufre una enfermedad de la neurona motora es de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% mayor que el nivel de expresión o concentración de LPA1 o LPA en un sujeto control sano.
- 15

“Enfermedad neurodegenerativa” se refiere a aquellas enfermedades causadas por neurodegeneración (es decir, la pérdida progresiva de estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte neuronal). Muchas enfermedades neurodegenerativas (incluyendo ELA, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington) ocurren como resultado de un proceso neurodegenerativo. Tales enfermedades son el

20

resultado de una degeneración progresiva y/o de la muerte las neuronas. A medida que la investigación avanza, se han encontrado numerosas similitudes que relacionan a estas enfermedades unas con otras a un nivel sub-celular. El descubrimiento de estas similitudes ofrece la esperanza para avances terapéuticos que podrían mejorar muchas enfermedades simultáneamente.

25

Hay numerosos paralelismos entre las diferentes enfermedades neurodegenerativas incluyendo el ensamblaje atípico de proteínas además de la muerte celular inducida. El proceso de neurodegeneración se puede encontrar afectando a muchos niveles de organización de las redes neuronales abarcando desde el nivel molecular al sistémico. En particular, una enfermedad

30

de la neurona motora (ENM) es cualquiera de las enfermedades neurodegenerativas que afectan selectivamente a las neuronas motoras o motoneuronas, las células que controlan los músculos de control voluntario (músculo esquelético) del cuerpo. Estas enfermedades incluyen ELA, paraplejia espástica hereditaria (PEH), Esclerosis Lateral Primaria (ELP),

35

Atrofia Muscular Progresiva (AMP), Parálisis bulbar progresiva (PBP) y Parálisis Pseudobulbar.

**DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

- Figura 1:** Efecto de la concentración de LPA sobre la supervivencia de cultivos primarios de motoneuronas de medula espinal (SMNs) obtenidas de embriones de ratones CD1. Los datos se presentan como el porcentaje de SMNs presentes a los 8 días *in vitro* (DIV) con respecto a la situación control (tomada como 100%) después de la adición al medio de las concentraciones indicadas de LPA a 6 DIV durante 30 minutos. La media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de al menos 3 pocillos de dos experimentos independientes se representa por dosis. \*  $P < 0,05$ . ANOVA de un factor.
- 5
- Figura 2.** La toxicidad de LPA sobre SMNs depende principalmente de LPA1. Los datos se presentan como el porcentaje de SMNs presentes a los 8 días *in vitro* (DIV) con respecto a la situación de control (tomada como 100%) después de la adición al medio durante 30 minutos a 6 DIV de las concentraciones indicadas de LPA. La media  $\pm$  SEM de al menos 3 pocillos de dos experimentos independientes se representa por condición y dosis. Nótese que el pretratamiento con un pequeño ARN interferente contra LPA1 (siRNA<sub>lpa1</sub>, 2  $\mu$ M) redujo significativamente la toxicidad de LPA en SMNs en comparación con las pretratadas con un ARN sin secuencia objetivo (ARNc, 2  $\mu$ M). \*  $P < 0,001$ , ANOVA de dos factores, método *post hoc* Holm-Sidak.
- 10
- 15
- Figura 3:** Niveles de expresión de LPARs en SMNs obtenidas de embriones de ratón de un modelo de ELA (SOD1<sup>G93A</sup>) y de sus controles no transgénicos (No-Tg). Los niveles de ARNm están representados para los receptores LPA1, LPA2 y LPA3 en cultivos de 2 a 8 días en cultivo. Los valores se han relativizado con respecto a los niveles de expresión de GAPDH. Se observa cómo los niveles de expresión para LPA1 aumentan drásticamente en los cultivos de SOD1<sup>G93A</sup> con respecto a los controles conforme éstas maduran *in vitro* (flechas). \*  $p < 0,05$ , test *U* de Mann-Whitney.
- 20
- 25
- Figura 4.** Toxicidad diferencial de LPA sobre la supervivencia de SMNs obtenidas de SOD1<sup>G93A</sup> y embriones no transgénicos (No-Tg). Se representa el porcentaje de SMNs presentes a los 8 días *in vitro* (DIV) con respecto a la situación de control (tomada como 100%) después de la adición al medio durante 30 min a 6 DIV de las concentraciones indicadas de LPA. Se representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, 2 pocillos por condición. Nótese como el LPA tuvo un efecto más tóxico sobre las SMNs obtenidas del modelo de ELA que en los controles.  $P = 0,007$ ,
- 30
- 35
- ANOVA de dos factores, método *post hoc* Holm-Sidak.

**Figura 5.** Niveles de expresión de LPA1 en la médula espinal lumbar del modelo de ratón de ELA (SOD1<sup>G93A</sup>) y sus hermanos de camada no transgénicos (Non-Tg). Los niveles de ARNm están representados para el receptor LPA1 en la médula espinal lumbar extraída de SOD1<sup>G93A</sup> y ratones sanos (No-Tg) a la edad indicada. Los valores se han relativizado con respecto a los niveles de expresión de GAPDH. Se observa cómo los niveles de expresión para LPA1 ya están aumentados en la etapa pre-sintomática (2 meses) y permanecen aumentados en la etapa sintomática (3 meses). n = 4-6 animales por condición. \* p<0,05, test de la t de Student.

**Figura 6.** Estudio de la eficacia del tratamiento con el ARN interferente contra LPA1 (siRNA<sub>LPA1</sub>) sobre la expresión de LPA1 en medula espinal de ratones controles. Los niveles de mRNA para el receptor LPA1 en la médula espinal lumbar extraídos de ratones CD1 se representan 2 semanas después de la administración intracerebroventricular de una dosis única de siRNA<sub>LPA1</sub> (80 µg/Kg) o un ARN de control (cRNA; 80 µg/Kg). Los valores se han relativizado con respecto a los niveles de expresión de GAPDH. Se observa cómo los niveles de expresión para LPA1 disminuyen 2 semanas después de la inyección de siRNA<sub>LPA1</sub> con respecto a los tratados con cRNA. n=3 animales por condición. \* p<0,05, test U de Mann-Whitney.

**Figura 7.** Efecto neuroprotector de siRNA<sub>LPA1</sub> sobre la supervivencia de las neuronas motoras de la médula espinal en el modelo murino de ELA. El número promedio de neuronas motoras en el segmento L3-L5 de ratones SOD1<sup>G93A</sup> sacrificados a los 4 meses de edad (estado sintomático tardío) está representado después de recibir un tratamiento crónico con siRNA<sub>LPA1</sub> (80 µg/kg/semana) o cRNA (80 µg/kg/semana) desde el mes 2 de vida. 10 animales transgénicos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos antes de recibir los tratamientos indicados. Los animales que pertenecían a cada grupo se mantuvieron ocultos para el investigador que realizó los análisis cuantitativos. \*P <0,001, test de la t de Student.

**Figura 8.** El tratamiento con siRNA<sub>LPA1</sub> aumentó la esperanza de vida del modelo murino de ELA. Se representa la curva de supervivencia de Kaplan-Meier de las dos poblaciones de ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup> que tratados con siRNA<sub>LPA1</sub> (80 µg/kg/semana; n=17 ratones) o con ARNc (80 µg/kg/semana; n=13 ratones). Como en la figura anterior, el tratamiento comenzó a los 2 meses de edad. Los ratones se distribuyeron al azar en dos grupos antes de comenzar el experimento. Los animales que pertenecían a cada grupo se mantuvieron ocultos para el investigador que realizó

el análisis de supervivencia.  $P < 0,05$ , análisis de supervivencia de Kaplan-Meier: test Log-Rank.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.****Ejemplos**

**Ejemplo 1: Animales:** Ratones macho adultos (>2 meses de edad) CD1, SOD1<sup>G93A</sup> (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) y sus hermanos de camada no transgénicos; y, hembras CD1 y SOD1<sup>G93A</sup> preñadas (12,5 días de gestación). Los animales fueron suministrados por el servicio de producción y experimentación animal (SEPA) local. El cuidado y manejo de los animales siguió las directivas europeas (86/609/UE) sobre el uso de animales de laboratorio. Los animales se estabularon en jaulas individuales con agua y comida *ad libitum*, a temperatura de 21± 1°C, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se pusieron todos los medios disponibles para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento. Todos los procedimientos quirúrgicos fueron llevados a cabo bajo condiciones asépticas. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética y Cuidado Animal local.

**Ejemplo 2: PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR):** Se extrajo el ARN total de la médula espinal o de cultivos de SMNs (100.000 células por pocillo) utilizando el reactivo de aislamiento TRIsure (BioLine). Este procedimiento nos permitió el aislamiento de las fracciones de ARN, ADN y proteína de una sola muestra. A continuación, se trató con un kit de DNasa libre de RNasa (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante, para reducir la contaminación con ADN. La concentración y pureza de las muestras de ARN se determinaron por espectrofotometría a 260 y 280 nm. La retrotranscripción (RT) se realizó utilizando hexámeros aleatorios, se utilizaron 500 ng de ARN total y un kit de síntesis de cDNA iScript™ (BIO-RAD). Para la RT-PCR en tiempo real, cada producto génico fue amplificado con el sistema MiniOpticon™ (BIO-RAD), usando la iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD). Los *primers* para las PCRs fueron: para *gapdh*, 5'-AGAACATCATCCCTGCATCCA-3' (forward) (SEQ ID NO: 1), 5'-AGATCCACGACGGACACATTG-3' (reverse) (SEQ ID NO: 2); para *lpa1*, 5'-TGACTGTTAGCACGTGGCTCCT-3' (forward) (SEQ ID NO: 3), 5'-GGAAAACCGTGATGTGCCTCT-3' (reverse) (SEQ ID NO: 4); para *lpa2*, 5'-TACCTGCACACTTCTGGCACTG-3' (forward) (SEQ ID NO: 5), 5'-GGAAGACAAGCAGGCTGGATAG-3' (reverse) (SEQ ID NO: 6); para *lpa3*, 5'-ACATCTCGGCCTGCTCTTCTCT-3' (forward) (SEQ ID NO: 7), 5'-AGATGCGTACGTATACCGCCAC-3' (reverse) (SEQ ID NO: 8). Los niveles de ADNc entre diferentes muestras fueron determinados utilizando el método  $\Delta\Delta$ CT, siendo *gapdh* el gen de referencia. La especificidad de la ampliación fue confirmada por el análisis de la curva de *melting* de los productos de la PCR. Todos los análisis se realizaron por triplicado, con cada experimento repitiéndose al menos dos veces.

**Ejemplo 3: Cultivos primarios de SMNs y ensayos de supervivencia:** se prepararon cultivos primarios de motoneuronas de medula espinal de ratón (SMNs) a 12,5 días de gestación (E12,5), siguiendo un protocolo establecido anteriormente en nuestro laboratorio. Brevemente, primero se disgregaron químicamente la porción

5 ventral de las médulas de los embriones (solución buffer de 0,025% de tripsina en Glucosa-HEPES suplementado con 20 i.u/ml de penicilina y 20 mg/ml de estreptomina), y se disociaron mecánicamente para posteriormente ser recogidas en una balsa de 4% de albumina de suero bobina. La centrifugación (10 min, 520xg) en un gradiente de densidad de Iodixanol (OptiPreo, Axis-Shield, Oslo, Noruega) nos

10 permitió aislar las células más grandes, las cuales fueron centrifugadas una vez más a través de una balsa de albumina de suero bobina. Las células aisladas se aruparon en un tubo con medio de cultivo y se cultivaron a varias densidades dependiendo del tipo de experimento. Los cultivos de SMNs se identificaron claramente por inmunofluorescencia para SMI32 o por criterios morfológicos. Las SMNs se cultivaron

15 en *Neurobasal medium* (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) suplementado con B27 (Gibco; Invitrogen), suero de caballo (2% v/v), L-Glutamina (0,5 nM), 2-mercaptoetanol (25 µM; Sigma-Aldrich) y un cóctel de factores neurotróficos (NTFs): 1 ng/mL factor neurotrófico derivado de cerebro, 10 ng/mL factor neurotrófico derivado de una línea celular de glía, 10 ng/mL de factor neurotrófico ciliar, 10 ng/mL de factor de crecimiento de hepatocitos (PreProtech, London, UK). Las SMNs aisladas se

20 cultivaron en placas de 4 pocillos (Nunc, Thermo-Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) para experimentos de supervivencia (2,000 SMNs/pocillo) o para RT-PCR (100,000 células por pocillo). Para evaluar la supervivencia delas SMNs, el día de la siembra las células se trataron con medio completo suplementado con los factores neurotróficos (NTFs) o no (no NTFs). Seis días después de la siembra, el medio de cultivo con NTFs fue remplazado por el mismo medio, pero suplementado con los distintos tratamientos experimentales. Para medir la supervivencia, se contó el número de células grandes que presentaban un aspecto brillante con neuritas largas, en el

25 área total del pocillo por triplicado, para cada condición, 48 horas después del último tratamiento. El número medio de células supervivientes (en porcentaje) se normalizó tomando el medio con NTF como 100%.

30

**Ejemplo 4: Análisis histológico:** Los animales, bajo anestesia profunda (7% de hidrato de cloral), recibieron una inyección intraventricular de heparina e

35 inmediatamente se perfundieron transcárdialmente con solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón de fosfato 0,1 M (PB), pH 7,4, a 4°C. Las médulas espinales lumbares (L3-L5) se diseccionaron

rápida y se fijaron posteriormente durante 2 h en PFA al 4%. El material se crioprotegió por inmersión en sacarosa al 30% en PB 0,1 M (4°C, toda la noche). Las secciones coronales en serie (30 µm de grosor), obtenidas por medio de un micrótopo de congelación, se mantuvieron a -20°C en una solución crioprotectora (glicerol/PBS, 1:1 v/v) hasta su procesamiento. Para inmunohistoquímica, después del lavado con PBS, las secciones se sumergieron en una solución bloqueante [albúmina sérica bovina al 2,5% (p/v), azida sódica al 0,25% (p/v) y Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS] durante 30 minutos, seguido de una incubación con el anticuerpo primario policlonal anti-SMI32 (1:8000; Covance) desarrollado en ratón (4°C, toda la noche). A continuación, el tejido se lavó con PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG anti-ratón biotinilada (1:400, Jackson laboratory) como anticuerpo secundario. La biotina se detectó por medio del sistema de avidina-biotina-peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, USA) usando como cromógeno 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloruro. Las secciones se montaron en portaobjetos, se deshidrataron, se cubrieron con DePeX y se visualizaron con microscopio óptico. Las secciones se analizaron usando un microscopio invertido Olympus IX81 (Olympus, Japón). Se cuantificó el número de neuronas con un núcleo bien definido en una de cada seis secciones seriadas en el segmento L3-L5 de la médula espinal lumbar. Las motoneuronas identificadas con SMI-32 se contaron en 30 secciones de la médula espinal lumbar de ratones SOD1<sup>G93A</sup> de 120 días de edad. Todas las cuantificaciones fueron llevadas a cabo por un investigador al que se le ocultó el tratamiento.

**Ejemplo 5. Cirugía para la administración crónica de oligonucleótidos en ratones:** Ratones machos transgénicos o controles fueron suministrados a P30, etapa pre-sintomática para los ratones SOD1<sup>G93A</sup>. La cirugía para implantar el sistema de infusión mediante una cánula (Plastics One Inc., Roanoke, VA, USA) para la administración crónica intracerebroventricular de oligonucleótidos se realizó en animales a los 2 meses de edad. Brevemente, bajo anestesia general (1,5-3% de isoflurano mezclado con 100% de O<sub>2</sub>), los ratones se fijaron con barras a un aparato estereotáxico y, tras el afeitado y la desinfección de la zona, se realizó una incisión longitudinal en la piel. La cánula guía y su respectiva cánula interior se aproximaron cuidadosamente a través de una ventana redonda perforada (0,5 mm de diámetro) en la línea media de la unión del hueso interparietal-occipital. La cánula se colocó en paralelo y próximo a la cara interna del hueso occipital. El sistema de infusión finalmente se unió al cráneo por medio de resina acrílica una vez que el extremo de la cánula guía se situó cerca del cuarto ventrículo. Para ganar en estabilidad y resistencia, todo el sistema se cementó con la misma resina a cuatro tornillos fijados a

ambos huesos parietales. Los animales se sacrificaron a diferentes puntos temporales tras la cirugía dependiendo del paradigma experimental. Todos los animales recibieron una inyección postoperatoria de penicilina (20,000 i.u./kg; i.m.) para prevenir la infección y pirazolona (0,1 mg/kg; i.m.) para la analgesia postoperatoria. El análisis de supervivencia de los animales se llevó a cabo mediante el test Log-Rank de Kaplan-Meier para discriminar diferencias estadísticas. La etapa final para cada animal se definió como el día en que los ratones no pudieron incorporarse durante los 30 s posteriores de haber sido colocados sobre uno de sus lados. En este momento, los animales fueron sacrificados usando una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono.

**Ejemplo 6. Fármacos y tratamientos:** Los cultivos de SMNs se trataron a diferentes DIV dependiendo de la serie experimental. Los oligonucleótidos (cRNA, siRNA<sub>lpa1</sub>; 2 µM cada uno) se añadieron al medio de cultivo a 1 DIV, y se lavaron a 6 DIV. Luego, se añadió LPA (que variaba de  $10^{-14}$  a  $10^{-4}$  M) a la solución durante 30 minutos. Ratones adultos (2 meses de edad) recibieron una primera inyección intracerebroventricular de ARNc (2 µg/5 µl) o siRNA<sub>lpa1</sub> (2 µg/5 µl), en tampón siRNA (Dharmacon), justo después de la implantación de la cánula. La administración de oligonucleótidos se repitió semanalmente bajo anestesia ligera (0.5-1.0% de isoflurano mezclado con 100% de O<sub>2</sub>) para evitar movimientos repentinos inesperados del animal durante la administración. Una cánula de infusión con el diámetro externo apropiado se llenó con 5 µl de solución que contenía los oligonucleótidos. La microinyección intracerebroventricular de la solución se realizó lentamente durante un período de 10 minutos impulsado por un sistema de tubos llenos de aceite conectado a una jeringa Hamilton. Después de la inyección, la cánula se dejó en su lugar durante 5 minutos y luego se extrajo lentamente. La secuencia diana para el siRNA<sub>lpa1</sub> fue 5'-UCAUUGUGCUUGGUGCCUU-3' (SEQ ID NO: 9).

**Ejemplo 7. Estadísticas:** Los datos resumen se representan como la media ± SEM. El número de especímenes analizados por paradigma experimental y los test estadísticos aplicados para cada grupo de datos, se indican en las leyendas de las figuras o en la sección de resultados. Los análisis estadísticos se aplicaron utilizando el programa SigmaPlot (Systat Software, Inc). El nivel mínimo de significancia fue fijado a  $p < 0,05$  para todos los test estadísticos empleados sobre grupos de datos con varianza similar. Para comparación entre dos grupos se utilizó la t de Student no pareada, a no ser que se especifique lo contrario, para datos con distribución normal, o la U Mann-Whitney para grupos de datos no paramétricos. Se aplicó el test ANOVA de

un factor o de dos factores seguido del método *post hoc* de Holm-Sidak para comparar 3 o más grupos que pasaron el test de normalidad. Ningún dato se excluyó del análisis estadístico. En los estudios en los que se usaron ratones SOD1<sup>G93A</sup> los grupos fueron ocultados al investigador. El resto de experimentos no fueron ocultados a menos que se indique lo contrario.

**Ejemplo 8. Resultados:** Se investigó el efecto de diversas concentraciones de LPA (desde concentraciones fisiológicas a patológicas) sobre la supervivencia de cultivos primarios de SMNs para evaluar la posible toxicidad sobre motoneuronas de este lisofosfolípido bioactivo derivado de membrana (**Figura 1**). De esta forma, las concentraciones más bajas de LPA evaluadas (hasta 10 nM) no afectaron la supervivencia de las SMNs (**Figura 1**). Sin embargo, concentraciones más altas (de 100 nM a 100  $\mu$ M) redujeron significativamente la supervivencia de las SMNs en una forma dependiente de la concentración (**Figura 1**). Por lo tanto, las concentraciones patológicas de LPA (micromolar) son tóxicas para las motoneuronas, al menos, en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, el pretratamiento de las SMNs con un ARN interferente pequeño dirigido contra el ARNm para LPA1 (siRNA<sub>LPA1</sub>) redujo drásticamente la toxicidad del LPA sobre las SMNs en comparación con los cultivos pretratados con un ARN de secuencia no complementaria (ARNc) (**Figura 2**). Estos resultados indican que el efecto tóxico del LPA sobre las SMN está mediado principalmente por la activación del receptor LPA1.

La ELA, la enfermedad neurodegenerativa más letal, cursa con la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. El ratón transgénico de la superóxido dismutasa 1 (SOD1)<sup>G93A</sup>, modelo de ELA familiar, es el modelo de ELA principalmente utilizado en estudios básicos y preclínicos. Por tanto, los inventores buscaron evidencias de la participación de la señalización desencadenada por LPA1 en esta condición neuropatológica utilizando el modelo de ELA familiar. Entonces, se investigó el patrón de expresión de LPA1 en cultivos primarios de SMNs obtenidos de embriones que expresan el transgén SOD1<sup>G93A</sup> (SMNs<sup>G93A</sup>). Se encontró altos niveles de expresión del ARNm para LPA1 en SMNs<sup>G93A</sup> en comparación con SMNs no transgénicas (SMNs<sup>No-Tg</sup>) de 2 DIV a 8 DIV (**Figura 3**). Sin embargo, los niveles de expresión de ARNm para LPA2 o LPA3 fueron similares en ambos tipos de SMNs. Coherentemente, el LPA resultó más tóxico para SMNs<sup>G93A</sup> que para SMNs<sup>No-Tg</sup> (**Figura 4**). Tomados en conjunto, estos datos apoyan un aumento en la señalización mediada por LPA1 en el modelo celular de ELA en relación con las células no transgénicas.

A continuación, se estudió si se produjo una ganancia de la señalización de LPA1 en la médula espinal lumbar de ratones modelo de ELA. De esta forma, el ARNm para LPA1 ya estaba sobre-expresado en la medula espinal de los ratones SOD1<sup>G93A</sup> extraídas a los 2 meses de edad (pre-sintomáticos) que se mantuvo en ratones de 3 meses de edad (sintomáticos) en comparación con sus hermanos de camada no transgénicos (**Figura 5**). Por lo tanto, una ganancia en la señalización mediada por LPA1 parece ser un mecanismo patogénico implicado en el curso de la enfermedad en el modelo murino de ELA. Ese fue el antecedente para analizar preclínicamente la posible acción neuroprotectora del siRNA<sub>lpa1</sub> en este modelo murino. Los experimentos anteriores demostraron que una sola inyección intracerebroventricular de siRNA<sub>lpa1</sub> disminuyeron de manera efectiva los niveles de ARNm para LPA1 en la médula espinal lumbar de los ratones control durante, al menos, dos semanas, en comparación con la administración de ARNc (**Figura 6**). Posteriormente, los ratones SOD1<sup>G93A</sup> se trataron con siRNA<sub>lpa1</sub> o cRNA, como control. El tratamiento comenzó a los 2 meses de edad y cada animal recibió una sola inyección del oligonucleótido cada semana. Para evaluar un posible efecto beneficioso del siRNA<sub>lpa1</sub> sobre la degeneración de la motoneuronas, se cuantificó el número de motoneuronas en los segmentos lumbares L3-L5 de la médula espinal extraída de ratones con ELA a los 4 meses de edad. Sorprendentemente, el número de motoneuronas fue mayor en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con siRNA<sub>lpa1</sub> que en los tratados con ARNc (**Figura 7**). Estos resultados indican que la reducción en la expresión de LPA1 retrasó la degeneración de las motoneuronas en este modelo de ELA. De forma concluyente, el tratamiento con siRNA<sub>lpa1</sub> prolongó la esperanza de vida de los ratones transgénicos en relación con la cohorte tratada con ARNc (**Figura 8**).

En conjunto, estos resultados apuntan a la sobreexpresión de LPA1 como un evento clave en la progresión de la enfermedad en este modelo de ELA, y señalan al LPA1 como un posible biomarcador con interés en el diagnóstico y en el pronóstico de la enfermedad. Finalmente, los hallazgos preclínicos apoyan la inhibición del LPA1 como una estrategia potencial para el tratamiento de pacientes con ELA.

**REIVINDICACIONES**

1. Método *in vitro* para el diagnóstico o pronóstico de enfermedades de la neurona motora en un paciente el cual comprende: (a) medir el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en una muestra biológica extraída del paciente; (b) en donde la identificación de una variación o desviación estadísticamente significativa en el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en el paso (a) según se compara con el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) identificado en un sujeto de referencia control sano, es indicativo de que el paciente sufre una enfermedad de la neurona motora o tiene un mal pronóstico.
2. Método *in vitro* para el diagnóstico o pronóstico de enfermedades de la neurona motora, de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende: (a) medir el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en una muestra biológica extraída del paciente; (b) en donde si el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en el paso (a) es estadísticamente superior al nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) obtenido de un sujeto control sano, es indicativo de que el paciente sufre una enfermedad de la neurona motora o tiene un mal pronóstico.
3. Método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento y/o predecir la respuesta a un tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad de la neurona motora, el cual comprende: (a) medir el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en una muestra biológica extraída del paciente después del tratamiento; (b) en donde si el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en el paso (a) es estadísticamente inferior que el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) antes del tratamiento, es indicativo que el paciente está respondiendo al tratamiento.

4. Método *in vitro* para identificar y producir posibles compuestos útiles en el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad de la neurona motora, el cual comprende: (a) medir el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en una muestra biológica extraída del paciente después de la administración del compuesto; (b) en donde si el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) en el paso (a) es estadísticamente inferior que el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) determinado antes de la administración del compuesto, es indicativo de que el compuesto seleccionado es efectivo en el tratamiento de enfermedades de la neurona motora.
5. Método *in vitro*, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, cuando la enfermedad de la neurona motora es esclerosis lateral amiotrófica y/o cuando la muestra biológica es sangre o fluido cerebroespinal.
6. Uso *in vitro* del nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA) como un biomarcador para el diagnóstico de enfermedades de la neurona motora, para predecir la respuesta a un tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad de la neurona motora, para identificar y producir compuestos útiles para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades de la neurona motora o para la producción de compuestos útiles en el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades de la neurona motora.
7. Uso *in vitro* de un kit que contiene reactivos para determinar el nivel de expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) y/o la concentración del ácido lisofosfatídico (LPA), para el diagnóstico de enfermedades de la neurona motora, para predecir la respuesta a un tratamiento en un paciente que sufre una enfermedad de la neurona motora, para identificar y producir un compuesto útil en el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades de la neurona motora o para la producción de compuestos útiles en el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades de la neurona motora.
8. Uso *in vitro*, de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, cuando la enfermedad de la neurona motora es la esclerosis lateral amiotrófica.

9. El receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) para el uso en el tratamiento de enfermedades de la neurona motora caracterizado por que la expresión del receptor 1 de ácido lisofosfatídico (LPA1) es inhibida o interrumpida.

5

10. El receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) para su uso, de acuerdo a la reivindicación 9, cuando la enfermedad de la neurona motora es la esclerosis lateral amiotrófica.

10

11. Compuesto capaz de inhibir o interrumpir específicamente la expresión del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1), para su uso en enfermedades de la neurona motora.

15

12. Compuesto para uso, de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que actúa específicamente sobre el ARNm del receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) e inhibe la traducción de dicho ARNm, o es un antagonista selectivo para el receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1).

20

13. Compuesto para uso, de acuerdo con las reivindicaciones 11 ó 12, cuando la enfermedad de la neurona motora es la esclerosis lateral amiotrófica.

25

14. Compuesto para uso, de acuerdo con las reivindicaciones de la 11 a la 13, caracterizado en que el tratamiento es aplicado una vez el paciente es diagnosticado utilizando los métodos descritos en las reivindicaciones 1 ó 2.

30

15. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 14 y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35

Figura 1:

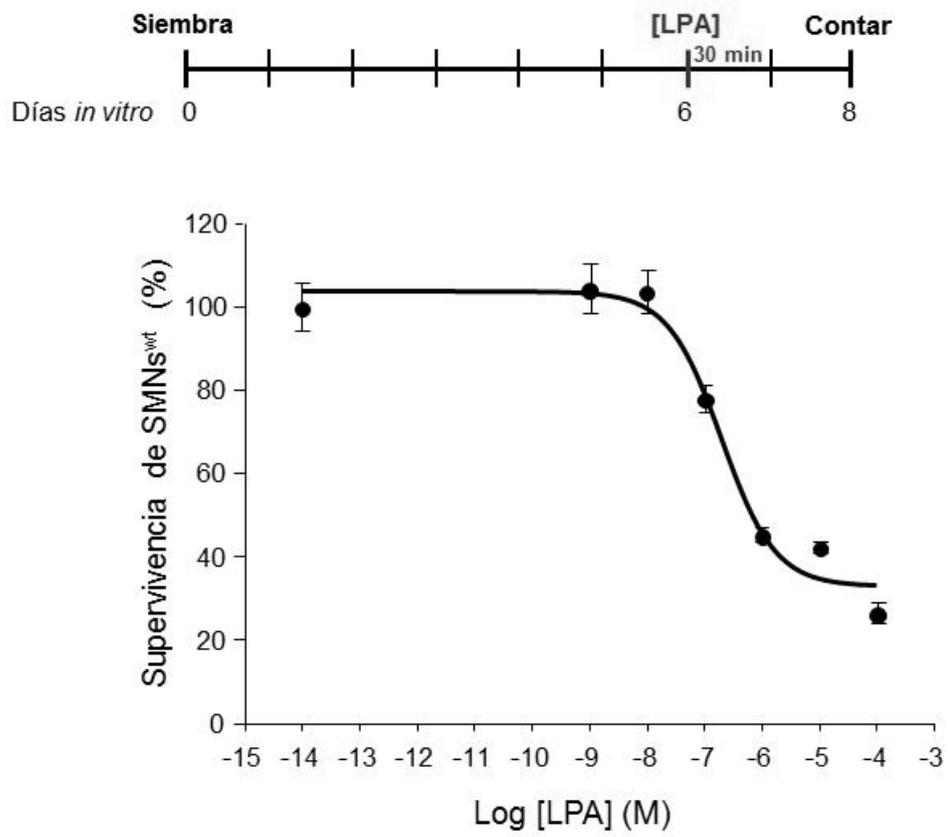


Figura 2:

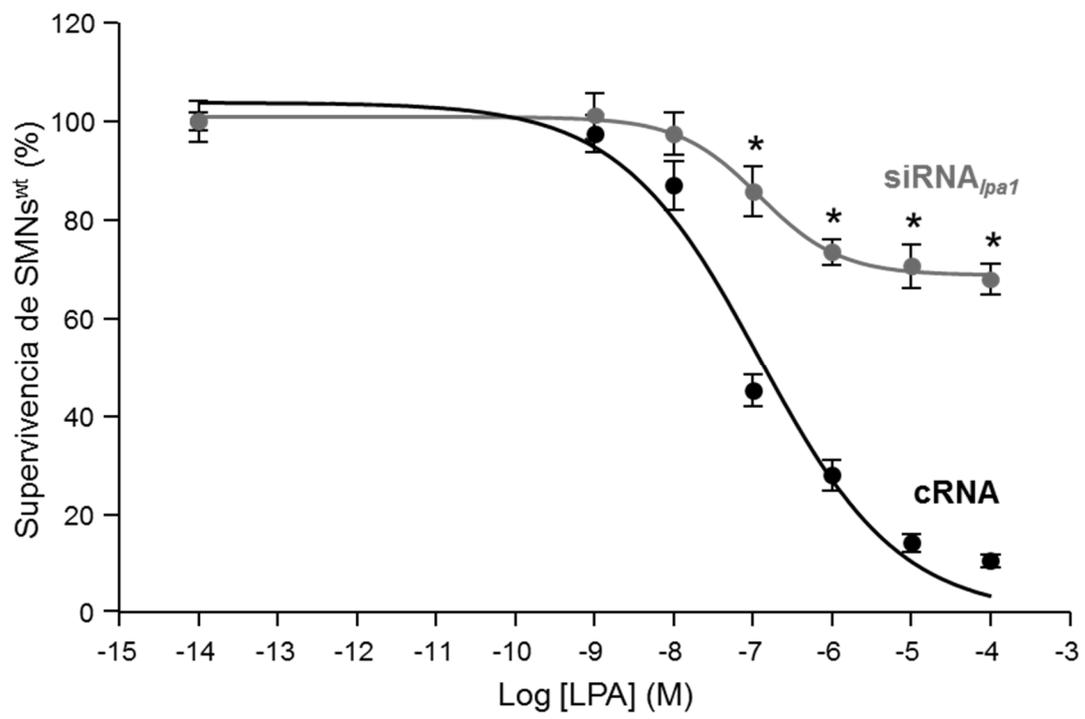


Figura 3:

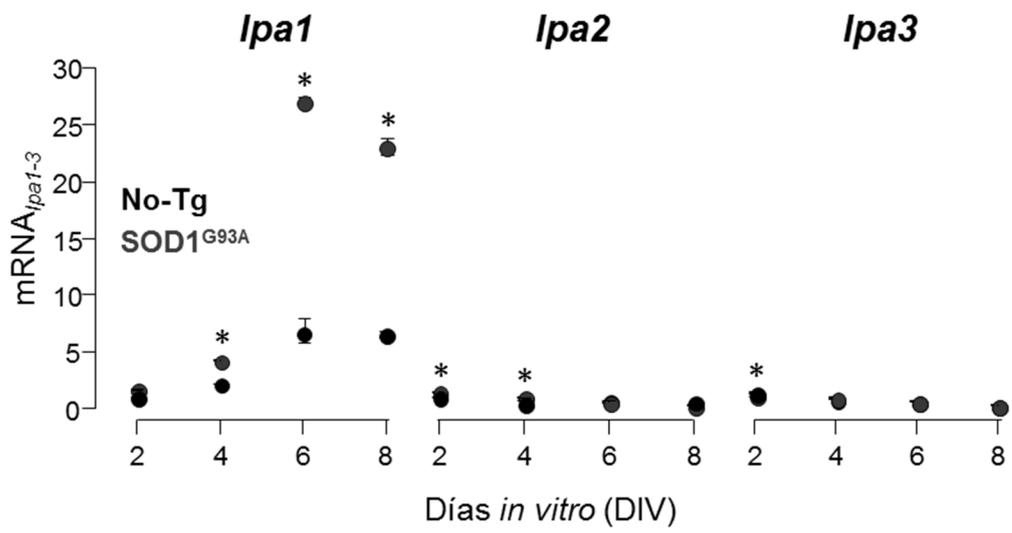


Figura 4:

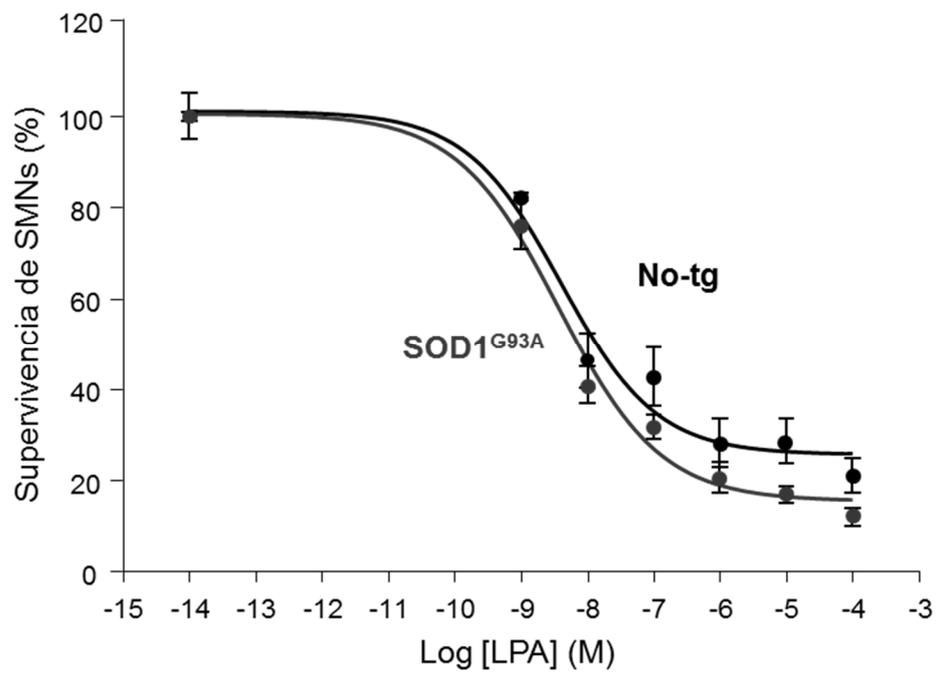


Figura 5:

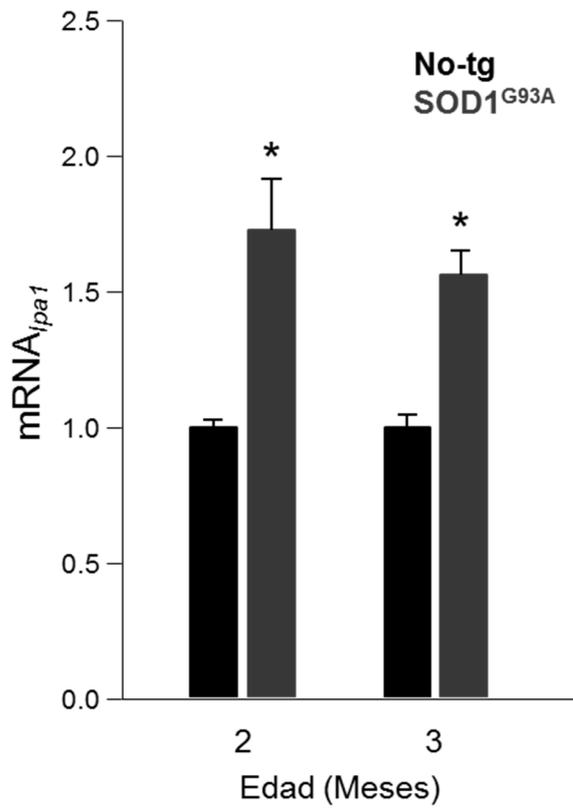


Figura 6:

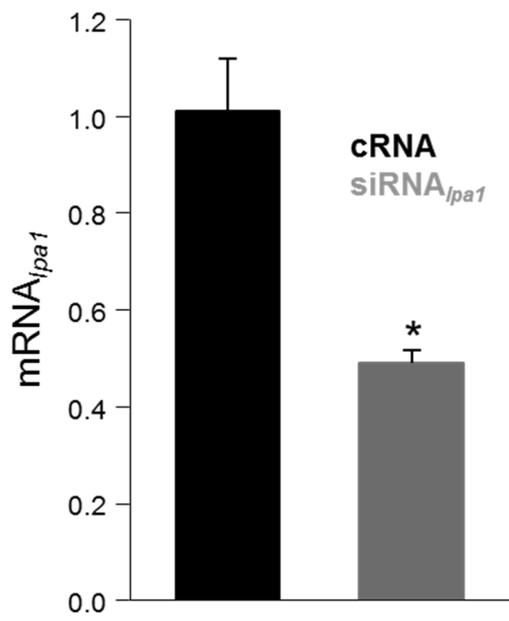


Figura 7:

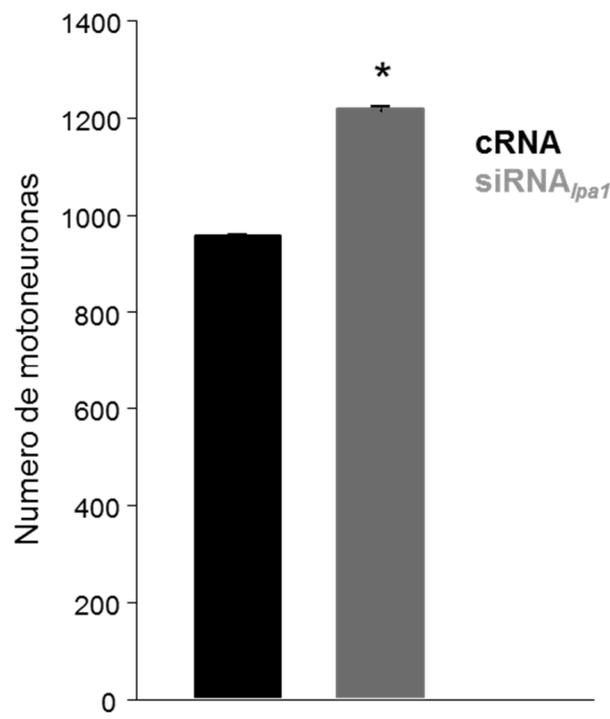
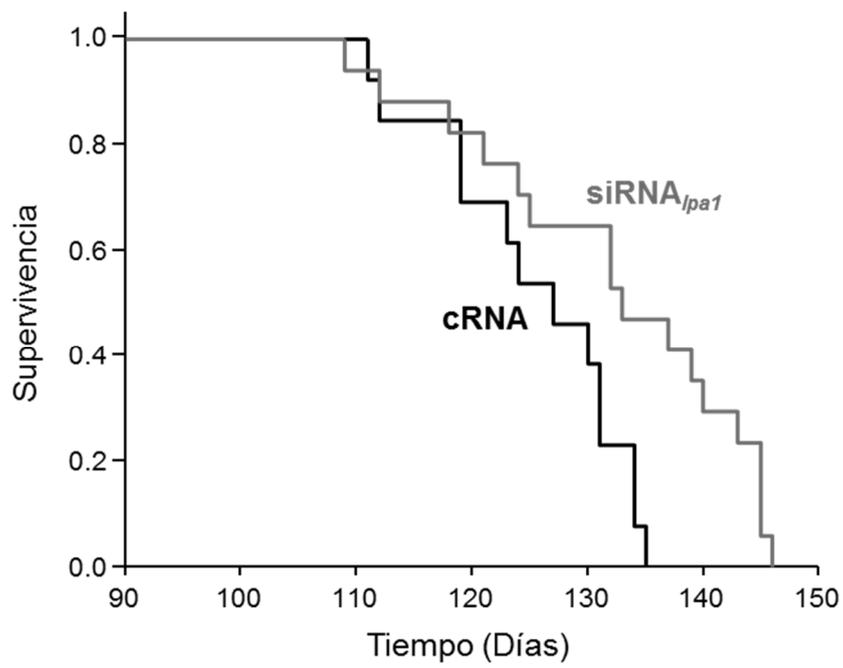


Figura 8:





- ① N.º solicitud: 201830615  
② Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2018  
③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005093091 A2 (BAYER HEALTHCARE AG et al.) 06/10/2005, página 3, línea 18 – página 4, línea 15; página 21, línea 32 - página 22, línea 32; página 26, líneas 14 - página 27, línea 22; página 29, líneas 14 - página 30, línea 4; página 39, línea 22 - página 40, línea 31; página 56, líneas 1-23; página 62, líneas 1-7, 21-26; página 66, líneas 10-18; página 69, líneas 16- 24; reivindicaciones 1-3, 18, 26.	1-15
X	WO 2004044580 A1 (BAYER HEALTHCARE AG et al.) 27/05/2004, página 4, líneas 11-25; página 30, línea 1 - página 31, línea 14; página 36, líneas 14 - página 37, línea 28; página 40, líneas 16 - página 41, línea 13; página 54, línea 19 - página 56, línea 13; página 73, líneas 25-31; página 74, líneas 17-23; página 79, líneas 18-27; página 83, líneas 21-26; reivindicaciones 1-3, 18, 26.	1-15
X	US 2016146844 A1 (SABBADINI ROGER A et al.) 26/05/2016, párrafos [[114-115], [131-135], reivindicaciones 7-19	1-7
A	VELASCO MARIA et al. Lysophosphatidic acid receptors (LPARs): Potential targets for the treatment of neuropathic pain. Neuropharmacology FEB 2017. , 31/01/2017, Vol. 113, N° Part B, Sp. Iss. SI, Páginas 608-617, ISSN 0028-3908(print) ISSN 1873-7064(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.neuropharm.2016.04.002>. todo el documento.	1-5
A	WO 2013070879 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 16/05/2013, todo el documento.	1-15

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.02.2019

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/3



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201830615  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2018  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LEE GUM HWA et al. Therapeutic Strategies for Neuropathic Pain: Potential Application of Pharmacosynthetics and Optogenetics. Mediators of Inflammation 2016. , 30/11/2015, Páginas Article No.: 5808215, ISSN 0962-9351(print) ISSN 1466-1861(electronic), <DOI: doi:10.1155/2016/5808215>. todo el documento.	1-15
A	LIN MU-EN et al. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance. Prostaglandins & Other Lipid Mediators APR 2010. , 31/03/2010, Vol. 91, Nº 3-4, Sp. Iss. SI, Páginas 130-138, ISSN 1098-8823(print) ISSN 2212-196X(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.02.002>. todo el documento.	1-15
A	YUNG YUN C et al. Thematic Review Series: Lysophospholipids and their Receptors LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. Journal of Lipid Research JUL 2014. , 30/06/2014, Vol. 55, Nº 7, Páginas 1192-1214, ISSN 0022-2275(print) ISSN 1539-7262(electronic), <DOI: doi:10.1194/jlr.R046458>. todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
19.02.2019

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/3

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET