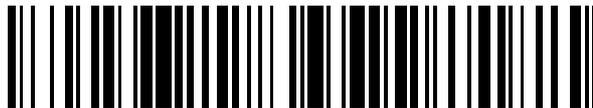


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 950**

21 Número de solicitud: 201831217

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6811 (2008.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.12.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.06.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid ES

72 Inventor/es:

NEUBRAND, Veronika Elisabeth y

DELGADO MORA, Mario

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

54 Título: **Arhgef6 como diana farmacéutica para trastornos neurológicos**

57 Resumen:

Arhgef6 como diana farmacéutica para trastornos neurológicos.

La invención hace referencia al uso del gen Arhgef6 como diana farmacológica para el cribado, ensayo, y/o validación de moléculas, compuestos, agentes, y moduladores útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas, preferiblemente enfermedades neurodegenerativas. Más preferiblemente, la invención hace referencia también a moléculas, compuestos, agentes, y moduladores capaces de inhibir la expresión del gen Arhgef6, induciendo un fenotipo neuroprotector de células microgliales lo que posibilita reducir o detener los procesos de neurodegeneración que ocurren en mamíferos, preferiblemente en humanos.

ES 2 766 950 A1

DESCRIPCIÓN

Arhgef6 como diana farmacéutica para trastornos neurológicos

5 La invención hace referencia al uso del gen *Arhgef6* como una diana farmacéutica para el cribado, ensayo, y/o validación de moléculas, compuestos, agentes, y moduladores útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas, preferiblemente enfermedades neurodegenerativas. Más preferiblemente, la invención también hace referencia a moléculas, compuestos, agentes, y moduladores capaces
10 de inhibir la expresión del gen *Arhgef6*, induciendo un fenotipo neuroprotector de células microgliales que hace posible reducir o detener los procesos de neurodegeneración que tienen lugar en mamíferos, preferiblemente humanos.

ESTADO DEL ARTE

15

La neuroinflamación es un proceso fundamental que contribuye a la muerte de neuronas en las enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo en la enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA) y Esclerosis Múltiple (EM). La neuroinflamación subyacente en estas enfermedades neurodegenerativas se
20 caracteriza por la activación de células microgliales (Gonzalez *et al.*, 2014; Wolf *et al.*, 2017). Durante este proceso inflamatorio las células microgliales adquieren la forma de una célula ameboide y, entre otros mecanismos, disminuyen la liberación de factores neurotróficos, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), y secretan sustancias citotóxicas, que conducen a
25 la muerte neuronal. En contraposición, en un cerebro saludable, las células microgliales se encuentran en una morfología ramificada y soportan una variedad de funciones del SNC secretando factores neurotróficos. Es interesante señalar que las células microgliales no son permanentes en uno u otro estado de actividad, sino que en lugar de ello son capaces de cambiar entre diferentes fenotipos y estados de
30 actividad. Por lo tanto, entender la maquinaria molecular que invierte la activación inflamatoria de las células microgliales es esencial para la protección contra la neurodegeneración.

En la EA, es conocido que las células microgliales se acumulan alrededor de las
35 placas beta-amiloides, y las mutaciones en diversos genes microgliales pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad. La incapacidad de las células

microgliales de conservar una producción constante de beta-amiloides conduce a la liberación de factores inflamatorios que comprometen aún más las funciones celulares, transformándolas finalmente en una forma asociada a enfermedad que induce una neuroinflamación perjudicial constante. En la EP, es conocido que las células microgliales activadas son abundantes en la sustancia negra, la estructura cerebral que resulta dañada en la enfermedad. Los estudios de PET han mostrado células microgliales inflamatorias extendidas en un estadio temprano en el transcurso de la enfermedad, y la evidencia sugiere que el mismo tipo de situación de tipo “espada de doble filo” observada en la enfermedad de Alzheimer – en la que las células microgliales inicialmente protectoras escapan a la regulación, lo que conduce a una neuroinflamación perjudicial constante --, también ocurre en la enfermedad de Parkinson. En la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se han encontrado células microgliales inflamatorias cerca de las neuronas lesionadas en el cerebro de los pacientes.

Por tanto, la capacidad de identificar fácilmente las células microgliales activadas ha provocado un interés considerable en su valor como indicadores de una patología y, de ahí, su potencial de diagnóstico. Además, un interés sustancial rodea el posible papel de las células microgliales activadas en la patogénesis de enfermedades, y la cuestión de si la actividad de las células microgliales activadas exacerba la patología o ayuda en la reparación tisular y mejora la enfermedad.

En este sentido, es conocido que las células microgliales primarias expuestas a células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs, por sus siglas en inglés) o sus factores secretados (medio condicionado, MC), sufrieron un cambio de forma celular dramático hacia una morfología sumamente alargada *in vitro* (Neubrand *et al.*, *Glia*. 2014;62(12):1932-42), similar al fenotipo de células microgliales observado en un cerebro sano. La elongación inducida por el MC se asoció con una regulación por incremento de factores neurotróficos, tales como el BDNF, que es indicativo de la adquisición de un fenotipo neuroprotector. De este modo, las células microgliales estimuladas por el MC representan una herramienta ideal para estudiar los eventos intracelulares necesarios para la transición de unas células microgliales activadas inflamatorias a otras neuroprotectoras no inflamatorias. De hecho, las pequeñas Rho GTPasas Rac1 y Cdc42, han sido identificadas como importantes reguladores del citoesqueleto de actina, y consecuentemente juegan papeles fundamentales en esta transición fenotípica (Neubrand *et al.*, *Glia*. 2014;62(12):1932-42).

5 Trem2, una proteína mieloide implicada en la supervivencia y proliferación de células
microgliales, regula un punto de control necesario para las enfermedades
neurodegenerativas y la delección de Trem2 evita la acumulación de células
10 microgliales alrededor de placas A β y conduce a un daño neurítico adicional (Jay TR,
et al. J Exp Med. 2015;212:287–95; Krasemann S, *et al.* Immunity. 2017;47:566–81.
e569). Estos hallazgos sugieren que las enfermedades neurodegenerativas pueden
dirigirse de forma protectora hacia una fagocitosis y un aclaramiento más efectivos de
agregados de proteínas patológicas en trastornos neurodegenerativos. Sin embargo,
15 la depleción global de células microgliales en modelos de ratón con EA tuvo como
resultado un efecto protector sobre la salud sináptica, independiente del amiloide β
(Han J, *et al.* Mol Brain. 2017;10:25). Éstas enfatizan la inmensa complejidad de roles
funcionales de células microgliales en la neurodegeneración, y soportan la existencia
de distintos estados funcionales pro-inflamatorios dentro de las enfermedades
neurodegenerativas.

Teniendo en cuenta la información mencionada anteriormente, una comprensión
exhaustiva de los reguladores, marcadores y dianas de fármacos claves de fenotipos
de células microgliales homeostáticos, pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en
20 enfermedades neurodegenerativas podría proporcionar nuevas dianas terapéuticas
para el tratamiento de un número de condiciones neurodegenerativas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 La presente invención divulga la identificación del gen *Arhgef6* y/o la proteína
codificada por el mismo, o un fragmento, o derivado, o variante del mismo como diana
de fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

30 La invención se basa en el hecho de que los inventores han observado que la
inhibición de la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6*, y/o su proteína codificada, o
un fragmento, derivado, o variante del mismo, induce un fenotipo neuroprotector de
células microgliales, haciendo posible reducir o detener los procesos de
neurodegeneración que tienen lugar en mamíferos, preferiblemente humanos.

35 Más específicamente, los resultados obtenidos demuestran que la exposición de
cultivos primarios de células microgliales a ARNip contra el gen *Arhgef6*, o un

fragmento, o derivado, o variante del mismo induce un valor de circularidad diferencial negativo (**Tabla 2**) que implica que las células microgliales transfectadas con el ARNip específico contra el gen *Arhgef6* mostraron un patrón de ramificación aumentada.

- 5 En resumen, los resultados de la invención permiten que se desarrollen nuevas aproximaciones terapéuticas para las enfermedades neurodegenerativas, a través del uso de composiciones farmacéuticas que comprenden principios activos que inhiben la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo.
- 10 Por lo tanto, un aspecto de la invención hace referencia al uso del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada de ese modo, o un fragmento, o derivado, o variante del mismo, como una diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas.
- 15 *Arhgef6* (factor intercambiador 6 de nucleótido de guanina (GEF) de Rac/Cdc42) se denomina también alpha-PIX, PIXA, COOL2, MRX46, Cool-2, alphaPIX, alpha-PIX, 1600028C08Rik, 1700038J06Rik y 4930592P22Rik. En el contexto de la presente invención, el gen *Arhgef6* se caracteriza por al menos una de las secuencias identificadas por sus Números de Acceso de Ensembl Gene o NCBI ID. Un experto en
- 20 la materia puede acceder a cualquier secuencia del gen *Arhgef6* a través de bases de datos públicas. Por ejemplo, ENSEMBL (Ensembl versión 89-Mayo 2017) ((MBL--EBI / Wellcome Trust Sanger Institute) tiene los siguientes Números de Acceso del *Arhgef6* humano y de ratón: ENSG00000129675 y ENSMUSG00000031133, respectivamente. Además, los números de acceso del NCBI Gene ID para el *Arhgef6* humano y de ratón
- 25 son 9459 y 73341, respectivamente. El Ensembl gene ID proporcionado para el gen *Arhgef6* puede ser utilizado para determinar la secuencia de nucleótidos del gen, además de las secuencias asociadas de proteínas y del transcrito, introduciendo los datos del Ensemble ID en la base de datos Ensemble (Ensembl versión 89).
- 30 Los nombres de sus proteínas son los siguientes: el factor intercambiador de nucleótido de guanina 6 de Rho, factor intercambiador de nucleótido de guanina (GFE) 6 de Tac/Cdc42, factor intercambiador de nucleótido de guanina de alfa PIX Rho GTPasa, factor intercambiador de nucleótido de guanina 6 de Rac/Cdc42 y factor intercambiador alfa de interacción con PAK. El *Arhgef6* codifica una proteína que
- 35 pertenece a la familia de proteínas del factor intercambiador de guanina Rho (GEF), que activan la familia de tipo Ras de Rho GTPasas reemplazando GDP con GTP. Las

Rho GTPasas juegan un papel fundamental en numerosos procesos celulares que son iniciados por estímulos extracelulares que funcionan a través de los receptores acoplados a la proteína G. Pude formar un complejo con proteínas G y estimular las señales dependientes de Rho. Esta proteína es activada por la PI3-quinasa. A través de sus estructuras multi-dominio, el *Arhgef6* puede también funcionar como andamio (*scaffold*) de señalización uniéndose a numerosas parejas proteicas.

La presente invención divulga que la inhibición de *Arhgef6* implica un fenotipo neuroprotector de células microgliales. Por lo tanto, una regulación por disminución de la proteína, inhibición de la actividad, o inactivación génica (*down-regulation*) de *Arhgef6* será beneficioso para el tratamiento de enfermedades neurológicas, más preferiblemente enfermedades neurodegenerativas.

La **Tabla 1** muestra, como un ejemplo, el gen *Arhgef6* caracterizado por el número de acceso de Ensembl Gene (ENSG), al que se puede acceder en la base de datos pública Ensembl (http://www.ensembl.org) (Ensembl versión 89-Mayo 2017) y por su Entrez Gene ID, al que se puede acceder en la base de datos pública NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e incluye las secuencias de proteínas de todas las isoformas divulgadas en la misma, en humanos y ratón.

<i>Arhgef6 mus musculus</i>			
Ensembl ID (gen)	NCBI ID (gen)	NCBI ID (ARNm)	NCBI ID (proteína)
ENSMUSG00000031133	73341 (SEQ ID NO: 17)	NM_152801.2 (SEQ ID NO: 18)	NP_690014.2 (SEQ ID NO: 20)
		NM_001358573.1 (SEQ ID NO: 19)	NP_001345502.1 (SEQ ID NO: 21)

<i>Arhgef6 homo sapiens</i>			
Ensembl ID (gen)	NCBI ID (gen)	NCBI ID(ARNm)	NCBI ID (proteína)
ENSG00000129675	9459 (SEQ ID NO: 22)	NM_004840.3 (SEQ ID NO: 23)	NP_004831.1 (SEQ ID NO: 25)
		NM_001306177.1 (SEQ ID NO: 24)	NP_001293106.1 (SEQ ID NO: 26)

En una realización preferida, la invención hace referencia al uso del gen *Arhgef6* humano con el número de acceso del Ensembl Gene ENSG00000129675 y del NCBI Gene ID 9459, preferiblemente el gen *Arhgef6* humano comprende la secuencia SEQ ID NO: 22, e incluye las secuencias de proteínas de todas las isoformas codificadas por el mismo, como dianas farmacéuticas para el cribado, ensayo y/o validación de moléculas, compuestos, agentes, y moduladores útiles en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades neurológicas.

La presente invención también hace referencia a los homólogos, ortólogos, parálogos de *Arhgef6*, y fragmentos y variaciones del mismo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “homólogo” es conocido en el estado de la técnica y hace referencia a secuencias relacionadas que comparten un ancestro o miembro de una familia común y se determinan en base al grado de identidad de secuencia. Los términos “homología”, “homólogo”, “sustancialmente similar” y “que corresponde sustancialmente” se utilizan en el presente documento de forma intercambiable. Los homólogos habitualmente controlan, median o influyen las mismas o similares vías bioquímicas, sin embargo, unos homólogos en particular pueden dar lugar a fenotipos diferentes. Se entiende, por lo tanto, tal como podrán apreciar los expertos en la materia, que la invención abarca más que los ejemplos de secuencias específicas. Estos términos describen la relación entre un gen encontrado en una especie o subespecie y el gen correspondiente o equivalente en otra especie o subespecie. Para el propósito de esta invención se comparan secuencias homólogas.

El término “homólogo” se utiliza algunas veces para aplicarlo a la relación entre los genes separados por el evento de la especiación (ver “ortólogo”) o a la relación entre genes separados por el evento de duplicación genética (ver “parálogo”).

El término “ortólogo” hace referencia a genes en diferentes especies que evolucionaron de un gen ancestral común por especiación. Habitualmente, los ortólogos mantienen la misma función en el transcurso de la evolución. La identificación de ortólogos es de vital importancia para una predicción fiable de la función génica en genomas secuenciados recientemente.

35

El término “parálogo” hace referencia a genes relacionados por duplicación dentro de un genoma. Mientras que los ortólogos generalmente mantienen la misma función en el transcurso de la evolución, los parálogos pueden desarrollar nuevas funciones, incluso si éstas están relacionadas con la original.

5

Se piensa, se cree o se sabe que las “secuencias homólogas” o los “homólogos” o los “ortólogos” están funcionalmente relacionados. Una relación funcional puede estar indicada en cualquiera de una cantidad de maneras, incluyendo, pero sin limitarse a:

10

(a) grado de identidad de secuencia y/o (b) una función biológica igual o similar. Preferiblemente, están indicadas tanto (a) como (b). El grado de identidad de secuencia puede variar, pero en una realización, es al menos el 50% (cuando se utilizan programas de alineamiento de secuencias estándar conocidos), al menos al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos 98,5%, o al menos aproximadamente 99%, o al menos 99,5%, o al menos 99,8%, o al menos 99,9%. La homología puede determinarse utilizando programas de software disponibles, tal como aquellos que se discuten en los Protocolos actuales en Biología Molecular (“Current Protocols in Molecular Biology” F. M. Ausubel et al., eds., 1987) Suplemento 30, sección 7.718, Tabla 7.71. Algunos programas de alineamiento son MacVector (Oxford Molecular Ltd, Oxford, Reino Unido) y ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania). Otros programas de alineamiento no limitativos incluyen Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, Mich.), AlignX, y Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, Calif).

15

20

25

30

35

En el estado de la técnica, los términos “identidad” y “similitud” significan el grado de parentesco de las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos que se determinan emparejando una secuencia problema (*query sequence*) y otras secuencias preferiblemente del mismo tipo (secuencia de ácido nucleico o de proteínas) entre sí. Los métodos de programas informático preferidos para calcular y determinar la “identidad” y la “similitud” incluyen, pero no se limitan a, GCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389-3402; Devereux et al., Nucleic Acids Res. 1984, 12: 387), BLASTN 2.0 (Gish W., <http://blast.wustl.edu>, 1996-2002), FASTA (Pearson and

Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85: 2444-2448), y GCG GelMerge que determina y alinea un par de cónfigos con el solapamiento de mayor longitud (Wilbur and Lipman, SIAM J. Appl. Math. 1984, 44: 557-567; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453).

5

El gen *Arhgef6* de la invención, y/o la proteína codificada por el mismo, puede tener variantes. Además, el término "variante" incluye cualquier versión más corta o más larga de un transcrito del gen. El término "variantes" comprenderá también una secuencia que tenga al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 10 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia sobre la longitud completa de los números de acceso ENSG00000129675 del Ensembl Gene ID o 9459 del NCBI Gene ID, preferiblemente sobre la longitud completa del el gen *Arhgef6* humano que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 22, y sobre la longitud completa de las secuencias de las isoformas de la 15 proteína codificada por el mismo. Se incluirán las variaciones de secuencias en donde un codón es reemplazado con otro codón debido a secuencias base alternativas, pero la secuencia de aminoácidos traducida por la secuencia de ADN permanece sin cambiar. Este fenómeno conocido en el estado de la técnica se denomina redundancia del conjunto de codones que traducen aminoácidos específicos. Estas variantes hacen 20 referencia a variaciones limitadas en la secuencia de aminoácidos, que hacen posible mantener la funcionalidad del gen. Esto significa que la secuencia mencionada anteriormente y la secuencia de la variante son similares como en conjunto e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan mediante sustituciones, deleciones 25 o adiciones. Dichas sustituciones son, por ejemplo, pero sin limitarse a, con aminoácidos conservados. Los aminoácidos conservados son aminoácidos que tienen cadenas laterales y propiedades similares en relación a, por ejemplo, hidrofobicidad y aromaticidad. Estas sustituciones incluyen, pero no se limitan a, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre lisina (Lys) y arginina (Arg), entre 30 asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr) y/o entre los aminoácidos que comprenden el grupo de alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente, por ejemplo, mediante mutagénesis o síntesis directa. Por lo tanto, el alcance de la presente invención incluye las secuencias de nucleótidos cuyos nucleótidos sean 35 idénticos u homólogos a las secuencias descritas en la presente invención.

El término “diana farmacológica”, tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia al gen *Arhgef6* y/o a la proteína codificada por el mismo, que sea de utilidad para estudiar el efecto bioquímico de moléculas capaces de unirse al mismo. Estas moléculas pueden ser, sin limitación, compuestos, moduladores, o agentes que se seleccionan mediante métodos de cribado, en donde se analiza la inhibición de la expresión y/o la actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo.

El término “modulador” tal como se utiliza en la presente invención hace referencia a una molécula capaz de cambiar o modificar el nivel de expresión y/o la actividad de un gen, o un producto de transcripción de un gen, o un producto de traducción de un gen. Un “modulador” hace referencia a una molécula que tiene la capacidad de o bien potenciar o bien inhibir, por tanto “modular” una propiedad funcional de una proteína, para “modular” la unión, antagonización, represión, bloqueo, neutralización o secuestro, activación, agonización y regulación al alza. El término “modulación” también será utilizado para hacer referencia a la capacidad para afectar la actividad biológica de una célula. Preferiblemente, un “modulador” es capaz de cambiar o modificar la actividad biológica de un producto de transcripción o un producto de traducción de un gen. Dicha modulación, por ejemplo, puede ser un aumento o una disminución en la actividad biológica y/o la actividad farmacéutica, un cambio en las características de la unión, o cualquier otro cambio o alteración en las propiedades biológicas, funcionales o inmunológicas de dicho producto de traducción de un gen.

Los términos “agente”, “reactivo”, o “compuesto” hace referencia a cualquier sustancia, producto químico, composición, o extracto que tenga un efecto biológico positivo o negativo sobre una célula, tejido, fluido corporal, o dentro del contexto de cualquier sistema biológico, o cualquier sistema de ensayo examinado. Pueden ser agonistas, antagonistas, agonistas parciales o agonistas inversos de una diana. Dichos agentes, reactivos, moduladores o compuestos pueden ser ácidos nucleicos, péptidos o complejos proteicos naturales o sintéticos, o proteínas de fusión. Pueden también ser anticuerpos, moléculas o composiciones orgánicas o inorgánicas, pequeñas moléculas, tales como ARN de interferencia, fármacos o cualquier combinación de cualquiera de dichos agentes anteriores. Pueden utilizarse para propósitos de ensayos, de diagnóstico y terapéuticos.

En una realización más preferida, la molécula, el compuesto, agente o modulador es un inhibidor o antagonista del gen *Arhgef6* y/o de la proteína codificada por el mismo.

Tal como se utiliza en la invención, el término “compuesto/agente inhibidor o antagonista” hace referencia a una molécula que cuando se une o interactúa con el gen *Arhgef6* y/o con la proteína codificada por el mismo, o con fragmentos funcionales del mismo, disminuye o elimina la expresión y/o actividad de este gen y/o la proteína codificada por el mismo. Por tanto, el inhibidor o antagonista induce la supresión o la reducción de la transmisión de señales bioquímicas a través del *Arhgef6*. La actividad del *Arhgef6* puede ser sometida a ensayo fácilmente mediante cualquier método conocido en el arte. Esta definición incluye también aquellos compuestos que evitan o disminuyen la transcripción o expresión del gen, la maduración del ARNm, la traducción del ARNm y la modificación post-traducción. En una realización más preferida, el compuesto/agente inhibidor o antagonista puede ser un anticuerpo que reconozca la proteína codificada por el gen *Arhgef6*, o un polinucleótido que codifica una secuencia antisentido de nucleótidos específicos a la secuencia del *Arhgef6*, por ejemplo utilizando ARNi, antisentido, ribozima o aptámeros. La actividad inhibidora puede someterse a ensayo mediante la medición del nivel de expresión de *Arhgef6*, al nivel de la proteína o al nivel del ARN.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” pretende hacer referencia en términos generales a cualquier agente de unión inmunológico tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y anticuerpo humanizado o quimérico. En determinadas realizaciones, se prefieren el IgG y/o IgM debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y se fabrican más fácilmente. El término “anticuerpo” se utiliza para hacer referencia a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tenga una región de unión al antígeno, e incluya fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DABs), Fv, scFv (Fv de cadena única), y similares. Las técnicas para preparar y utilizar diversos constructos y fragmentos basados en anticuerpos se conocen bien en el estado de la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también son bien conocidos en el estado de la técnica (Ver, p. ej., Harlow and Lane, 1988).

Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo en el cual la región marco constante y variable de una o más inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de unión, por ejemplo, la CDR, de una inmunoglobulina animal. Los anticuerpos “humanizados” contemplados en la presente invención son anticuerpos quiméricos de ratón, rata, u otras especies, que llevan dominios de región constante y/o variable humana, anticuerpos bioespecíficos, anticuerpos recombinantes y modificados por ingeniería

genética y fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos humanizados están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano a partir del cual se derivan las regiones de unión, pero para evitar una reacción inmune contra el anticuerpo no humano.

5

Un anticuerpo “quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma se modifica, se reemplaza o se intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) se enlace a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o modificada, o una molécula totalmente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se modifica, se reemplaza o se intercambia con una región variable que tenga una especificidad del antígeno diferente o alterada.

15

Los inhibidores de la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* de la invención pueden también ser moléculas de ácido nucleico. El término “ácido nucleico” incluye, pero no se limita a, ARNi, antisentido, aptámero, CRISPR de interferencia (CRISPRi) y moléculas de ribozoma. En la presente invención, una “molécula de ácido nucleico que interfiere específicamente con la expresión de *Arhgef6*” es una molécula de ácido nucleico que es capaz de reducir o suprimir la expresión de la codificación génica de la proteína *Arhgef6*, en una forma específica.

25

El término “ARNi” o “ARN de interferencia” significa cualquier ARN que es capaz de regular por disminución la expresión de la proteína establecida como diana. Abarca moléculas de ARN pequeño de interferencia (ARNip), de ARN de doble cadena (ARNbc), de ARN de cadena única (ARNmc), de micro ARN (miARN), y de ARN de horquilla corto (ARNhc). La interferencia por ARN, designa un fenómeno por el cual el ARNbc específicamente suprime la expresión de un gen diana a nivel post-traducción.

30

En condiciones normales, la interferencia por ARN es iniciada por moléculas de ARN de doble cadena (ARNbc) de una longitud de diversos miles de pares de bases. *In vivo*, el ARNbc introducido en una célula se escinde en una mezcla de moléculas de ARNbc corto denominadas ARNip. Los ARNip se diseñan habitualmente contra una región 50-100 nucleótidos después del extremo 3' (*downstream*) del codón iniciador de la traducción, mientras que la 5'UTR (región no traducida) y la 3'UTR se evitan habitualmente. La secuencia diana del ARNip debería estar sometida a una búsqueda

35

con BLAST contra la base de datos EST para asegurar que se establece como diana el único gen deseado. Se encuentran disponibles diversos productos para ayudar en la preparación y uso del ARNip. En una realización preferida, la molécula de ARNi es un ARNip de al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 20-30 nucleótidos de base, preferiblemente de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud.

Existen una gran cantidad de diversos ejemplos de moléculas de ARNip que inhiben la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6*. La **Tabla 2** muestra, como ejemplo, moléculas de ARNip dirigidas al ARNm de *Arhgef6*. (ARNip ID* corresponde al número de identificación proporcionado por ThermoFisher Scientific).

NCBI ID	ARNip ID*	Secuencia del ARNip	SEQ ID NO:
NM_001306177.1	s18122	Sentido: GUAAAAGCCCUGAAAACGAU	1
		Antisetido: AUCGUUUUAGGGCUUUUAC	2
	s18123	Sentido: CAGCGCAAUUUUUCAACAA	3
		Antisetido: UUGUUGAAAUUUGCGCUG	4
	s18124	Sentido: GAGUUUAAGUUGUCUACGA	5
		Antisetido: UCGUAGACAACUUAACUC	6
NM_152801.2	s91691	Sentido: GUGAUGAUCUAGAACGAUU	7
		Antisetido: AAUCGUUCUAGAUCUACAC	8
	s91692	Sentido: GAUUCUUAAGGUGAUCGAA	9
		Antisetido: UUCGAUCACCUUAAGAAUC	10
	s91693	Sentido: GAGUUUAAGUUGCCUACGA	11
		Antisetido:	

NCBI ID	ARNip ID*	Secuencia del ARNip	SEQ ID NO:
		UCGUAGGCAACUAAACUC	12

En una realización en particular, la molécula de ARNip comprende las secuencias seleccionadas de la lista que consiste en: una secuencia sentido que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11, más preferiblemente la secuencia sentido se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5; y una secuencia antisentido que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12, más preferiblemente la secuencia antisentido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. El ARNi puede comprender ARN de origen natural, ARN sintético, o ARN producido de forma recombinante, además de ARN alterado que difiere del ARN de origen natural en la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como en el extremo de la molécula o en uno o más nucleótidos internos del ARNi, incluyendo modificaciones que hacen el ARNi resistente a la digestión de la nucleasa. El ARNi puede administrarse en forma libre (desnudo) o mediante el uso de sistemas de administración que aumentan la estabilidad y/o la focalización, por ejemplo, liposomas, o incorporado en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, microesferas bioadhesivas, o vectores proteínicos, o en combinación con péptidos. Pueden también ser administrados en forma de sus ADN precursores o de codificación. En una realización en particular, el ARNi son encapsulados en el interior de vesículas, preferiblemente dentro de liposomas.

25

El ácido nucleico antisentido puede también utilizarse para regular por disminución la expresión y/o la actividad del gen *Arhgef6*. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a todo o a parte de un ácido nucleico sentido que codifica una proteína *Arhgef6* por ejemplo, complementario a la cadena de codificación de una molécula de ADNc de doble cadena o complementario a una secuencia de ARNm, y se cree que interfiere con la traducción del ARNm diana. En una realización preferida, el ácido nucleico antisentido es una molécula de ARN complementario a un ARNm diana que codifica los polipéptidos de *Arhgef6*.

30

Un ácido nucleico antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. En particular, las moléculas de ARN antisentido son habitualmente de 18-50 nucleótidos de longitud.

5 Un ácido nucleico antisentido para su uso en el método de la invención puede ser construido utilizando síntesis química y reacciones de ligamiento enzimático, utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica. En particular, puede sintetizarse químicamente ARN antisentido, producido por transcripción in vitro a partir de moldes lineales (por ejemplo, productos de PCR) o circulares (por ejemplo, vectores virales o
10 no virales), o producido por transcripción in vivo a partir de vectores virales o no virales.

El ácido nucleico antisentido puede ser modificado para tener una estabilidad, resistencia a la nucleasa, especificidad a la diana aumentadas y propiedades
15 farmacológicas mejoradas. Por ejemplo, el ácido nucleico antisentido puede incluir nucleótidos modificados diseñados para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y sentido, por ejemplo, derivados de fósforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina.

20 Las moléculas de ribozima pueden también utilizarse para disminuir los niveles de *Arhgef6* funcional. Las ribozimas son moléculas de ARN catalítico con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico de cadena única, tal como el ARNm, para el que tienen una región complementaria. Por tanto, los ribosomas pueden utilizarse para escindir de forma catalítica transcritos de ARNm para de este
25 modo inhibir la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Las moléculas de ribozimas específicas para el *Arhgef6* funcional pueden ser diseñadas, producidas, y administradas mediante métodos comúnmente conocidos en el estado de la técnica (ver por ejemplo, Fanning y Symonds, 2006, en donde se revisa el uso terapéutico de ribozimas de cabeza de martillo y ARN de horquilla corto).

30 Una "desregulación" significará una regulación por incremento o regulación por disminución de la expresión génica y/o un aumento o disminución en la estabilidad de los productos génicos. Un producto génico comprende ya sea un ARN o una proteína y es el resultado de la expresión de un gen. La cantidad de un producto génico puede
35 ser utilizada para medir cómo de activo es un gen y cómo de estable son sus productos génicos. En una realización preferida, el término desregulación hace

referencia a la regulación por disminución de la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y además también hace referencia a la regulación por disminución de la expresión y/o actividad de la proteína codificada por el gen *Arhgef6*. El término “gen” tal como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones comprende tanto regiones de codificación (exones) como regiones de no codificación (por ejemplo, elementos reguladores de no codificación tales como promotores o potenciadores, intrones, secuencias líder y remolque).

En una realización preferida, también es posible utilizar tecnologías ZFNs, TALENs y CRISPRs como métodos para la edición genómica, preferiblemente para la inhibición del gen *Arhgef6*. De este modo, un agente capaz de alterar de forma inducida la expresión o actividad de *Arhgef6* puede comprender: una nucleasa capaz de modificar el gen *Arhgef6* endógeno, tal como para regular por disminución o abolir la expresión de *Arhgef6*, o una proteína represora heteróloga capaz de reprimir la transcripción del gen *Arhgef6* endógeno, tal como la proteína represora heteróloga. El agente puede comprender más de una nucleasa. En determinadas realizaciones, el agente comprende más de una proteína TALE o dedo de zinc, por lo que una TALE o dedo de zinc establece como diana a *Arhgef6*. En otras realizaciones, el agente comprende más de dos nucleasas, capaces de establecer como diana múltiples genes. En determinadas realizaciones, se utiliza un sistema CRISPR-Cas y se utilizan múltiples ARN guía para dirigir la enzima CRISPR a múltiples dianas génicas.

Las enfermedades o trastornos neurológicos de acuerdo con la presente invención hace referencia preferiblemente a enfermedades neurodegenerativas, más preferiblemente a la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia cerebro-vascular, atrofia multisistémica, demencia con gránulos argirófilos y otras tauopatías, y deterioro cognitivo leve. En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la lista que consiste en: preferiblemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para el cribado o la identificación de moléculas, compuestos, agentes y moduladores útiles en la inhibición

de la expresión y/o la actividad de *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo, en donde el método comprende:

- 5
- a) poner en contacto un compuesto, agente y/o modulador con el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo,
 - b) analizar la interacción entre la molécula, compuesto, agente y modulador y el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo, y
 - c) seleccionar la molécula, compuesto, agente y/o modulador del paso (a) capaz de inhibir la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada
- 10 por el mismo.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para el cribado y la identificación de moléculas, compuestos, agentes y moduladores útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas, en donde el método

15 comprende:

- a) poner en contacto un compuesto, agente y/o modulador con el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo,
 - b) analizar la interacción entre la molécula, compuesto, agente y modulador y el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo, y
 - c) seleccionar la molécula, compuesto, agente y/o modulador del paso (a) que
- 20 tenga la capacidad de inhibir la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo.

En general, los métodos de cribado mencionados anteriormente, además de las

25 moléculas de fármacos potenciales (p. ej., agentes, moduladores, antagonistas, agonistas) identificadas a partir de los mismos tienen aplicabilidad en relación al tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas, preferiblemente en las enfermedades neurológicas mencionadas en el presente documento.

30 El término "actividad" tal como se utiliza en el presente documento deberá entenderse como una medida de la capacidad de una sustancia, tal como un producto de transcripción o un producto de traducción, de producir un efecto biológico o una medida para determinar el nivel de moléculas biológicamente activas. El término "actividad" también hace referencia a la actividad biológica y/o actividad farmacológica

35 que hacen referencia a la unión, antagonización, represión, bloqueo, neutralización o al secuestro de un transportador o sub-unidad transportadora y que hace referencia a

la activación, y regulación por incremento de un transportador o subunidad transportadora.

5 Los términos “nivel” y/o “actividad” tal como se utilizan en el presente documento hacen referencia a los niveles de expresión génica o actividad génica. La expresión génica puede definirse como la utilización de la información contenida en un gen mediante transcripción y traducción que conduce a la producción de un producto génico.

10 En otra realización, la presente invención proporciona moléculas, compuestos, agentes, y moduladores, de acuerdo con la presente invención, obtenibles mediante el método de cribado descrito en el presente documento.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas, compuestos, agentes, y moduladores, de acuerdo con la presente invención, en donde la molécula, compuesto, agente o modulador, tiene una actividad potencial en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas.

20 En una realización preferida, la molécula, compuesto, agente, o modulador de acuerdo con la presente invención, es preferiblemente un antagonista o inhibidor de la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o de la proteína codificada por el mismo.

25 En una realización más preferida, la molécula, compuesto, agente o modulador de acuerdo con la presente invención, preferiblemente un antagonista o inhibidor de los niveles de expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo, se selecciona de al menos uno de la lista que consiste en:

- a) un anticuerpo,
- b) un aptámero,
- c) una ribozima
- 30 d) una secuencia antisentido
- e) un ARN de interferencia (ARNi), y
- f) un CRISPR de interferencia (CRISPRi).

35 La molécula, compuesto, agente o modulador mencionado anteriormente en a)-f) evitan, inhiben o disminuyen la expresión y/o actividad de *Arhgef6* (gen y/o proteína), y, por lo tanto, eliminan su función biológica. Estas moléculas, compuestos, agentes o

moduladores mencionados anteriormente pueden ser desarrollados por un experto en campo de la ingeniería genética en base al conocimiento existente en el estado de la técnica en relación con la transgénesis y la inhibición de la expresión génica.

5 En una realización preferida, la molécula, compuesto, agente o modulador de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un ARNi que se selecciona de la lista que consiste en: moléculas de ARNip, ARNbc, ARNmc, miARN, y ARNhc.

10 En una realización más preferida, el ARNi es un ARNip. En otra realización aún más preferida, la molécula de ARNip comprende las secuencias seleccionadas de la lista que consiste en: una secuencia sentido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11, más preferiblemente la secuencia sentido que se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5; y una secuencia antisentido que se selecciona de la lista que consiste
15 en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12, más preferiblemente la secuencia antisentido se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

20 Otro aspecto en particular de la invención hace referencia al uso *in vitro* de una molécula, compuesto, agente o modulador de la invención, preferiblemente un compuesto antagonista o inhibidor, caracterizado por que es un ácido nucleico o polinucleótido que evita o disminuye la expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo.

25 Otro aspecto de la invención hace referencia a una composición farmacéutica o fármaco que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula, compuesto, agente o modulador de acuerdo con la presente invención, y al menos uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables, útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas.

30

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los expertos en la materia y utilizados comúnmente en la producción de composiciones terapéuticas. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" es una sustancia
35 utilizada en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en la misma hasta un determinado volumen o peso. El vehículo farmacéuticamente

aceptable es una sustancia inerte o de acción idéntica a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o proporcionar a la composición consistencia y forma. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender uno o más adyuvantes y/o excipientes. El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de proporcionarles consistencia o proveerla de sabores que la hagan más agradable. Por tanto, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes enlazados entre sí, tal como por ejemplo en el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de dar color, la función de proteger la composición, tal como por ejemplo, aislarla del aire y/o la humedad, la función de rellenar un comprimido, cápsula o cualquier otra forma de presentación, una función disgregante para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otros tipos de excipientes no mencionados en este párrafo.

En el sentido utilizado en la descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” hace referencia a la cantidad de la molécula, compuesto, agente o modulador de acuerdo con la presente invención, calculada para producir el efecto requerido y, en general, será determinada, entre otros factores, por las propiedades inherentes de los compuestos, incluyendo edad, condición del paciente, gravedad de la alteración o trastorno, y la vía y frecuencia de administración.

En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma sólida o en suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica provista por la presente invención puede ser administrada a través de cualquier vía de administración apropiada, por lo que dicha composición será formulada en la forma farmacéutica adecuada para la vía de administración seleccionada. En una realización en particular, la administración de la composición terapéutica provista por la invención se realiza por vía parenteral, oral, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, etc. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas de administración de fármacos y los excipientes requeridos para obtenerlos puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulii Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Las composiciones terapéuticas de la invención pueden ser administradas en combinación con otros fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades neurológicas, con vistas a actuar de manera complementaria o como refuerzo.

5 Otro aspecto de la invención hace referencia a la molécula, compuesto, agente, modulador o composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento.

10 El término "medicamento", tal como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a cualquier sustancia o combinación de sustancias con propiedades para el tratamiento o la prevención de enfermedades en organismos, preferiblemente seres humanos, o que pueden ser utilizados en o administrados a dichos organismos, preferiblemente seres humanos, con el propósito de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

15 El medicamento de la invención puede ser utilizado tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para mejorar el rendimiento cognitivo y/o promover el desarrollo cognitivo mediante terapia de combinación, y puede ser administrado simultáneamente o en diferentes intervalos de tiempo.

20 Otro aspecto de la invención hace referencia a la molécula, compuesto, agente, modulador, o composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas, preferiblemente una enfermedad neurodegenerativa, y más preferiblemente las enfermedades neurodegenerativas mencionadas en la presente invención.

25 El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano) incluyendo:

- 30
- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir detener el desarrollo de la misma;
 - (ii) aliviar la enfermedad o condición patológica, es decir causar la regresión de la enfermedad o condición patológica o su sintomatología;
 - (iii) estabilizar la enfermedad o condición patológica.

35

El término “prevención”, tal como se utiliza en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar la enfermedad o condición patológica en un sujeto (preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene una predisposición a la condición patológica pero no se ha diagnosticado aún.

En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un método de tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas, que comprende administrar en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva una molécula, compuesto, agente, modulador o composición farmacéutica de la invención, a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “sujeto” indica un mamífero, al como un roedor, felino, canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un humano. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un sujeto afectado por o susceptible de sufrir de una enfermedad neurológica, preferiblemente una enfermedad neurodegenerativa, y más preferiblemente una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la lista que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia cerebrovascular, atrofia multisistémica, demencia con gránulos argirófilos y deterioro cognitivo leve, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por experto en la materia a la que esta invención pertenece. Pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y reivindicaciones, el término “comprender” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para aquellas personas expertas en la materia al examinar la descripción, o pueden ser aprendidas mediante práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. La transfección de Rac1 ARNip reguló a la baja (*downregulation*)
 5 **eficientemente la proteína Rac1 y el ARNm en células microgliales. (A)** Fueron transfectadas células microgliales primarias (140.000 células/pocillo, placas de 12-pocillos) con 50 pmol Rac1 de Rac1 ARNip de *Silencer Select* (“*Select*” Rac1) o ARNip de secuencia aleatoria o “*scrambled*” (“*Select*” *scrambled*) (utilizado como control) y 1,5 µl de Lipofectamina 3000. Se determinó la expresión de la proteína Rac 1
 10 mediante análisis Western Blot 96h después. (B) y (C). Fueron transfectadas células microgliales primarias como en el paso (A) durante los periodos de tiempo indicados y se evaluó la regulación por disminución de Rac1 mediante RT-qPCR **(B)** y mediante análisis Western Blot **(C)**. Los datos son la media ±EEM (error estándar de la media) de tres experimentos independientes, *p<0,05 vs. ARNip de secuencia aleatoria.

15 **FIG. 2. Rac1 ARNip inhibió eficientemente la ramificación inducida por MC. (A)** Fueron transfectadas células microgliales primarias de ratón con Rac1 ARNip o ARNip de secuencia aleatoria (utilizado como control) durante 4 días, a continuación se incubaron en medio normal o en MC durante 4h y se sometieron a tinción con el marcador de superficie de células microgliales isolectina B4 (fluorescencia). Se evaluó
 20 la morfología de las células microgliales en un microscopio de fluorescencia. Barras de escala, 20 µm. **(B)** Se muestra una imagen de gran aumento de las células en (A) y se muestran como ejemplo las típicas imágenes de umbral en blanco y negro de las células generadas por el programa de análisis de imágenes Fiji/ImageJ. Se dibujaron los contornos de cada célula para medir el perímetro y el área, que son los parámetros
 25 necesarios para calcular los valores de circularidad (corresponden a números cercanos a cada contorno). Ha de señalarse que las células que tocan los bordes de la imagen fueron excluidas automáticamente de la medición. Barras de escala, 20 µm. **(C)** Fueron transfectadas células microgliales con tres oligonucleótidos de ARNip dirigidos a Rac1 (s72646, s72647 or s72648, provistos por ThermoFisher Scientific) o un pool de los mismos (3x ARNip Rac1: s72646, s72647 y s72648, ThermoFisher Scientific) y a continuación se incubaron con MC. Las células microgliales con tinción
 30 de Isolectina B4 fueron visualizadas mediante microscopio y se cuantificó la forma de la célula utilizando el valor de circularidad. Se utilizaron células no transfectadas (no tr) o células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria como controles de referencia. Los datos son la media±EEM de tres experimentos independientes.
 35 *p<0,05, **p<0,01 vs. ARNip de secuencia aleatoria.

FIG. 3. Validación de la disminución de la expresión génica (*Knock-down*) mediante Western Blot de los candidatos positivos. Fueron transfectadas células microgliales primarias de ratón con tres ARNip individuales contra los genes diana indicados (Ver **Tabla 5**). Después de tres (**B y E**) o cuatro días (**A, C, D, F, G, H**) se recogieron las células y se sometieron a análisis Western Blot con los anticuerpos indicados. Se muestran los análisis Western Blot representativos de cada proteína. Se normalizó la expresión de las proteínas indicadas a la expresión de GAPDH. Los datos son la media±EEM de al menos tres experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. ARNip de secuencia aleatoria.

FIG 4. La regulación a la baja (*downregulation*) de *Creb1*, *RhoE* y *p38β* redujeron la expresión de BDNF en células microgliales. Células microgliales primarias fueron transfectadas con dos oligonucleótidos de ARNip individuales contra los genes diana indicados (Ver **Tabla 6**). Se utilizaron células no transfectadas (no tr) o células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria como controles. Después de cuatro días, se determinó la expresión génica de BDNF mediante RT-qPCR y se normalizó a la expresión de GAPDH. Los datos se expresan como la expresión de BDNF en relación a la observada en células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria. Los datos son la media±SEM de al menos tres experimentos independientes.*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. ARNip de secuencia aleatoria.

FIG 5. La regulación a la baja (*downregulation*) de *RhoE*, *Tiam1* y *IκBα* aumentó la migración de células microgliales. Fueron transfectadas células microgliales con dos oligonucleótidos individuales de ARNip contra los genes diana indicados (Ver **Tabla 6**) durante 3 días y a continuación se trataron con MC. Se utilizó ARNip de secuencia aleatoria como control. Se determinó la migración celular en un ensayo de herida (*scratch*) de 24h. (**A**) Se muestran imágenes representativas del ancho de la herida a 1h y a las 24h. (**B**) El ancho de la herida a las 24h fue determinado como el porcentaje del ancho de la herida original a 1h, y a continuación se expresó en relación al ancho de la herida de las células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria (normalizado a 1,0) en cada experimento. Los datos son la media±EEM de al menos tres experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. ARNip de secuencia aleatoria.

FIG. 6. Imágenes de células microgliales transfectadas con *Plekhg5*, *Rhoq*, *Arhgef6* (Ver **Tabla 4**) o ARNip de secuencia aleatoria (utilizado como control) durante 4 días, incubadas a continuación en MC durante 4h y sometidas a tinción con el marcador de superficie de células microgliales isolectina B4. Se evaluó la morfología de las células microgliales en un microscopio de fluorescencia. Barras de escala, 40 μm.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

5

Animales y declaración ética.

Ratones C57Bl/6 hembra (de 7-8 semanas de edad) fueron adquiridos en Charles River. Fueron utilizados para obtener recién nacidos de P0 a P2 para aislar células microgliales primarias y para obtener tejido adiposo para aislar ASC. Se alojaron ratones en un entorno de temperatura/humedad controlada (22±1°C, 60-70% de humedad relativa) en jaulas individuales (10 ratones por jaula, con material de virutas de madera para camas y nidos), con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (luces activadas a las 7:00 a.m.) y alimentados con comida para roedores (Global Diet 2018, Harlan) y agua corriente *ad libitum*. Los protocolos experimentales de este estudio se ajustan a la Directiva 2010/63 de la EU y siguieron las directrices éticas para investigaciones con experimentos con animales aprobadas por el Comité de Ética de experimentación animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Los estudios con animales se describen en cumplimiento con las directrices ARRIVE (Kilkenny C., *et al.* Br J Pharmacol. 2010;160(7):1577-9).

20

Aislamiento y cultivos de células.

Se prepararon células microgliales de ratones C57Bl/6 recién nacidos de P0 a P2, tal como se ha descrito previamente (Neubrand V. E., *et al.* 2014. *Glia*, 62(12): 1932-1942). Brevemente, se descartó el bulbo olfatorio, cerebelo, rombencéfalo y meninges de los cerebros disecados y a continuación se homogeneizaron en medio de cultivo de células microgliales que consistía en DMEM (Invitrogen), complementado con suero bovino fetal (FBS, Gibco) al 10%, suero de caballo al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco), utilizando una pipeta de Pasteur y una jeringuilla de 23 G. Los homogenados cerebrales fueron centrifugados y las células resultantes se colocaron en placas en matraces recubiertos de poli-D-lisina y se incubaron en un medio de cultivo durante 10-12 días a 37°C y 5 % CO₂. Se recogieron células microgliales en un agitador durante 2 h a 200 rpm y se colocaron en placas sobre cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina a una densidad de 12.000 células/cm² o placas de cultivo celular de 6 pocillos en medio de cultivo de células microgliales a una densidad de

35

37.000 células/cm². Después de 24 h, el medio de cultivo de células microgliales fue reemplazado por medio de cultivo de células microgliales fresco.

5 Se aislaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs) del tejido adiposo de ratones C57Bl/6 adultos tal como se ha descrito anteriormente (Anderson, P., *et al.* 2013. Gut, 62(8): 1131-1141). Estas células mostraron una morfología similar a fibroblastos y una capacidad de diferenciación para los linajes adipocíticos y osteocíticos, y expresaron el fenotipo MHC-II-CD14- CD18-CD31-
10 CD34-CD45-CD80-CD117-CD144- CD13+CD44+CD29+CD54+CD73+CD90+CD105+CD106+CD166+. Se recogió el medio condicionado (MC) de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo del pasaje 2 hasta el pasaje 6 de cultivos de ASC, que se colocaron en placas a una densidad de células de 15.000 células/cm², se cultivaron durante 2 días antes de recoger su sobrenadante y a continuación se almacenaron a -20°C. Antes de su
15 uso, el MC se descongeló rápidamente y se pasó a través de un filtro de 0,2 µm.

Transfección de ARNip.

20 Se solicitó una genoteca de ARNip realizada a medida contra 160 genes diana (con 3 ARNip individuales contra cada gen o un pool de estos tres ARNip) a ThermoFisher Scientific (Ver **Tabla 3** y **4**). Los ARNip específicos utilizados en los ejemplos de la presente invención se divulgan por su número de identificación provisto por el fabricante (ThermoFisher Scientific). Se colocaron células microgliales primarias durante 48h según se ha descrito anteriormente. A continuación el medio de cultivo se
25 reemplazó y las células cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 48 pocillos fueron transfectadas con 12,5 pmol de ARNip y 0,375 µl de Lipofectamina 3000 (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los reactivos para los cultivos en placas de 24, 12 o 6 pocillos fueron proporcionalmente aumentados a escala. Cuatro días después de la transfección de ARNip, las células
30 fueron tratadas con MC durante 4h y fijadas para determinar su forma de célula. De forma alternativa, después de cuatro días las células se cosecharon para su análisis por Western Blot o RT-qPCR. Las células no transfectadas o las células que fueron transfectadas con un ARNip de secuencia aleatoria se utilizaron como referencia en todos los estudios.

35

Determinación de la forma y circularidad de las células.

Células microgliales colocadas en placas sobre cubreobjetos se fijaron durante 4 min en metanol helado, y se sometieron a tinción con Isolectina B4, marcada con AlexaFluor 568 (Invitrogen) durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS.

Se adquirieron imágenes con objetivos de 10x en un microscopio de fluorescencia Olympus IX 81. La circularidad o el factor de forma es un indicador de la forma de una célula. Se proporciona en valores entre 0 y 1. El valor 1 sería un círculo; los valores más cercanos a 0 indican una forma de célula más ramificada. La circularidad diferencial como un indicador numérico de la forma de la célula se utiliza para clasificar los genes diana en la presente invención (ver Tablas 1, 2 y 3) (Neubrand V. E., *et al.* 2014. *Glia*, 62(12): 1932-1942; Wilms, H., *et al.* 1997. *Cell Tissue Res*, 287(3): 447-458.). Para determinar la circularidad o el factor de forma, se tomaron fotos de tres campos de visión por ARNip y se analizaron mediante Fiji/ImageJ macro para determinar la circularidad de cada célula individual. Brevemente, cada imagen fue procesada por el filtro de mediana en un radio de 8 píxeles, a continuación se generó una imagen umbral en blanco y negro, se dibujaron los contornos celulares y se determinó la circularidad dentro de las descripciones de la forma como $4\pi \cdot \text{área} / (\text{perímetro})^2$. Las células que tocaban los límites de la imagen fueron excluidas del procedimiento de cuantificación. En total, el cribado de ARNip se realizó tres veces para que el efecto de cada gen diana sobre la circularidad fuera calculado a partir de tres experimentos independientes. Posteriormente, los valores de circularidad fueron normalizados dentro de cada experimento y comparados con células microgliales transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria. La diferencia del “*fold change*” (cambio relativo) entre el valor de circularidad para cada gen y el ARNip de secuencia aleatoria se denominó circularidad diferencial, ya que indica la diferencia entre el ARNip de secuencia aleatoria y el ARNip del gen, y se proporciona como un logaritmo (log2).

30

Ensayo de herida.

La migración de células microgliales se determinó utilizando un ensayo de herida. Se colocaron en placas células a razón de 18.000 células/cm² y fueron transfectadas según se ha descrito anteriormente. El medio de cultivo se reemplazó 3 días después de la transfección por MC y el cubreobjetos fue rayado con una punta de pipeta

35

amarilla. Se tomaron imágenes de fondo claro 1h y 24h después de la “herida” (*scratch*). El ancho de la herida fue analizado con una herramienta de cierre de herida del Fiji/ImageJ macro (MRI_Wound_Healing_Tool.ijm). El ancho de herida a las 24h se expresó como un porcentaje del ancho de herida original a 1h. Para la normalización, el ancho de herida de las células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria se estableció en 1,0 en cada experimento y el ancho de herida de las células transfectadas con ARNip se estableció en valores proporcionales a 1,0.

Análisis Western blot.

10

Fueron transfectadas células microgliales según se ha descrito anteriormente y a continuación se cosecharon con un tampón de lisis frío que consistía en 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ y un cóctel de inhibidores de proteasa disponibles en el comercio (Sigma, con contenido de 104 mM AEBSF, 80 μM Aprotinina, 4 mM Bestatina, 1,4 mM E-64, 2 mM Leupeptina, 1,5 mM Pepstatina A). Después de centrifugación durante 15 min a 14.000 rpm, se determinó la concentración de proteínas de los sobrenadantes mediante ensayo de Bradford (Bio-Rad) y se prepararon muestras para SDS-PAGE con un tampón de muestra Laemmli SDS. Después de ensayo de *blotting* semi-seco o *western blotting* en una cámara húmeda para Tiam1, se bloquearon membranas PVDF con 5% de leche en TBS Tween (0,1%) y se incubaron O/N (durante la noche) a 4°C con los anticuerpos primarios, antiAhrgef4 de conejo, (Antibodies-Online), anti-IκBα de conejo (Cell Signaling), anti-Rac1 de ratón (BD Transduction laboratories), anti-GAPDH de conejo (Sigma), anti-Tiam1 de ratón y anti-Map3k2 de ratón (ambos de Santa Cruz) diluidos en 2% BSA/TBS-Tween (0,1%), o se incubaron 1h a RT (temperatura ambiente) con los anticuerpos primarios anti-Creb1 de ratón, anti-RhoE de conejo, anti-GM-CSFR de conejo, anti-Mapk11 de conejo (todos de Antibodies-Online) diluidos en la solución de bloqueo. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (DakoCytomation) y ECL (GE Biotech) para la detección. Cuando resultó necesario, los anticuerpos de las membranas fueron eliminados con un tampón de eliminación (100 mM β-mercaptoetanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris pH 6,8) durante 30 min a 55°C.

30

Extracción de ARN y RT-qPCR.

Se extrajo el ARN total utilizando Tripure (Roche) de células microgliales colocadas en placas de 6 pocillos. Después del tratamiento con ADNasa I (Sigma), el ARN (1 µg/muestra) se sometió a transcripción inversa utilizando un kit de síntesis de la primera cadena de ADNc Revert Aid (Fermentas) y cebadores de hexámeros aleatorios. Se analizó el ADNc por qPCR en triplicados en un ciclador Cfx96 (Bio-Rad) con el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX (Bioline) y 2,5 pmol de los siguientes cebadores: directo de Rac1 de ratón (SEQ ID NO: 13; CCCAATACTCCTATCATCCTCG); inverso de Rac1 de ratón (SEQ ID NO: 14; CAGCAGGCATTTTCTCTTCC); directo de BDNF de ratón (SEQ ID NO: 15; CCCTCCCCCTTTTAACTGAA); inverso de BDNF ratón (SEQ ID NO: 16; GCCTTCATGCAACCGAAGTA) con una eficiencia de cebador de 100,7% y cebadores directo e inverso de GAPDH) del kit de síntesis de la primera cadena de ADNc RevertAid (Fermentas), con una eficiencia de cebador de 86,3%.

Después de 42 ciclos, se determinaron los valores Ct. Para normalizar las muestras, se calculó ΔCt entre el gen de interés y los valores Ct de GAPDH como gen de referencia. Se determinó la diferencia de x-fold en la expresión entre los diferentes tratamientos por sustracción de los valores ΔCt y se denominó $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, se calculó el cambio total como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se dedujo la cantidad relativa en comparación con células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria.

Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan como la media \pm EEM. El análisis estadístico se realizó con un ensayo ANOVA de dos vías seguido de una prueba t de Student. Asumimos la significancia a un valor $p < 0,05$. Para el análisis estadístico del cribado de ARNip, se aplicó el paquete de software cellHTS2 versión 2.38.0 (Boutros *et al.*, Genome Biol. 2006;7(7):R66) de R versión 3.3.2 para calcular y normalizar todos los valores de circularidad dentro de cada experimento, como es el caso en la normalización por experimentos.

Finalmente, estos valores normalizados se compararon para cada gen con el ARNip de secuencia aleatoria utilizado como una muestra de control negativo utilizando el software limma en su versión 3.30.11 (Smyth, G. K. 2004. Stat Appl Genet Mol Biol, 3, Article3). Los resultados logrados se presentan como un “*fold change*” en la circularidad, dado como un valor logarítmico (\log_2). Se determinó el valor umbral entre

los genes significativos y no significativos mediante un valor P ajustado: el *Fold Discovery Rate* (FDR). Aplicamos el FDR estandarizado, según se describe en (Benjamini, Y. H., Y. 1995. J Royal Statistical Society, Series B 57(1): 289-300).

5 **Resultados**

Rac1 ARNip inhibió de manera eficiente la ramificación inducida por MC

10 En primer lugar, se establecieron las condiciones experimentales para evaluar la eficiencia del *knock-down* de ARNip en células microgliales primarias de ratón. Ya que un mutante negativo dominante de pequeña RhoGTPasa Rac1 inhibió la conversión inducida por MC a células neuroprotectoras alargadas (Neubrand, V. E., *et al.* 2014. *Glia*, 62(12): 1932-1942) y se esperaba el mismo fenotipo para el *knock-down* de su ARNip. Por lo tanto, los inventores utilizaron Rac1 como la proteína de prueba.

15

La expresión de la proteína Rac1 y el ARNm fue regulada por disminución de forma eficiente (66,1±9,0% proteína y 59,7±5,1% ARNm a las 72h) después de la transfección con Rac1 ARNip de Silencer Select en comparación con ARNip de secuencia aleatoria (**FIG. 1**).

20

Por tanto, se confirmó que la elongación celular inducida por MC fue inhibida en las células microgliales transfectadas con Rac1 ARNip (**FIG 2A**). La imagen de gran aumento de las células que se muestran en la Fig. 2A y las imágenes umbral típicas en blanco y negro generadas por el programa de análisis de imágenes Fiji/ImageJ se muestran como un ejemplo en la **FIG. 2B**. Los contornos de cada célula se dibujaron para medir el perímetro y el área de la célula, que son los parámetros necesarios para calcular los valores de circularidad (corresponden a números cercanos a cada contorno). Ha de señalarse que las células que tocan los bordes de la imagen se excluyeron automáticamente de la medición (**FIG. 2B**). Más aún, la cuantificación muestra que las células microgliales tratadas con MC que fueron transfectadas previamente con tres ARNip individuales dirigidos a Rac1 o un pool de los mismos tienen un valor más elevado para la circularidad, correspondiente a una forma de célula más redondeada, en comparación con células microgliales tratads con MC de control que no fueron transfectadas o transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria (**FIG 2C**). Por tanto, estos resultados muestran que Rac1 ARNip podría utilizarse como un control positivo específico en este cribado de ARNip.

35

El cribado de ARNip en células microgliales tratadas con MC identifica diversas dianas potenciales para regular la activación de las células microgliales

5 El efecto sobre la elongación de las células microgliales inducidas por MC de una genoteca realizada a medida de ARNip de *Silencer-Select* contra 160 proteínas de
 10 ratón que incluyen 103 proteínas de citoesqueleto y se evaluaron 57 reguladores de las vías de activación/inflamatorias de células microgliales. Se seleccionaron 23 pequeñas RhoGTPasas (Bustelo, X. R., *et al.* 2007. *Bioessays*, 29(4): 356-370) y 80
 15 de sus activadores, factores de intercambio de nucleótidos de guanina Rho RhoGEFs (Rossmann, K. L., *et al.* 2005. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2):167-180), porque están implicadas en la regulación de la arquitectura del citoesqueleto y los cambios en la morfología celular están intrínsecamente relacionados con el citoesqueleto. Además, también se seleccionaron los reguladores principales de las vías inflamatorias,
 20 incluyendo diversos miembros de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K) y las vías de señalización del factor nuclear kappa B subunidad 1 (NFkB), porque es probable que estas proteínas interfieren con el fenotipo antiinflamatorio inducido por MC de las células microgliales y por tanto tienen una mayor probabilidad de influenciar el estado inflamatorio de células microgliales.

La **Tabla 3** y la **Tabla 4** muestran la lista de todos los genes que fueron establecidos como diana por un cribado inicial utilizando una genoteca de ARNip y también muestran el efecto de la inhibición de genes en su circularidad diferencial. Todos los
 25 ARNip fueron provistos por ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EE.UU.). Brevemente, fueron transfectadas células microgliales primarias con un pool de oligonucleótidos de ARNip contra cada gen (ver la **Tabla 3, 4**) y se sometieron a ensayo para determinar su efecto sobre la ramificación de células microgliales inducidas por MC. El resultado fue expresado como circularidad diferencial.

30 Se seleccionaron ARNip que causaron valores de circularidad diferencial positivos y se clasificaron por su *fold discovery rate* (FDR), que representa un valor p ajustado. Los genes estadísticamente significativos se sombrearon en color gris. Los genes que fueron acotados por el Proyecto de Ontología génica de RU de la enfermedad de
 35 Parkinson (Foulger, R.E., *et al.* 2016. *Neuroinformatics*, 14(3):297-304 y <http://www.geneontology.org/external-project/parkinson%E2%80%99s-uk-gene->

ontology-project) están marcados en la columna de genes de EP. Los genes que se detallaron en la herramienta de mapa de EP de la Universidad de Luxemburgo (<http://minerva.uni.lu/MapView/>) están marcados en la columna del mapa de EP (Fujita, K.A., *et al.* 2014. *Molecular Neurobiology*, 49(1):88-102). Los genes que se solapan con los datos diferenciales de expresión de transcriptoma a partir de tejido post mortem de la sustancia negra (Glaab, E., *et al.* 2015. *Neurobiology of Disease*, 74:1-13) publicado en la herramienta de mapa de la EP de la Universidad de Luxemburgo (<http://minerva.uni.lu/MapView/>) están marcados en la última columna. Los candidatos positivos que fueron seleccionadas para su validación se representan en negrita.

Tabla 3. Lista de dianas de ARNip que dan como resultado circularidad diferencial positiva. Todos los ARNip fueron provistos por ThermoFisher Scientific y se identifican por su ID.

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
Arhgef4	226970	3,02	$<10^{-47}$	$<10^{-45}$			X	s105535 s105536 s105537
Rnd3	74194	2,77	$<10^{-40}$	$<10^{-38}$				s92448 s206583 s206584
Tiam1	21844	2,52	$<10^{-34}$	$<10^{-32}$	x			s75131 s75132 s75133
Mapk11	19094	2,08	$<10^{-24}$	$<10^{-22}$				s72151 s72152 s72153
Csf2ra	12982	1,91	$<10^{-20}$	$<10^{-19}$				s64504 s64505 s64506
Map3k2	26405	1,73	$<10^{-17}$	$<10^{-15}$				s77080 s77081 s77082
Map2k3	26397	1,59	$<10^{-14}$	$<10^{-13}$		X		s77059 s77060

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s77061
Rasgrf2	19418	1,57	$<10^{-14}$	$<10^{-13}$				s72749 s72750 s72751
Cdc42	12540	1,55	$<10^{-13}$	$<10^{-12}$			X	s63740 s63741 s63742
Rhoh	74734	1,43	$<10^{-12}$	$<10^{-11}$				s93065 s93066 s93067
Arhgef26	622434	1,35	$<10^{-10}$	$<10^{-9}$				s232053 s232054 s232055
Creb1	12912	1,34	$<10^{-10}$	$<10^{-9}$		X		s64374 s232195 s232196
Arhgef3	71704	1,30	$<10^{-10}$	$<10^{-9}$				s89895 s89896 s89897
Arhgef9	236915	1,24	$<10^{-9}$	$<10^{-8}$			X	s108423 s108424 s108425
Rac1	19353	1,17	$<10^{-8}$	$<10^{-7}$		X	X	s72646 s72647 s72648
Rhoj	80837	1,14	$<10^{-8}$	$<10^{-7}$				s96051 s96052 s96053
Prex2	109294	1,11	$<10^{-7}$	$<10^{-6}$				s99503 s99504 s99505
Mapk9	26420	1,04	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$		X	X	s77122 s77123 s77124
Map2k7	26400	0,95	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$		X	X	s77068 s77069

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s77070
Ptk2	14083	0,92	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁴				s65838 s65839 s65840
Akt1	11651	0,91	<10 ⁻⁵	<10 ⁻⁴		X		s62215 s62216 s62217
Mapk12	29857	0,87	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	x	X		s78077 s78078 s78079
Nfkbia	18035	0,85	<10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴		X	X	s70548 s70549 s70550
Rnd2	11858	0,83	<10 ⁻⁴	<0,001			X	s62607 s201057 s201058
Arhgef25	52666	0,81	<10 ⁻⁴	<0,001				s78946 s78947 s78948
Chuk	12675	0,78	<10 ⁻⁴	<0,001		X		s63970 s201161 s201162
Dock6	319899	0,76	<0,001	<0,001			X	s115420 s115421 s115422
Vav1	22324	0,75	<0,001	<0,001				s75902 s75903 s75904
Mapk3	26417	0,73	<0,001	<0,001				s77116 s77117 s77118
Arhgef18	102098	0,69	<0,001	<0,01			X	s97887 s97888 s97889
Farp2	227377	0,68	<0,001	<0,01				s105635 s105636

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s202450
Arhgef2	16800	0,64	<0,01	<0,01			X	s69101 s69102 s69103
Plekhg4	102075	0,61	<0,01	<0,01				s97878 s97879 s97880
Map3k1	26401	0,59	<0,01	<0,01				s77071 s77072 s77073
Pdk1	228026	0,59	<0,01	<0,01		X		s105844 s105845 s105846
Pparg	19016	0,58	<0,01	<0,01		X		s72013 s501493 s501494
Ect2l	10004579 2	0,55	<0,01	<0,01				s501495 s501496 s501497
Rac2	19354	0,53	<0,05	<0,05				s72649 s72650 s72651
Bcr	110279	0,52	<0,05	<0,05			X	s99755 s99756 s99757
Abr	109934	0,52	<0,05	<0,05				s99657 s99658 s99659
Arhgef7	54126	0,50	<0,05	<0,05			X	s79420 s79422 s501499
Rhoc	11853	0,49	<0,05	<0,05			X	s62590 s62591 s62592
Ikbke	56489	0,48	<0,05	<0,05				s80670 s80671

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s80672
Plekhg2	101497	0,46	<0,05	<0,05				s97767 s97768 s97769
Map2k5	23938	0,44	<0,05	<0,05				s76655 s76656 s76657
Ect2	13605	0,41	<0,05	0,06			X	s65281 s65282 s65283
Plekhg1	213783	0,39	0,05	0,07				s102949 s102950 s102951
Mapk8ip2	60597	0,37	0,06	0,09				s82032 s82033 s204224
Plekhg3	263406	0,36	0,06	0,10				s113902 s113903 s113904
Obscn	380698	0,34	0,08	0,12				s117309 s117311 s501498
Arhgef10	234094	0,32	0,11	0,15				s107744 s107745 s107746
Rac3	170758	0,30	0,12	0,17				s100753 s100754 s100755
Ngef	53972	0,29	0,14	0,19				s79384 s79385 s79386
Mapk13	26415	0,28	0,15	0,21				s77110 s77111 s77112
Csf3r	12986	0,27	0,17	0,22				s64516 s64517

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s64518
Map4k1	26411	0,23	0,23	0,30				s77098 s77099 s77100
Arhgef15	442801	0,23	0,25	0,31				s120183 s120184 s120185
Dnmbp	71972	0,22	0,27	0,34				s90386 s90387 s90388
Rhog	56212	0,20	0,31	0,38				s80175 s80176 s204100
Fgd5	232237	0,20	0,32	0,39				s107135 s107136 s107137
Als2	74018	0,19	0,33	0,40				s232765 s232766 s232767
Itsn2	20403	0,17	0,38	0,45				s73658 s73659 s73660
Rhobtb2	246710	0,16	0,41	0,48				s110833 s110834 s110835
Map2k2	26396	0,15	0,43	0,50				s77056 s77057 s77058
Pak1	18479	0,15	0,44	0,51				s71232 s71233 s71234
Irf1	16362	0,13	0,51	0,57				s68377 s68378 s68379
Rhob	11852	0,12	0,55	0,61				s62587 s62588

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s201056
Mapk6	50772	0,11	0,58	0,64				s78451 s78452 s78453
Nfkb1	18033	0,09	0,67	0,73				s70542 s70543 s70544
Arhgef1	16801	0,08	0,69	0,75				s69104 s69105 s69106
Mcf2	109904	0,06	0,76	0,80				s99645 s99646 s99647
Rhoa	11848	0,06	0,78	0,81				s62584 s62585 s62586
Rhobtb3	73296	0,04	0,84	0,86				s91649 s91650 s91651
Spata13	219140	0,03	0,90	0,91				s104452 s104453 s104454
Pdk2	18604	0,02	0,93	0,94				s71440 s71441 s71442
Pik3cg	30955	0,00	0,98	0,98				s78299 s78300 s78301

Tabla 4. Lista de dianas de ARNip que dan como resultado circularidad diferencial negativa. Todos los ARNip fueron provistos por ThermoFisher Scientific e identificados por su ID.

5

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
-----	---------	--------------------------	---------	-----	--------	---------	-------	----------

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
Nfkbib	18036	-1,99	$<10^{-22}$	$<10^{-20}$				s70551 s70552 s70553
Mapk10	26414	-1,74	$<10^{-17}$	$<10^{-15}$	X	X	X	s77107 s77108 s77109
Plekhg5	269608	-1,65	$<10^{-15}$	$<10^{-14}$				s114363 s114364 s114365
Tiam2	24001	-1,46	$<10^{-12}$	$<10^{-11}$				s76782 s76783 s233645
Dock1	330662	-1,39	$<10^{-11}$	$<10^{-10}$			X	s116734 s116735 s116736
Mapk1	26413	-1,32	$<10^{-10}$	$<10^{-9}$		X	X	s77104 s77105 s77106
Pik3ca	18706	-1,27	$<10^{-9}$	$<10^{-8}$				s71602 s71603 s71604
Nfkb2	18034	-1,23	$<10^{-9}$	$<10^{-8}$				s70545 s70546 s70547
Vav2	22325	-1,20	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$				s75905 s75906 s75907
Net1	56349	-1,17	$<10^{-8}$	$<10^{-7}$				s80373 s80374 s80375
Akt2	11652	-1,14	$<10^{-7}$	$<10^{-7}$		X		s62218 s62219 s62220
Rhof	23912	-1,10	$<10^{-7}$	$<10^{-6}$				s76610 s76611 s76612
Arhgef16	230972	-1,06	$<10^{-7}$	$<10^{-6}$			X	s106707

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s106708 s106709
Crebbp	12914	-1,02	$<10^{-6}$	$<10^{-5}$		X	X	s64378 s64379 s64380
Mapkapk3	102626	-1,01	$<10^{-6}$	$<10^{-5}$				s77083 s77084 s77085
Rnd1	223881	-0,99	$<10^{-6}$	$<10^{-5}$			X	s104662 s104663 s104664
Dock7	67299	-0,95	$<10^{-5}$	$<10^{-5}$				s84825 s84826 s84827
Mapkapk2	17164	-0,92	$<10^{-5}$	$<10^{-4}$			X	s69585 s201670 s201671
Arhgef11	213498	-0,90	$<10^{-5}$	$<10^{-4}$				s233075 s233076 s233077
Gsk3b	56637	-0,87	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	X	X		s80826 s80827 s80828
Pik3r2	18709	-0,86	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$	X		X	s71611 s71612 s71613
Fgd1	14163	-0,84	$<10^{-4}$	$<10^{-4}$				s65966 s201340 s201341
Map2k4	26398	-0,80	$<10^{-4}$	$<0,005$		X		s77062 s77063 s77064
Csf1r	12978	-0,78	$<10^{-4}$	$<0,005$				s64498 s64499 s64500
Rhov	228543	-0,77	$<10^{-4}$	$<0,005$				s105919

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s105920 s105921
Rhoq	104215	-0,77	<0,001	<0,005			X	s98245 s98246 s98247
Dock3	208869	-0,77	<0,001	<0,005			X	s101957 s101958 s101959
Dock5	68813	-0,75	<0,001	<0,005				68813 68813 68813
Csf1	12977	-0,74	<0,001	<0,005			X	s231875 s231876 s231877
Trio	223435	-0,74	<0,001	<0,005				s104518 s104519 s104520
Prkd1	18760	-0,71	<0,001	<0,005				s71710 s501491 s501492
Mapk14	26416	-0,69	<0,001	<0,005				s77113 s77114 s77115
Rel	19696	-0,68	<0,001	<0,005				s201924 s201925 s201926
Mapk8	26419	-0,68	<0,001	<0,005				s77119 s77120 s77121
Stat1	20846	-0,67	<0,001	<0,005				s74444 s74445 s74446
Dock2	94176	-0,66	<0,001	<0,005				s96989 s96990 s96991
Rhod	11854	-0,65	<0,001	<0,005				s62593

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s62594 s62595
Pik3r1	18708	-0,64	<0,01	<0,005	X			s71608 s71609 s71610
Rhot2	214952	-0,64	<0,01	<0,005				s103224 s103225 s202196
Dock9	105445	-0,63	<0,01	<0,005				s98465 s98466 s98467
Arhgef6	73341	-0,62	<0,01	<0,005				s91691 s91692 s91693
Prkd2	101540	-0,61	<0,01	<0,005				s97779 s97780 s97781
Nfkbie	18037	-0,60	<0,01	<0,05				s70554 s70555 s70556
Arhgef19	213649	-0,58	<0,01	<0,05				s102928 s102929 s102930
Prex1	277360	-0,57	<0,01	<0,05				s114830 s114831 s114832
Arhgef5	54324	-0,56	<0,01	<0,05				s79541 s79542 s79543
lkbkg	16151	-0,54	<0,01	<0,05				s68176 s68177 s68178
Farp1	223254	-0,51	<0,01	<0,05				s104494 s104495 s104496
Arhgef12	69632	-0,50	<0,05	<0,05				s88024

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s88025 s88026
Dock8	76088	-0,48	<0,05	<0,05				s94074 s94075 s94076
Arhgef10l	72754	-0,46	<0,05	<0,05				s91280 s91281 s91282
Mapk7	23939	-0,44	<0,05	<0,05				s76658 s76659 s211542
Prkca	18750	-0,43	<0,05	<0,05				s71602 s71603 s71604
Rela	19697	-0,41	<0,05	0,06				s72857 s72858 s72859
Sos2	20663	-0,40	<0,05	0,07				s74146 s74147 s74148
Prkcb	18751	-0,38	0,05	0,08				s71690 s71691 s71692
Arhgef17	207212	-0,38	0,05	0,08				s101623 s101624 s101625
Map3k3	26406	-0,37	0,06	0,09				s77083 s77084 s77085
lkbkb	16150	-0,36	0,07	0,10				s68173 s68174 s68175
Rhot1	59040	-0,35	0,07	0,11				s81842 s81843 s81844
Mtor	56717	-0,34	0,09	0,13				s80901

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s80902 s80903
Itsn1	16443	-0,32	0,10	0,14				s68525 s233409 s233410
Kalrn	545156	-0,32	0,11	0,15				n423971 n423972 n423973
Pten	19211	-0,30	0,12	0,17				s72350 s72351 s72352
Sos1	20662	-0,29	0,14	0,19				s74143 s74144 s74145
Jun	16476	-0,27	0,16	0,22				s68563 s68564 s201552
Akt3	23797	-0,27	0,17	0,23				s76462 s76463 s76464
Vav3	57257	-0,26	0,19	0,25				s81139 s81140 s81141
Dock4	238130	-0,25	0,21	0,27				s108729 s108730 s108731
Fgd3	30938	-0,24	0,23	0,30				s78251 s78252 s78253
Rhobtb1	69288	-0,23	0,24	0,30				s87660 s87661 s87662
Map2k6	26399	-0,20	0,32	0,39				s77065 s77066 s77067
Fgd2	26382	-0,17	0,38	0,45				s77029

ES 2 766 950 A1

Gen	NCBI ID	Circularidad diferencial	Valor P	FDR	Gen EP	Mapa EP	SN EP	ARNip ID
								s77030 s77031
Fgd4	224014	-0,16	0,41	0,48				s104698 s104699 s104700
Akap13	75547	-0,16	0,41	0,48				s93621 s93622 s93623
Csf2rb	12983	-0,15	0,46	0,52				s64507 s64508 s64509
Dock10	210293	-0,12	0,53	0,60				s231864 s231865 s231866
Map3k4	26407	-0,10	0,63	0,69				s77086 s77087 s77088
Map2k1	26395	-0,08	0,69	0,74				s77053 s77054 s77055
Rasgrf1	19417	-0,07	0,71	0,75				s72747 s72748 s201900
Rhou	69581	-0,07	0,73	0,78				s87973 s87974 s87975
Mcf2l	17207	-0,05	0,79	0,83				s69674 s69675 s69676
Arhgef28	110596	-0,05	0,82	0,84				s99834 s99835 s99836
Plekhg6	213522	-0,02	0,91	0,93				s102896 s102897 s102898

Una circularidad diferencial positiva (**Tabla 3**) implica que las células fueron más redondeadas que las células transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria y unos valores de circularidad diferencial negativa (**Tabla 4**) implican que las células microgliales transfectadas con este gen mostraron un patrón de ramificación aumentado.

Debido a que los inventores estaban interesados en genes que inhibieran el fenotipo ramificado neuroprotector de las células microgliales, los candidatos positivos estadísticamente significativos (genes marcados en negrita en la **Tabla 3**) se compararon con las bases de datos públicas disponibles de las vías y la expresión de genes asociadas a la enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, también se les compara con los datos de expresión diferenciales de transcriptoma de tejido post mortem de la sustancia negra entre pacientes sanos y con enfermedad de Parkinson.

Los genes de solapamiento entre el cribado de ARNip seleccionado en la presente invención y aquellas bases de datos además de los siete candidatos con las circularidades diferenciales más elevadas se sometieron a una búsqueda en la literatura para recopilar información acerca de su papel fisiológico potencial en las células microgliales. En este sentido, los siguientes genes con circularidad positiva (correspondiente a genes de solapamiento entre el cribado de ARNip y las bases de datos mencionadas anteriormente, además de los siete candidatos con las circularidades diferenciales más elevadas), se sometieron a una búsqueda en la literatura: *Arhgef4*, *Rnd3*, *Tiam1*, *Mapk11*, *Csf2ra*, *Map3k2*, *Map2k3*, *Cdc42*, *Creb1*, *Arhgef9*, *Rac1*, *Mapk9*, *Map2k7*, *Akt1*, *Mapk12*, *Nfkbia*, *Rnd2*, *Chuk*, *Dock6*, *Arhgef18*, *Arhgef2*, *Pdk1*, *Pparg*, *Bcr*, *Arhgef7*, *Rhoc* y *Ect2*. Además, los siguientes genes con circularidad negativa (correspondientes a genes de solapamiento entre el cribado de ARNip y las bases de datos mencionadas anteriormente), se sometieron a una búsqueda en la literatura: *Mapk1*, *Akt2*, *Mapk10*, *Arhgef6*, *Dock1*, *Arhgef16*, *Crebbp*, *Rnd1*, *Mapkapk2*, *Gsk3b*, *Pik3r2*, *Map2k4*, *Rhoq*, *Dock3*, *Csf1*, *Pik3r1* y *Arhgef6*. A partir de ahí, los candidatos *Asef* (*Arhgef4*), *Tiam1*, *GM-CSFR* (*Csf2ra*), *I κ B α* (*Nfkbia*), *RhoE* (*Rnd3*), *p38 β* (*Mapk11*), *Creb1*, *MEK3* (*Map2k3*), *Map3k2* y *JNK2* (*Mapk9*) se seleccionaron y a continuación se validaron en el siguiente paso.

Debido a que los cribados de ARNip en células de mamíferos podrían verse influenciados por efectos inespecíficos, los inventores confirmaron los candidatos positivos seleccionados mencionados anteriormente mediante transfección individual

de los tres ARNip sencillos del pool original. Para excluir estos efectos inespecíficos, al menos dos oligonucleótidos de ARNip dirigidos contra el mismo gen deberían exhibir el mismo efecto fenotípico sobre las células microgliales tratados con MC (sometidos a ensayo por cambios en los valores de circularidad) y eficiencia para disminuir la expresión de genes de su diana génica (sometido a ensayo por Western Blot).

Tal como se muestra en la **Tabla 5**, no todos los candidatos positivos del anterior cribado de ARNip fueron verificados en este ensayo de validación. Ninguno de los tres ARNip (s77059, s77060 y s77061) contra MEK3, ni los dos ARNip (s77122 y s77123) contra JNK2 fueron capaces de cambiar individualmente los valores de circularidad en células microgliales tratadas con MC (**Tabla 5**), y por tanto los genes MEK3 y JNK2 fueron marcados como falsos positivos. Además, los niveles de proteínas de todos los genes sometidos a ensayo, excepto Arhgef4, fueron significativamente regulados por disminución por al menos dos ARNip sencillos (**FIG. 3**). Ya que ninguno de los ARNip individuales dirigidos a Arhgef4 fue capaces de regular por disminución la proteína *Arhgef4*, este candidato tuvo que ser considerado como un falso positivo.

Tabla 5. La validación de las dianas de ARNip que dan como resultado una circularidad diferencial positiva. *Fueron transfectadas células microgliales con tres oligonucleótidos de ARNip sencillos (#1, #2 y #3) por gen y se sometieron a ensayo para determinar su efecto sobre la ramificación de células microgliales inducida por MC. El cambio en la morfología celular se expresó como circularidad diferencial. Los resultados fueron clasificados por su FDR y los genes estadísticamente significativos se marcan en negrita.*

Diana génica (ARNip ID)	Circularidad diferencial	Valor P	FDR
Tiam1 #1 (s75131)	2,73	<10⁻¹⁶	<10⁻¹⁴
Creb1 #2 (s232195)	2,55	<10⁻¹⁴	<10⁻¹¹
p38β #3 (s72153)	2,22	<10⁻¹¹	<10⁻¹⁰
Tiam1 #2 (s75132)	2,06	<10⁻¹⁰	<10⁻⁹

Diana génica (ARNip ID)	Circularidad diferencial	Valor P	FDR
RhoE #1 (s92448)	1,93	<10⁻⁹	<10⁻⁸
Arhgef4 #2 (s105536)	1,84	<10⁻⁸	<10⁻⁷
p38β #2 (s72152)	1,79	<10⁻⁸	<10⁻⁷
Creb1 #1 (s64374)	1,71	<10⁻⁷	<10⁻⁶
Map3k2 #1 (s77080)	1,64	<10⁻⁶	<10⁻⁶
Map3k2 #3 (s77082)	1,52	<10⁻⁶	<10⁻⁵
IκBα #2 (s70549)	1,46	<10⁻⁵	<10⁻⁵
GM-CSFR #1 (s64504)	1,44	<10⁻⁵	<10⁻⁵
IκBα #1 (s70548)	1,40	<10⁻⁵	<10⁻⁴
Map3k2 #2 (s77081)	1,36	<10⁻⁵	<10⁻⁴
Tiam1 #3 (s75133)	1,26	<10⁻⁴	<10⁻⁴
p38β #3 (s72153)	1,19	<10⁻⁴	<0,01
RhoE #2 (s206583)	1,15	<0,001	<0,01
JNK2 #3 (s77124)	1,08	<0,001	<0,01
Creb1 #3 (s232196)	1,01	<0,001	<0,01
Arhgef4 #1 (s105535)	0,90	<0,01	<0,01
GM-CSFR #2	0,83	<0,01	<0,01

Diana génica (ARNip ID)	Circularidad diferencial	Valor P	FDR
(s64505)			
RhoE #3 (s206584)	0,73	<0,05	<0,05
MEK3 #2 (s77060)	0,58	0,05	0,07
Arhgef4 #3 (s105537)	-0,55	0,06	0,08
GM-CSFR #3 (s64506)	0,42	0,16	0,21
MEK3 #3 (s77061)	-0,32	0,28	0,35
I κ B α #3 (s70550)	0,28	0,34	0,40
MEK3 #1 (s77059)	0,16	0,58	0,64
JNK2 #1 (s77122)	-0,11	0,70	0,75
JNK2 #2 (s77123)	-0,08	0,80	0,82

Además, la **Fig. 6** muestra que las células microgliales tratadas con MC que fueron transfectadas previamente con *Arhgef6* ARNip tienen una ramificación más elevada en comparación con las células microgliales tratadas con MC de control que fueron transfectadas con ARNip de secuencia aleatoria.

Los candidatos seleccionados regulan diferencialmente la producción de BDNF y la migración en las células microgliales

Para precisar las consecuencias funcionales de la degradación de la ramificación, los inventores ejecutaron cribados secundarios con los siete candidatos validados (Tiam1, GM-CSFR, I κ B α , RhoE, p38 β , Creb1 y Map3k2) investigando sus efectos en dos procesos que están relacionados con la activación de células microgliales o con

5 mecanismos a través de los cuales las células microgliales ejercen sus funciones neuroprotectoras, concretamente la capacidad de migración celular y la producción de factores neurotróficos. Debido a que el MC indujo la producción de BDNF en células microgliales primarias (Neubrand, V. E., *et al.* 2014. *Glia*, 62(12): 1932-1942.), los inventores transfectaron células microgliales primarias con dos ARNip individuales de los siete candidatos positivos mencionados anteriormente (Ver la Tabla 6 a continuación) que regularon eficientemente por disminución su proteína diana (**FIG. 3**), y midieron la expresión de BDNF ARNm cuatro días después.

10 **Tabla 6.** Regulación a la baja (*down-regulation*) de los genes diana mediante dos ARNip individuales para cada uno de los genes mostrados.

Gen	NCBI ID	ARNip ID
Creb1	12912	s64374 s232195
GM-CSF2RA	12982	s64504 s64505
RhoE	74194	s92448 s206584
p38β	19094	s72151 s72153
Map3k2	26405	s77080 s77082
Tiam1	21844	s75131 s75132
IκBα	18035	s70548 s70549

15 Los ARNip contra Creb1, RhoE y p38β fueron capaces de regular por disminución la expresión de BDNF ARNm basal por células microgliales (**FIG 4**), lo que sugiere que podrían alcanzar su función neuroprotectora a través de la producción de BDNF. Sin embargo, los ARNip contra Tiam1, GM-CSFR, IκBα y Map3k2 no pudieron regular la expresión de BDNF (datos no mostrados).

Es conocido que la forma ameboide de la célula en las células microgliales se asocia con la migración celular. Por tanto, los inventores utilizaron un ensayo de herida para probar el efecto de los siete candidatos positivos en la migración de células microgliales (Creb1, GM-CSF2RA, RhoE, p38 β , Map3k2, Tiam1 y I κ B α .). Brevemente, los inventores transfectaron células microgliales primarias con dos ARNip individuales de los candidatos positivos mencionados anteriormente (Ver la **Tabla 6**), y tres días más tarde, se añadió MC y se realizó la “herida” del cubreobjetos. Los resultados mostraron que las células microgliales transfectadas con ARNip contra ARNip de RhoE, Tiam1 o I κ B α cerraban su herida antes del ARNip de secuencia aleatoria (**FIG. 5**), lo que indica que estos tres genes son reguladores negativos de la migración de células microgliales. En contraste, los ARNip contra GM-CSFR, p38 β , Creb1 y Map3k2 no afectaron a su capacidad migratoria (datos no mostrados). La regulación a la baja de RhoE, Tiam1 o I κ B α por transfección de ARNip no afectó a la reducción de MTT en cultivos de células microgliales (datos no mostrados), lo que sugiere que sus efectos sobre el ensayo de herida no son debidos a una acción sobre la viabilidad/proliferación. La **Tabla 7** resume los resultados de ambos cribados secundarios. Brevemente, fueron transfectadas células microgliales con oligonucleótidos de ARNip validados contra su proteína diana indicada y sometidas a ensayo para determinar su efecto sobre la expresión de BDNF y la migración de células microgliales según se describe en la **FIG. 4** y la **FIG. 5**.

Tabla 7. Resumen de los cribados secundarios.

Candidato positivo validado	Producción de BDNF	Migración de células microgliales
RhoE/Rnd3	reducida	aumentada
Tiam1	no afectada	aumentada
p38 β /Mapk11	reducida	no afectada
GM-CSFR/Csf2ra	no afectada	no afectada
Map3k2	no afectada	no afectada
Creb1	reducida	no afectada
I κ B α /Nfkb α	no afectada	aumentada

REIVINDICACIONES

- 5
1. Uso del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo como una diana farmacológica para el cribado, ensayo y/o validación de moléculas, compuestos, agentes, y moduladores útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas.
- 10
2. Uso según la reivindicación 1 en donde el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo pertenece a mamíferos.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en donde el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo pertenece a humanos.
- 15
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el gen *Arhgef6* comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 22.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa.
- 20
6. Uso según la reivindicación 5 en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia cerebrovascular, atrofia multisistémica, demencia con gránulos argirófilos y deterioro cognitivo leve, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.
- 25
7. Método *in vitro* de cribado, ensayo o validación de moléculas, compuestos, agentes, y moduladores útiles para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas que comprende:
- 30
- a) Poner en contacto una molécula, compuesto, agente, y/o modulador con el gen *Arhgef6* y/o con la proteína codificada por el mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- 35
- b) Analizar la interacción entre el compuesto, agente, y/o modulador y el gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo, y

c) Seleccionar el compuesto, agente, y/o modulador del paso (a) con la capacidad de unirse al gen *Arhgef6* y/o a la proteína codificada por el mismo para disminuir o inhibir su expresión y/o actividad.

- 5 8. Método *in vitro* según la reivindicación 7 en donde la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa.
9. Método *in vitro* según la reivindicación 8 en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la lista que consiste en: enfermedad de
10 Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia cerebrovascular, atrofia multisistémica, demencia con gránulos argirófilos y deterioro cognitivo leve, preferiblemente enfermedad de Alzheimer,
15 enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.
10. Moléculas, compuestos, agentes, y moduladores obtenibles mediante el método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 20 11. Moléculas, compuestos, agentes, y moduladores de los niveles de expresión y/o actividad del gen *Arhgef6* y/o la proteína codificada por el mismo, en donde la molécula, compuesto, agente, y modulador, tienen una actividad potencial en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas.
- 25 12. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 caracterizado por que es un antagonista o inhibidor.
13. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en donde el antagonista o inhibidor se selecciona de al
30 menos uno de la lista que consiste en:
- a) un anticuerpo,
 - b) un aptámero,
 - c) una ribozima,
 - d) una secuencia antisentido,

35 e) un ARNi, y

 - f) un CRISPRi

14. Molécula, compuesto, agente, y modulador según la reivindicación 13 en donde el antagonista o inhibidor es un ARNi.
- 5 15. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 en donde el ARNi se selecciona de la lista que consiste en: moléculas de ARNip, ARNbc, ARNmc, miARN, ARNhC, o cualquier combinación de las mismas.
- 10 16. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 en donde el ARNi se selecciona de la lista que consiste en: una secuencia sentido de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11; y una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, 15 SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 12.
17. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula, compuesto, agente o modulador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, y al menos uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 20 18. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, y composición farmacéutica según la reivindicación 17, para su uso como medicamento.
- 25 19. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, y composición farmacéutica, según la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas.
- 30 20. Molécula, compuesto, agente, y modulador según las reivindicaciones 10 a 16, y composición farmacéutica, según la reivindicación 17, en donde las enfermedades neurológicas es una enfermedad neurodegenerativa.
- 35 21. Molécula, compuesto, agente, y modulador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, y composición farmacéutica, según la reivindicación 17, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la lista que

5 consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, demencia cerebrovascular, atrofia multisistémica, demencia con gránulos argirófilos y deterioro cognitivo leve, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

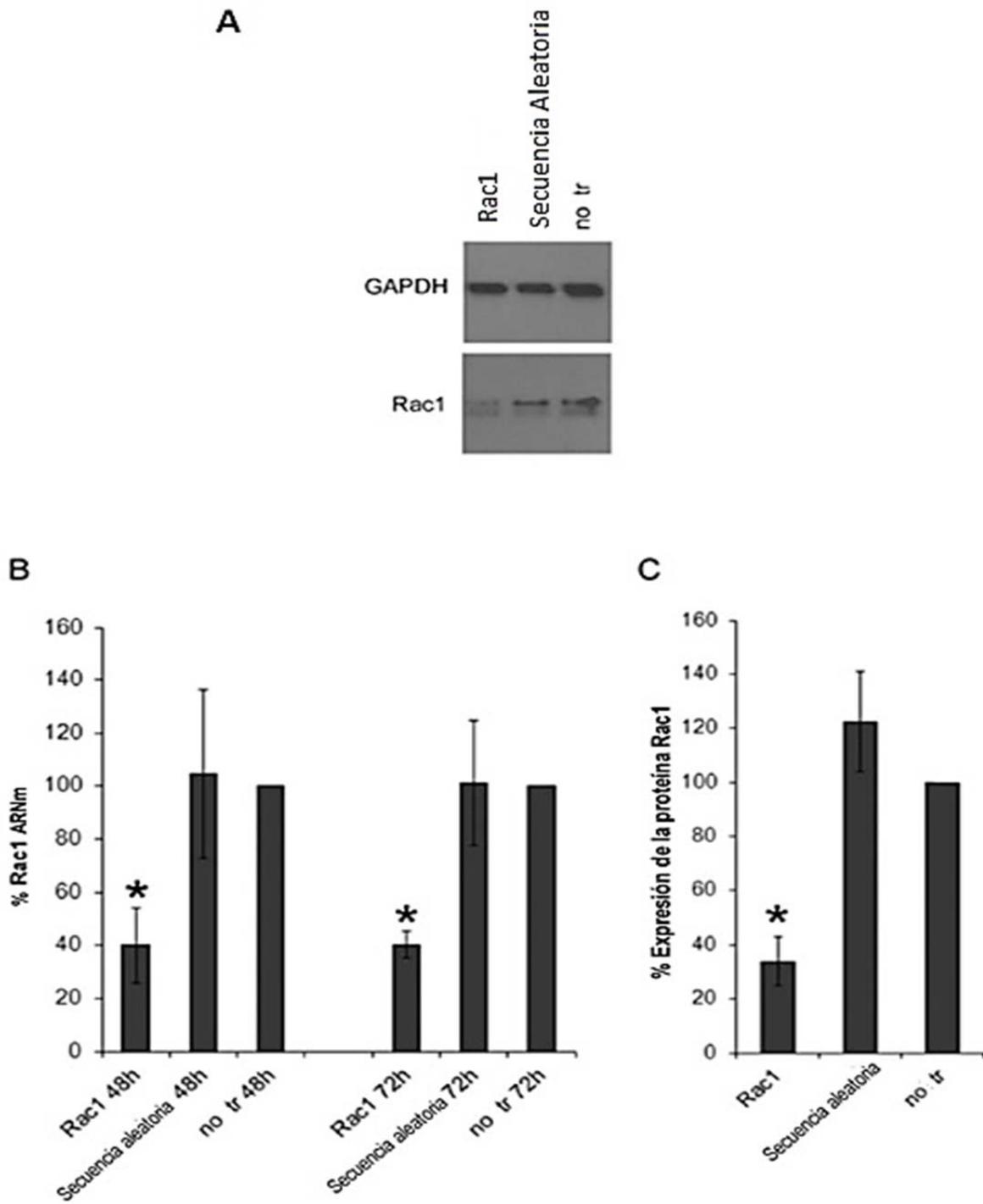


FIG. 1

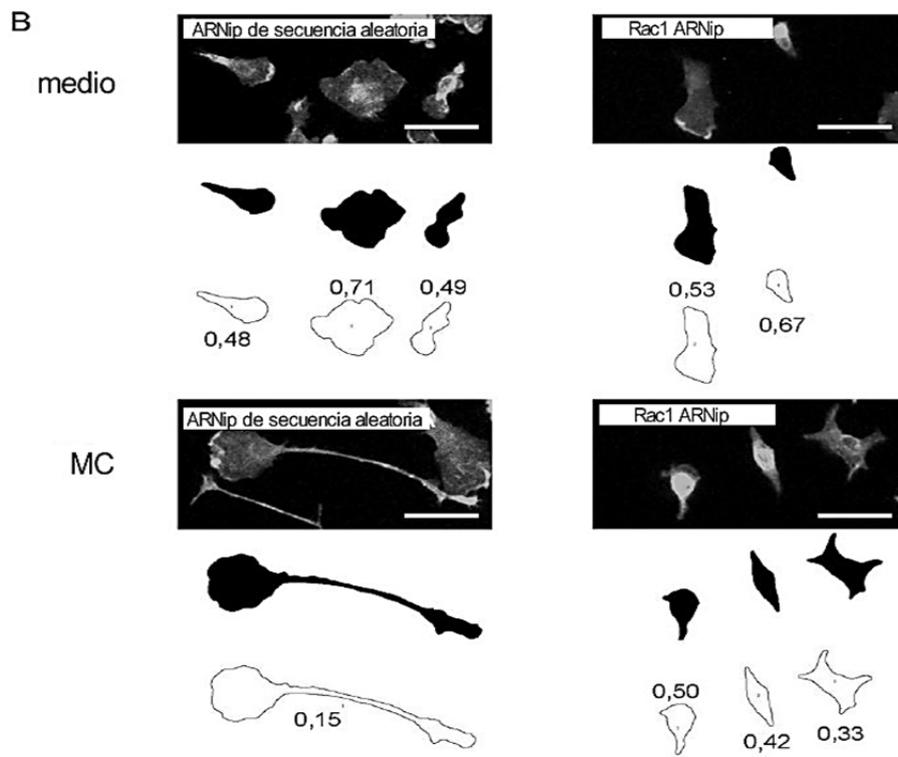
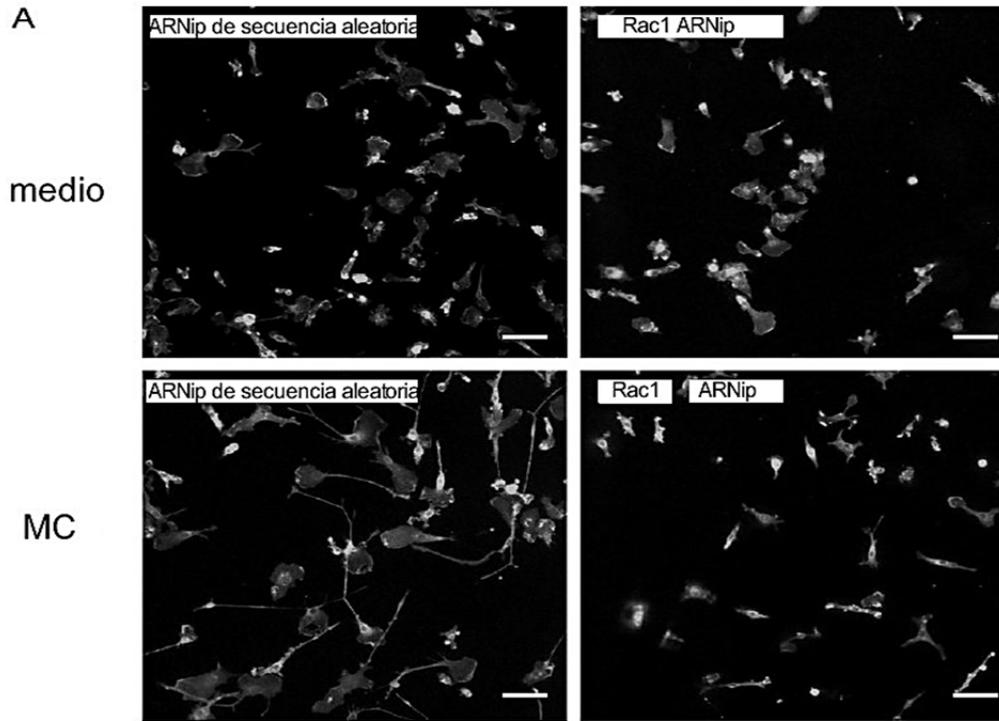


FIG. 2

C

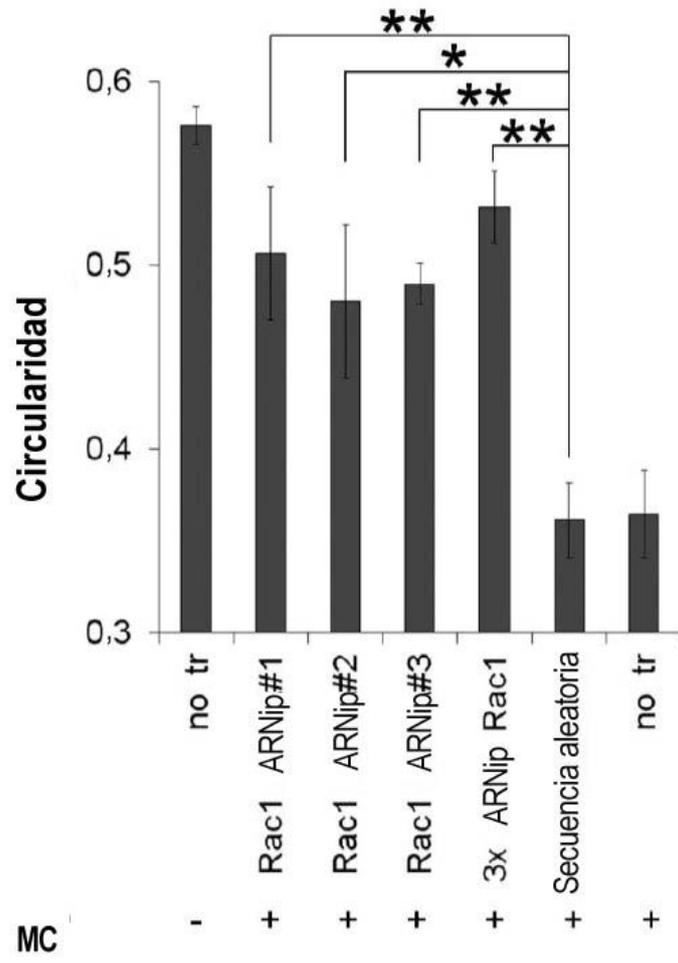


FIG. 2(cont.)

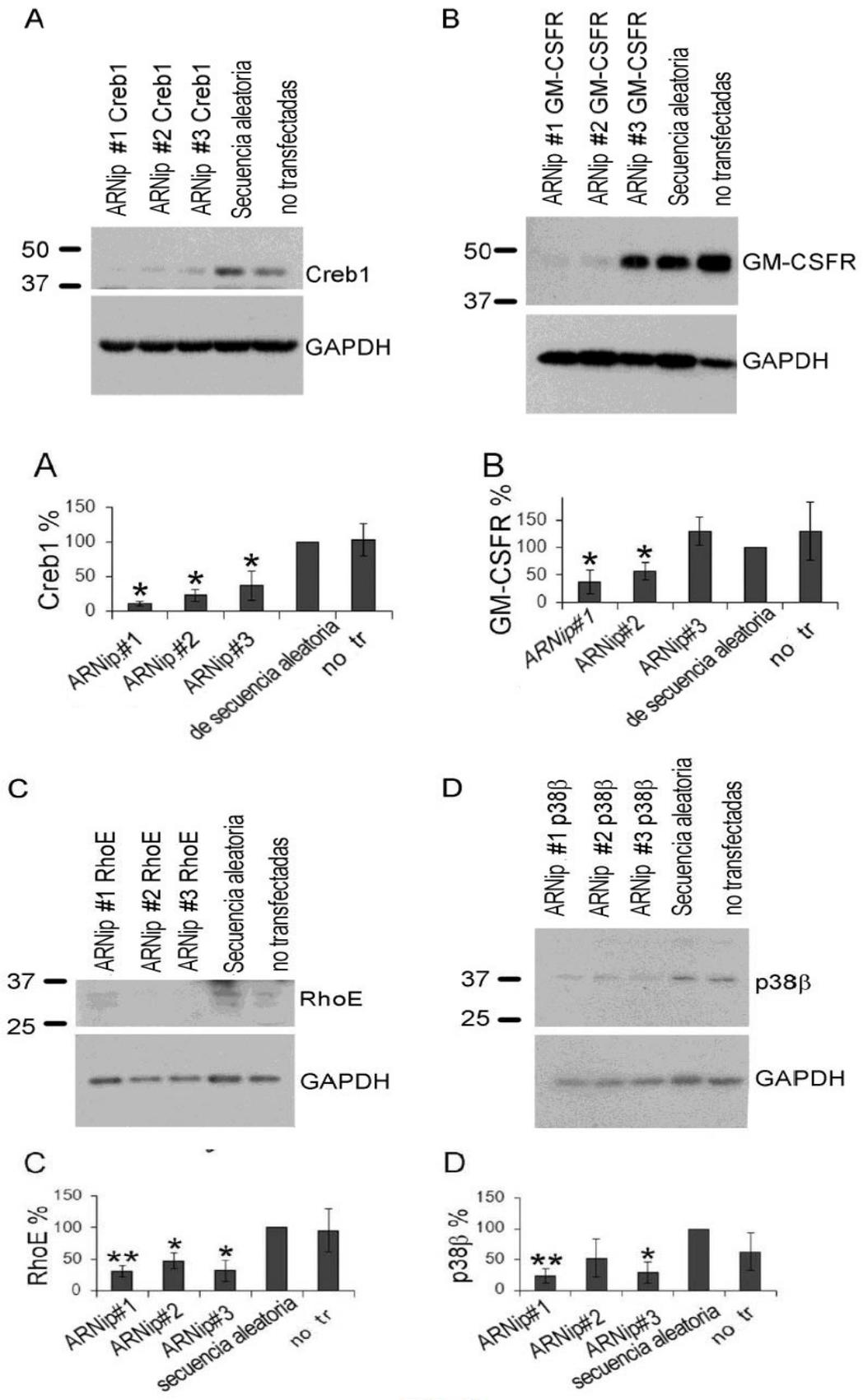


FIG. 3

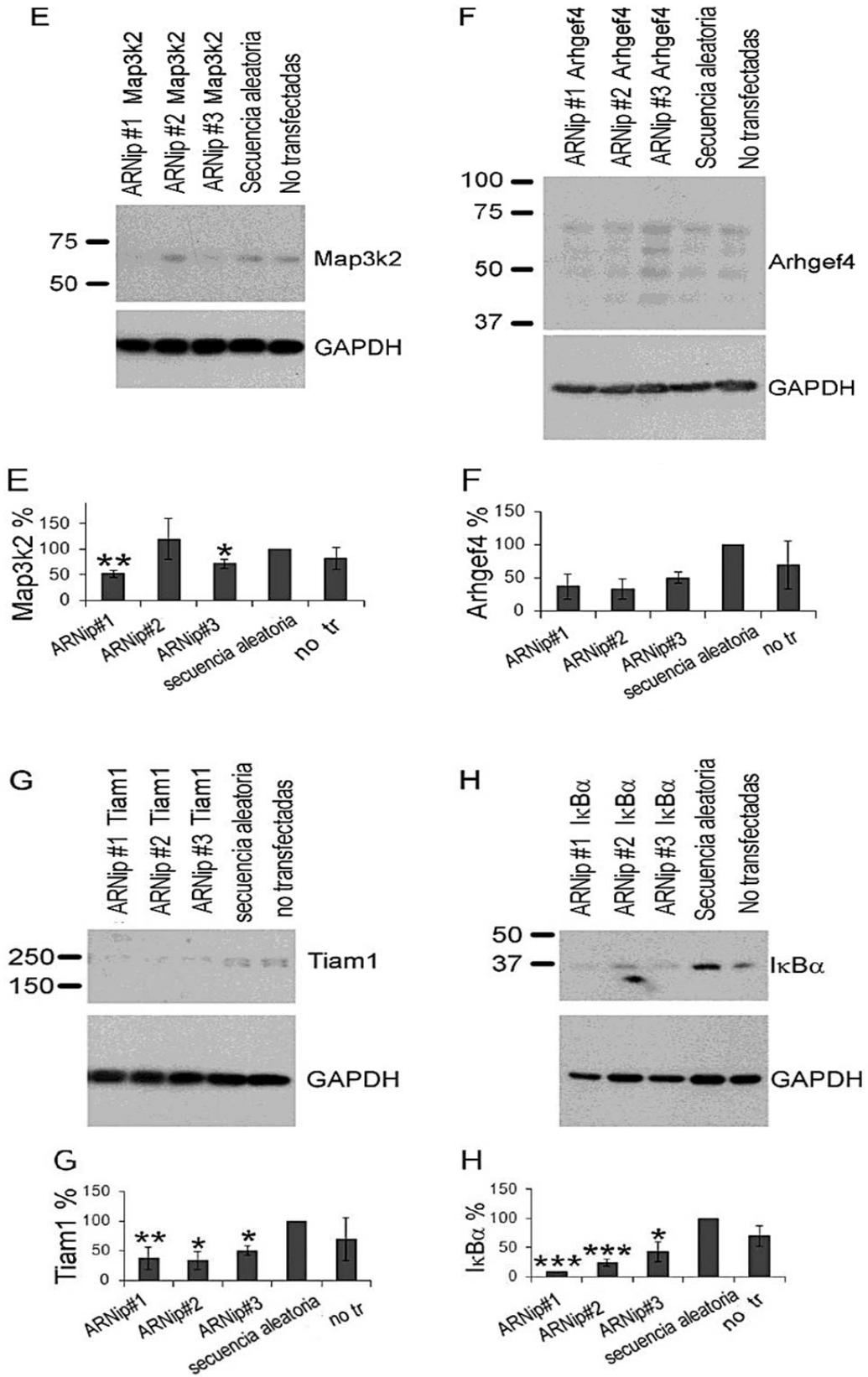


FIG. 3 (CONT.)

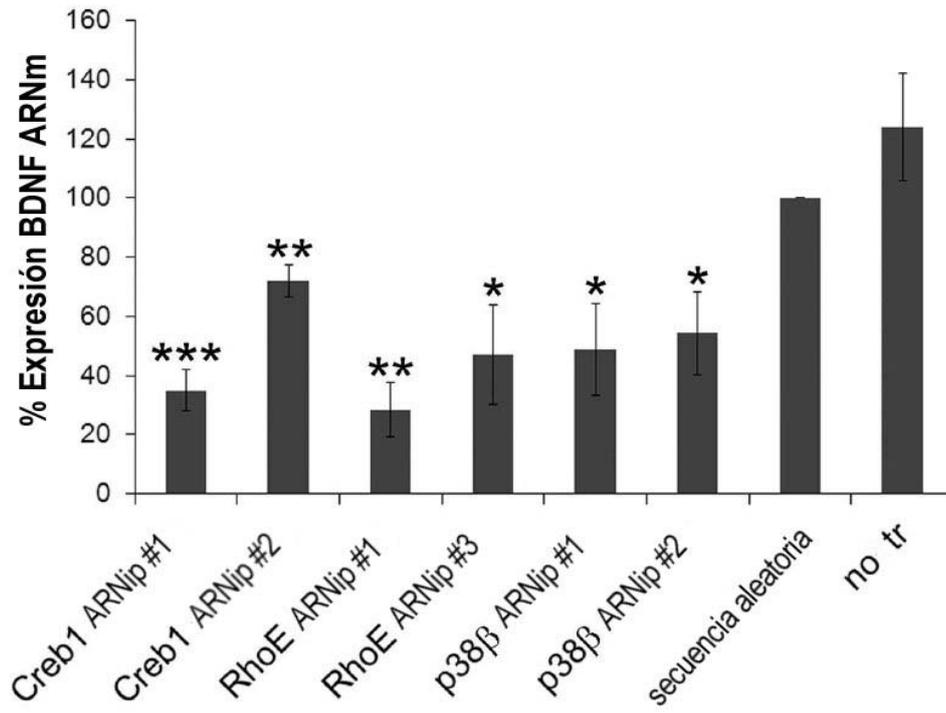


FIG. 4

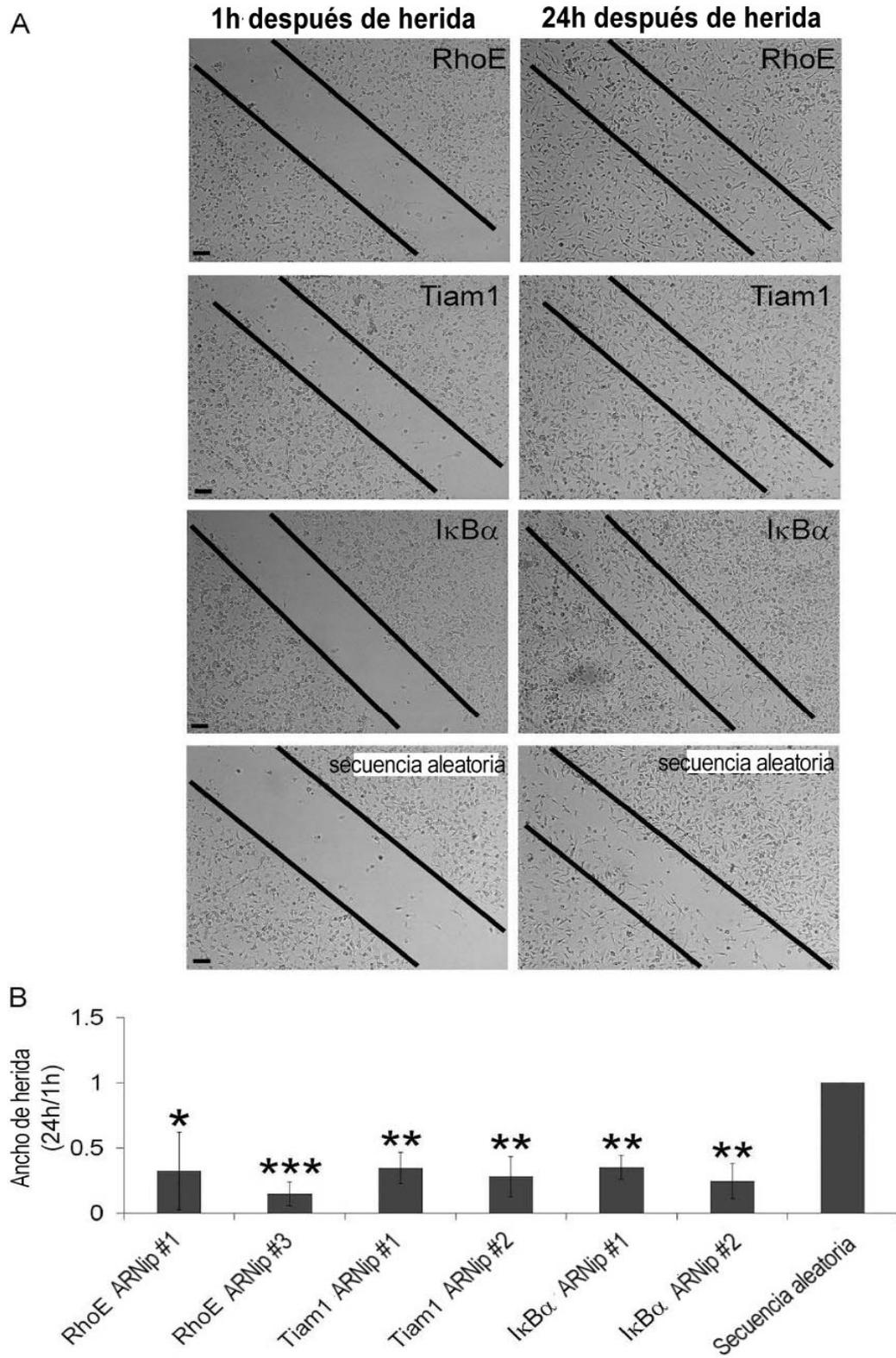


FIG. 5

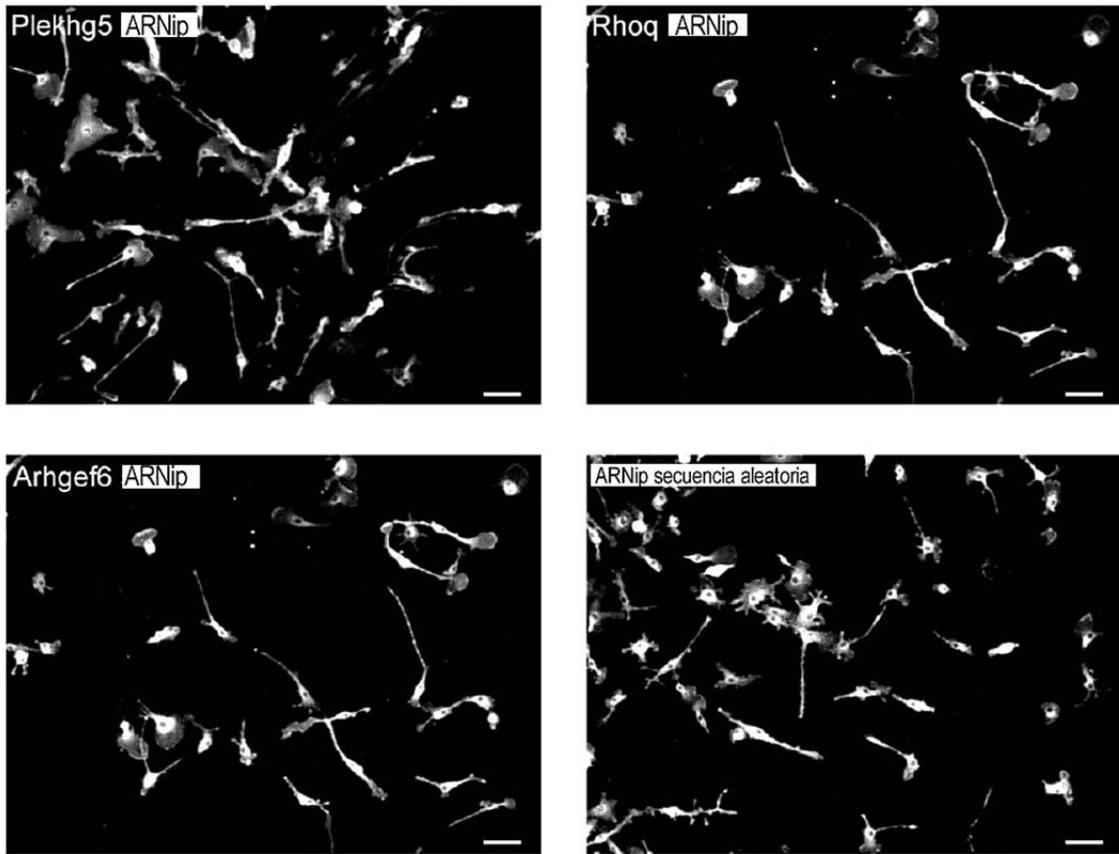


FIG. 6



- ②① N.º solicitud: 201831217
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005115482 A2 (UNIV NORTH CAROLINA et al.) 08/12/2005, página 3 segundo párrafo, y Reivindicaciones 2, 5 y 13	1-9, 11-21
X	GER J.A. RAMAKERS. "Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition". TRENDS in Neurosciences, 01.04.2002, Vol. 25, Nº 4, Páginas 191-199. (ver pág. 192-195 y Fig. 2)	1-4
X	NODE-LANGLOIS ROXANNE et al. "Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis". Journal of Cell Science DEC 1 2006. , 01/12/2006, Vol. 119, Nº 23, Páginas 4986-4993, ISSN 0021-9533(print) ISSN 1477-9137(electronic), <DOI: doi:10.1242/jcs.03273>. (apartados "Results" y "Discussion")	1-4
A	SALMINEN A et al. "ROCK, PAK, and Toll of synapses in Alzheimer's disease". Biochemical and Biophysical Research Communications, 20080711 Elsevier, AMSTERDAM, NL. Andrews Peter W; Elvassore Nicola, 11/07/2008, Vol. 371, Nº 4, Páginas 587 - 590, ISSN 0006-291X, <DOI: doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.148>. (apartado "PAK and ROCK kinases: master regulators of synaptic plasticity")	1-9, 11-21
A	EP 1752536 A1 (RNAI CO LTD ALPHAGEN CO LTD) 14/02/2007, SEQ ID NO: 294881 y 767245	1-9, 11-21
A	EP 2213738 A2 (DHARMACON INC) 04/08/2010, SEQ ID NO: 649395	1-9, 11-21

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: 1-9, 11-21

Fecha de realización del informe
16.10.2019

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/6811 (2018.01)

A61K31/7105 (2006.01)

A61P25/14 (2006.01)

A61P25/16 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

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

C12Q, A61K, A61P

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, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, XPESP,