

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
27 de Noviembre de 2008 (27.11.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/142194 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12Q 1/68 (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01) **A61P 25/14** (2006.01)

HERNÁNDEZ, Miguel [ES/ES]; Universidad Complutense de Madrid, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, E-28040 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2008/070092

(74) Mandatario: **ELZABURU MARQUEZ, Alberto de;** C/ Miguel Angel, 21, 2º, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:

14 de Mayo de 2008 (14.05.2008)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200701351 17 de Mayo de 2007 (17.05.2007) ES

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Rectorado, Avda. de Séneca s/n, E-28014 Madrid (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **LUCAS LOZANO, José Javier** [ES/ES]; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **MIRAS PORTUGAL, María Teresa** [ES/ES]; Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, E-28040 Madrid (ES). **DÍAZ**

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(54) Title: METHOD FOR THE *IN VITRO* DIAGNOSIS/PROGNOSIS OF HUNTINGTON'S CHOREA

(54) Título: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO / PRONÓSTICO IN VITRO DE LA COREA DE HUNTINGTON

(57) Abstract: The invention relates to a method for the *in vitro* diagnosis/prognosis of Huntington's chorea, based on an increase in the expression and/or activity of the P2X7 gene at neuronal level, to the use of P2X7 antagonists capable of penetrating the hematoencephalic barrier and to pharmaceutically acceptable vehicles for the production of pharmaceutical compositions and drugs intended for the treatment of Huntington's chorea. The invention also relates to a diagnostic kit comprising gene sequences capable of hybridising with sequences belonging to the P2X7 gene. The invention further relates to methods for detecting drugs and for identifying effective doses of inhibitors. Furthermore, the invention relates to neuroimaging methods and probes that can be used to view the above-mentioned increase in the activity of P2X7.

(57) Resumen: Método de diagnóstico / pronóstico in vitro de la corea de Huntington. La presente invención se refiere a un método de diagnóstico y/o pronóstico, in vitro, de la corea de Huntington basado en el incremento de la expresión y/o actividad del gen P2X7 a nivel neuronal y al uso de antagonistas de P2X7, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y vehículos farmacéuticamente aceptables para la elaboración de medicamentos y composiciones farmacéuticas destinados al tratamiento de la corea de Huntington. Así mismo, se describe un kit para diagnóstico que comprende secuencias génicas capaces de hibridar con secuencias pertenecientes al gen P2X7. También se incluyen métodos de detección de fármacos y de identificación de dosis efectivas de inhibidores. Por último, se describen sondas y métodos de neuroimagen que permiten visualizar dicho incremento de actividad de P2X7.

WO 2008/142194 A1

MÉTODO DE DIAGNÓSTICO / PRONÓSTICO *IN VITRO* DE LA COREA DE HUNTINGTON

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se puede englobar dentro del campo de la neurodegeneración y de la genética, concretamente dentro del campo de las enfermedades neurológicas provocadas por alteraciones de base genética, concretamente de la corea de Huntington. Específicamente, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la corea de Huntington basado en la expresión y/o actividad del gen P2X7 a nivel neuronal, a un kit que comprende al menos secuencias génicas capaces de hibridar con secuencias pertenecientes al gen P2X7 para el diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la de corea Huntington. Asimismo, se describe el uso de antagonistas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, los cuales son bloqueadores de la actividad del receptor P2X7, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de medicamentos y composiciones farmacéuticas, destinados al tratamiento de la corea de Huntington.

También se incluyen en la presente invención métodos de detección de fármacos para corea de Huntington y métodos de identificación de dosis efectivas de inhibidores de P2X7, basados en las alteraciones neuronales asociadas con P2X7.

Por último, se describen sondas para neuroimagen que permitan visualizar los incrementos de P2X7 neuronal asociados con corea de Huntington, y métodos de obtención de neuroimágenes que emplean dichas sondas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La Enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurológica, degenerativa, hereditaria, autosómica dominante cuyas tres manifestaciones más importantes son: la aparición de movimientos incontrolados, denominados corea, con pérdida de las capacidades intelectuales y cambios de conducta. Fueron descritos por primera vez por

el doctor George Huntington en 1872. Por lo tanto, la EH es una enfermedad que afecta al cerebro, concretamente a las áreas de la corteza y/o el estriado, donde las neuronas van degenerando progresivamente.

- 5 La enfermedad de Huntington (EH) es una de las más representativas de las enfermedades neurodegenerativas debidas a la expansión de un triplete CAG en el DNA. Este triplete codifica el aminoácido glutamina y el resultado es que, en edades adultas, las proteínas codificadas pueden contener hasta cientos de residuos de glutamina consecutivos. Estas zonas de poliglutamina (poliQ) interfieren con las
- 10 funciones propias de la proteína nativa o causan aparición de una nueva función tóxica. Este tipo de anomalías se agrava en sucesivas generaciones, conforme la expansión del triplete CAG se incrementa.

- Su incidencia es de aproximadamente 10 pacientes por cada 100.000 habitantes, lo que
- 15 representa una frecuencia relativamente elevada, además se transmite de modo autosómico dominante, con desarrollo fatal a partir de los 35-40 años. Actualmente, a pesar de la existencia de medicamentos que pueden paliar algunos de los síntomas asociados a la EH, no se conoce tratamiento alguno que sea realmente efectivo para la curación de la enfermedad. Además, la efectividad de éstos varía en función del
- 20 paciente y tienden a ser menos efectivos conforme avanza la enfermedad.

- Como se ha comentado anteriormente, y está dispuesto en el estado de la técnica, la enfermedad de Huntington tiene una base genética donde el gen con expansión de poliglutamina es el que codifica la proteína anómala *huntingtina*. El gen denominado
- 25 IT15 se encuentra cerca del extremo del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). En la enfermedad de Huntington puede haber desde 37 hasta 240 repeticiones del triplete CAG, que codifica otras tantas glutaminas. En individuos sanos puede haber ente 11 y 35 repeticiones de este triplete sin que aparezca ninguna anomalía. A partir de 42 repeticiones, la enfermedad aparece con todos sus síntomas y el desarrollo de la misma
- 30 es proporcional a la longitud de la cadena de poliglutaminas (poli-Q). Esta expansión de poliglutaminas se encuentra próxima al extremo N-terminal de la proteína, alterando su función, su recambio y formándose cúmulos citosólicos y nucleares. Esta proteína se

expresa abundantemente en el córtex cerebral y los ganglios basales, que son áreas esenciales para el control del movimiento. Los primeros síntomas aparecen al final de la segunda década de vida y la gravedad de los síntomas depende de la expansión del triplete CAG. La participación directa de la huntingtina en la génesis de la enfermedad se ha comprobado de manera experimental en ratones cuyo cerebro ha sido modificado genéticamente para producir la versión alargada de la proteína, presentando estos roedores daño cerebral y problemas de movilidad muy parecidos a los observados en los pacientes.

10 Parece existir una pérdida significativa de las neuronas GABAérgicas del estriado, lo que explicaría la pérdida de la modulación inhibitoria mediada por GABA en los ganglios basales. También desde etapas iniciales hay una atrofia generalizada de la corteza cerebral y a lo largo de la progresión de la enfermedad los pacientes presentan pérdida de neuronas de la corteza cerebral. En etapas más avanzadas de la enfermedad, también disminuyen las neuronas colinérgicas y dopaminérgicas. La muerte de las neuronas de estriado en los pacientes afectados por la enfermedad de Huntington hizo postular un efecto activador de la proteína mutada sobre las caspasas que participan en la apoptosis neuronal. Los terminales GABAérgicos de estriado tienen una elevada presencia de receptores ionotrópicos de nucleótidos (P2X) y de dinucleótidos. Estos receptores presinápticos que permiten la entrada masiva del ión calcio, son a su vez modulados por los receptores para el propio GABA, de tipo metabotrópico GABA_B, que se encuentran co-localizados en los mismos terminales.

Adicionalmente, se ha establecido recientemente que el ATP extracelular provoca muerte neuronal a través de la estimulación de los receptores P2X7. Estos son canales catiónicos accionados por ATP, que se sabe que modulan la liberación de neurotransmisores desde los terminales presinápticos. El receptor de P2X7 se detectó inicialmente en cerebro de rata y se expresa abundantemente en células del linaje hematopoyético y en múltiples tipos celulares del sistema inmunológico. Posteriormente, se detectó en microglía y en neuronas, sobre todo en terminales sinápticas. La estimulación de P2X7 en el sistema inmunológico regula la producción y liberación de citoquinas.

El documento US2005/0288288, se refiere a derivados de piperidina que actúan como antagonistas del receptor P2X7 y son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, inmunológicas o cardiovasculares. Dicho documento también cita la posible aplicación de esos antagonistas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, concretamente la enfermedad de Huntington. Pero la conexión entre P2X7 y corea de Huntington en el documento de patente US 2005/0288288 deriva del papel de P2X7 en la inflamación y la intermediación de interleuquinas como la IL-1 a través de la glia y, en cambio, en la presente invención se demuestra que el receptor alterado en sus concentraciones y estructura es el receptor P2X7 neuronal y que es en las zonas dañadas del sistema nervioso central donde se encuentran las concentraciones elevadas del mismo. Concretamente, es en los terminales de las neuronas corticales donde la elevada concentración de P2X7 incrementa el tránsito de Ca^{++} e induce una mayor respuesta, sin que sea necesaria la intermediación de interleuquinas o cualquier otra citoquina ni la participación de células del sistema inmunológico para que se produzca la muerte neuronal, como se ha demostrado en cultivos puros neuronales sin presencia de otros tipos celulares durante el desarrollo de la presente invención. Por tanto, aunque una administración de inhibidores de P2X7 produjera una disminución de IL-1 en las células extracerebrales del sistema inmunológico, y esto llevara a una mejora de la enfermedad, según la presente invención, la inhibición de los receptores P2X7 **neuronales** podría atenuar las alteraciones en la entrada de calcio y vulnerabilidad a apoptosis de las neuronas afectadas en la EH. Por tanto, en el caso de la presente invención, la eficacia de un inhibidor sería mayor o sólo funcionaría si éste es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica, para que pueda interaccionar directamente con los receptores P2X7 a nivel del sistema nervioso central. Esto demuestra que para paliar los síntomas de la corea de Huntington utilizando antagonistas del receptor P2X7 no es necesario que sean suministrados directamente al sistema nervioso central, sino por otras vías de más fácil acceso y más eficaces tales como las vías intraperitoneal e intravenosa.

La presente invención demuestra concretamente que el BBG es más efectivo que el resto de los antagonistas de P2X7 descritos en el estado de la técnica ya que éste es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica, demostrándose que el BBG

administrado intraperitonealmente a ratones llega al parénquima cerebral a concentraciones compatibles con un efecto antagonista sobre el receptor P2X7, que el BBG administrado intraperitonealmente a ratones R6/1 detiene el deterioro progresivo de la coordinación motora en el test del rota-rod, y que BBG administrado intra-

5 peritonealmente a ratones R6/1 previene la muerte neural, ya que las células caspasa-3 positivas (apoptóticas) disminuyen en la corteza. Además, la administración de BBG produce menos efectos secundarios adversos debido a que el antagonista se dirige de forma directa al receptor P2X7 de las neuronas, ya que es sólo en los modelos en los que está presente la *htt* mutada en los que funciona.

10

Aunque los experimentos de la presente invención se realizaron con BBG, los datos experimentales constituyen una evidencia clara de que cualquier otro inhibidor de P2X7 que atraviese la barrera hematoencefálica, produciría efectos similares. Otros ejemplos de dichos inhibidores serían el decavanadato ($[V_{10}O_{28}]^{6-}$) o el KN-62 (1-[N,O-bis-(5-

15 isoquinolin-sulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenil-piperazina)

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

20

La presente invención se refiere a concretamente a un método de diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la corea de Huntington basado en la expresión y/o actividad del gen P2X7 y al uso de antagonistas, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, los cuales son bloqueadores de la actividad del receptor P2X7, y vehículos

25 farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la corea de Huntington. Por otro lado, en la presente invención se describe un kit que comprende, al menos, secuencias génicas capaces de hibridar con secuencias pertenecientes al gen P2X7 para el diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la corea de Huntington.

30

Descripción detallada de la invención

Se planteó la hipótesis de que la alteración de la permeabilidad al calcio mediada por P2X7 podía contribuir a la disfunción sináptica y la apoptosis incrementada observadas en la corea de Huntington (HD). Usando modelos celulares y de ratones HD, se demostraron las concentraciones incrementadas del receptor y la permeabilidad al calcio mediada por P2X7 alterada en somas y terminales de neuronas HD. Además, las neuronas cultivadas que expresaban huntingtina mutada, mostraban una susceptibilidad incrementada a apoptosis accionada por estimulación del receptor P2X7.

10

El desarrollo de la presente invención se realizó mediante la observación de la expresión de huntingtina mutada en las zonas de la corteza y/o el estriado del cerebro y la sangre periférica (SP) en modelos animales, así como en neuronas en cultivo.

15 Inicialmente, se estudió la presencia del receptor P2X7 y otros marcadores en las zonas principalmente afectadas en la enfermedad de Huntington, como la corteza y el estriado, utilizando modelos de ratones R6/1 (uno de los primeros ratones transgénicos diseñados para el estudio de esta enfermedad) que expresan *huntingtina* mutada de forma ubicua, donde la expresión del transgén está dirigida por el promotor de la *huntingtina*.
20 Además, también se llevó a cabo el estudio de la presencia del receptor P2X7 en sangre periférica (Fig. 1)

Posteriormente, se estudiaron las áreas cerebrales para la presencia del receptor P2X7 y otros, usando la sangre periférica como control, en modelos de ratones Tet/HD94 (también denominados HD94) que expresan *huntingtina* de forma condicional, mediante control de tetraciclina en el promotor, donde la cola poli-Q presenta 94 glutaminas. También se utilizaron preparados neurales de este modelo para estudios de respuesta en terminales sinápticos, demostrándose la presencia inequívoca del receptor P2X7 con localización presináptica (Fig. 2)

30

El tercer modelo consiste en cultivos primarios de neuronas corticales y estriatales de ratón silvestre que se transfectan con plásmidos de expresión que codifican el fragmento

N-terminal de la *huntingtina* con una expansión de poli-Q de 17 glutaminas, que se comporta como normal, y con otras expansiones de 72 ó 84 glutaminas que reproducen los aspectos de la enfermedad de Huntington. Estos fragmentos están unidos a GFP (Green Fluorescent Protein) o CFP (Cyan Fluorescent Protein) para facilitar su visualización. En estas neuronas transfectadas se demuestra la presencia del receptor P2X7 con diferentes propiedades según tengamos el fragmento normal o el expandido de la *htt* mutada, donde la entrada de Ca^{++} es mucho mayor. Se alteran las propiedades físico-químicas del receptor, observándose mayor afinidad y mayor respuesta tanto al ligando fisiológico como al ligando farmacológico. Esta respuesta puede ser inhibida por el inhibidor BBG.

A partir de estos hallazgos, referidos a la expresión de huntingtina mutada, en la presente invención se comprobó el acaecimiento de los sucesos que se explican a continuación.

15

En los modelos de ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington se observó, utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativa, un incremento muy significativo de la transcripción de P2X7 en la corteza cerebral de estos animales con respecto a los ratones control. Como consecuencia del aumento en la transcripción de P2X7 en el córtex cerebral, se observa un notorio incremento de la proteína en la zona del estriado, mediante la técnica de transferencia de tipo Western (WB). Además, se confirma la localización neural, ya que el P2X7 en técnicas de inmuno-histoquímica se observa que está localizado en los axones que atraviesan el cuerpo calloso y que contactan con las neuronas de localización estriatal. En las micrografías, se observa la abundante presencia de P2X7 en los axones que salen del córtex y su localización conjunta con marcadores específicos de axones (beta-3 microtubulina, marcador exclusivamente axonal). Atraviesan el cuerpo calloso para formar botones alrededor de las neuronas estriatales positivas para el marcador DARPP-32 específico de neuronas estriatales de proyección (las que más notablemente degeneran en la EH). Se observó cómo se produce la convergencia alrededor de los somas neurales sin que haya localización conjunta de ambos marcadores. Por tanto, se puede concluir que P2X7 es axonal y marca los terminales en torno a las neuronas estriatales. Además se vio, mediante la

técnica WB, que el aumento de receptor P2X7 también se detecta en sangre periférica de ratones R6/1, en una cantidad 2,5 veces superior al control.

Por otro lado, se detectó alteración en la fisiología del receptor P2X7, tanto en la
5 afinidad como en la respuesta máxima. En las neuronas que expresan htt mutada, los receptores son capaces de responder a concentraciones más bajas del agonista, produciéndose cambios en el patrón de entrada de calcio en respuesta a agonistas P2X7 en sinaptosomas del modelo animal Tet/HD94 y en neuronas silvestres transfectadas con *huntingtina* mutada. (Fig. 3).

10

A continuación, se analizó la permeabilidad al calcio en terminales nerviosas aisladas así como en neuronas corticales en cultivo transfectadas o no con el fragmento de poliQ expandido, en respuesta a una exposición de 30 segundos a una concentración 10 μ M del agonista de P2X7 BzATP (Fig. 4). En el caso de las terminales nerviosas aisladas o
15 sinaptosomas, el porcentaje de ellos que respondió al agonista fue significativamente mayor en aquellos que procedían de ratones transgénicos Huntingtonianos (Tet/HD94) que en los procedentes de ratones controles.. Así mismo, se realizaron análisis microfluorimétricos de concentración de calcio. Similares resultados fueron obtenidos cuando se analizaron las terminales nerviosas de las neuronas mantenidas tres días en
20 cultivo y transfectadas con la htt mutada. Para realizar estos ensayos las neuronas y los sinaptosomas fueron cargados con una solución FURA-2AM (5 μ M) durante 30 min. a 37°C, para permitir la hidrólisis intracelular del colorante FURA-2AM. Mediante esta sonda fueron analizados los incrementos de calcio inducidos en las neuronas o en las terminales nerviosas al ser estos estimulados con agonistas selectivos del receptor
25 P2X7. Los cubreobjetos donde se pegaron las neuronas o sinaptosomas con polilisina se montaron en una cámara de superfusión en un microscopio Eclipse TE-2000 de Nikon. El medio de ensayo fue el HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4). Las neuronas se superfundieron a razón de 1,2 ml/min con medio de perfusión exento de Mg²⁺ durante las pruebas funcionales.
30 Inicialmente, se aplicaron a las neuronas pulsos de Bz-ATP 10 μ M durante 30 segundos, en ausencia de cualquier otro fármaco. Luego, se incubaron las neuronas durante 5 min. con BBG (1 μ M) y se volvió a ensayar con Bz-ATP 10 μ M en presencia

del antagonista. Se aplicó finalmente un pulso de K^+ 30 mM al final de cada experimento para confirmar la viabilidad de las neuronas y la funcionalidad de los sinaptosomas estudiados. Todos los compuestos se disolvieron en medio HBM exento de Mg^{2+} .

- 5 Las neuronas se visualizaron utilizando un microscopio Nikon con una lente de aceite 0,5-1,3 S Fluor de 40 aumentos. La longitud de onda de la luz entrante se filtró hasta 340 nm y 380 nm con ayuda de un monocromador (10 nm de anchura de banda, Optoscan monocromador, Cairin). Las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD ORCA-ER C 47 42-98 de Hamamatsu controlada por un software Metafluor 6.3r6
- 10 (Universal Imaging Corp., Cambridge, UK). El tiempo de exposición fue de 250 ms para cada longitud de onda y el tiempo de cambio <5 ms. Las imágenes se tomaron de forma continua y se almacenaron en un disco SCSI rápido. Los datos en el transcurso del tiempo representan la intensidad lumínica promedio en una región elíptica pequeña dentro de cada célula. Los componentes de fondo y de autofluorescencia se restaron
- 15 para cada longitud de onda. De acuerdo con los resultados obtenidos en la Fig. 3, el porcentaje de sinaptosomas que respondía al antagonista era significativamente mayor en la preparación de ratones Tet/HD94. Los registros de imágenes del calcio en respuesta a la exposición a BzATP producían dos tipos de cinética. En un caso, los sinaptosomas mostraban un pico inicial que permanecía elevado durante la exposición a
- 20 BzATP, y decrecía progresivamente durante el lavado del BzATP (perfil decreciente). El segundo perfil se caracterizaba por múltiples picos de fluorescencia en el sentido creciente de la escala, que permanecían durante al menos 25 segundos tras la eliminación del BzATP (perfil creciente). En preparaciones sinaptosómicas de ratones silvestres ambos perfiles estaban representados de forma similar. Sin embargo, en
- 25 preparaciones sinaptosómicas Tet/HD94, el porcentaje se desviaba a favor del perfil creciente. Estos datos sugieren que, además de las concentraciones incrementadas de receptor P2X7 en el estriado de ratones HD, se produce una alteración del estado funcional del receptor, a nivel del terminal sináptico. Por otra parte, cuando las neuronas se preincubaban con BBG 1 μM , se suprimía el incremento del calcio intracelular
- 30 inducido por BzATP 10 μM .

Además, se demostró que el tratamiento con BzATP (agonista de P2X7), a dosis que no afectan a la viabilidad de cultivos neuronales de los ratones silvestres, incrementa la muerte celular en neuronas corticales de ratones Tet/HD94. Se trataron cultivos primarios de neuronas corticales de ratones control y Tet/HD94 con BzATP 10 μ M durante 2 horas y se analizaron 48 horas después. Las neuronas vivas se detectaron con calceína AM (acatoximetilester) y la muerte celular con yoduro de propidio, que atraviesa la membrana de las células muertas para marcar su ADN. En la fig. 5-C, D se comparan cultivos de neuronas corticales y estriatales de ratón silvestre y de modelo Tet/HD94, apreciando como BzATP, que es inocuo en cultivos de ratones silvestres, aumenta la muerte celular en las neuronas corticales del modelo huntingtoniano, efecto que se revierte con el uso de un antagonista de P2X7 como BBG. La muerte celular se puede detectar asimismo mediante otras técnicas equivalentes como: tinción de TUNEL, detección de caspasas activadas, detección de LDH, etc.

Los hallazgos citados en la presente invención puede constituir una importante herramienta para el diagnóstico, pronóstico y curación de la corea de Huntington, al desprenderse de ellos los resultados que se citan a continuación.

Se observó, en los animales modelo en los que la expresión de htt es ubicua, que a lo largo de la progresión de la enfermedad y antes de que ésta sea sintomática, las concentraciones de ARNm y de proteína P2X7 en sangre periférica están notablemente aumentadas. Por este motivo, en la presente invención se propone al P2X7 como marcador para pacientes asintomáticos en los que un aumento de RNAm o de proteína pueden indicar la proximidad del inicio de la sintomatología huntingtoniana, así como la progresión de la enfermedad *per se* y en respuesta a un posible tratamiento.

Además, la presente invención propone el uso de antagonistas o inhibidores del receptor P2X7, tales como BBG (Brilliant Blue G) o cualquier otro que pueda atravesar la barrera hemato-encefálica y tenga una actuación selectiva sobre el P2X7 neuronal, para la elaboración de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la corea de Huntington, mediante la atenuación de las alteraciones neuronales (cambios en la entrada de calcio y mayor vulnerabilidad a apoptosis) producidas como consecuencia

- dicha enfermedad y que resultan de la expresión de huntingtina mutada en las propias neuronas afectadas. En modelos en cultivo se vio que BBG neutraliza las acciones excito-tóxicas de BzATP en neuronas. Así mismo, se comprobó que el tratamiento con BBG inyectado intraperitonealmente *in vivo* reduce la incidencia de muerte celular en
- 5 corteza de ratones R6/1 de nueve meses de edad. Tras el sacrificio de los ratones, se analizó la caspasa-3 endoproteolizada (como marcador de muerte celular) en corteza y estriado, viéndose que el tratamiento con BBG reduce notablemente la muerte celular en neuronas corticales del modelo huntingtoniano R6/1 (Fig.7). Además, tal y como se observa en la Figura 3, hay una entrada masiva de Ca^{++} en un gran número de
- 10 terminales, situación que se repite en neuronas corticales transfectadas con la region N terminal del exon-1 de la htt expresando 72Q pero que puede ser completamente bloqueada por el BBG. La entrada masiva de Ca^{++} produce excito-toxicidad por activación de caspasas, daño mitocondrial y muerte celular.
- 15 Por otro lado, en la presente invención se desarrolló un modelo *in vitro* de identificación de fármacos que potencian el efecto protector sobre las neuronas tratadas con inhibidores de P2X7 y transfectadas con la region N terminal del exón 1 de la htt-72Q, midiendo respuestas específicas en las terminales de las neuronas en cultivo.
- 20 Finalmente, en la presente invención se llevó a cabo la constitución, mediante cultivos de neuronas, de los modelos transgénicos o transfectados con huntingtina mutada, de un sistema *in vitro* de identificación de fármacos que, administrados conjuntamente con inhibidores de P2X7, disminuyan las alteraciones en la entrada de calcio o la vulnerabilidad a muerte neuronal, y de identificación de dosis de inhibidores P2X7
- 25 tengan efectos beneficiosos en las neuronas que expresan htt mutada (estas dosis tendrían un menor riesgo de efectos adversos).

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de la corea de Huntington, basado en la expresión

30 y/o actividad del gen P2X7, el cual se puede realizar tanto a nivel de RNAm como de proteína. La consecuencia del aumento en la transcripción de P2X7 en el córtex cerebral, es un notorio incremento de la proteína en la zona del estriado, localizado

mediante la técnica de transferencia de tipo Western (WB). Además, se vio que el aumento de receptor P2X7 también se detecta en sangre periférica de ratones R6/1, en una cantidad 2,5 veces superior al control (por WB).

- 5 Así, el método de diagnóstico/pronóstico se puede llevar a cabo tanto en líquido cefalorraquídeo como en tejidos periféricos (concretamente sangre periférica) mediante la técnica RT-PCR o con anticuerpos.

La toma de muestras puede realizarse tanto a nivel del líquido cefalorraquídeo como a
10 nivel de la sangre periférica. El aumento de P2X7 se puede analizar en las muestras anteriores a nivel de ARNm o a nivel de proteína. A nivel de ARNm se determina la proporción de ARN mensajero de P2X7 respecto a un control interno (RNA-m de β -actina) mediante la técnica RT-PCR u otras que sirvan para el mismo fin. A nivel de proteína se determina la proporción de proteína de P2X7 respecto a un control interno,
15 tal como la concentración de proteína beta-actina, alfa-tubulina o GAPDH, mediante la técnica WB con anticuerpos específicos para P2X7 y para el respectivo control interno. Con el mismo fundamento se podría establecer una detección por ELISA. Otra forma de detectar el aumento de P2X7 a nivel de proteína en las muestras anteriormente mencionadas es mediante citometría de flujo usando un ligando de P2X7 detectable por
20 técnicas luminométricas o fluorimétricas (como el propio BBG) y determinando la proporción de este marcador con respecto a la señal en citometría de flujo de un control interno proporcional al número de células o simplemente con respecto al número de células detectado por el citómetro

- 25 Para cualquiera de estas determinaciones el resultado de concentraciones aumentadas de P2X7 resultaría de la proporción con respecto a un marcador/control interno de proteínas o ARNm patrón, cuya expresión no se modifica en el transcurso de la enfermedad. No serían, por tanto, estrictamente necesarias muestras de individuos control de concentración del mensajero o la proteína P2X7, pero tampoco se descarta
30 que este tipo de controles pudieran facilitar la determinación. Se consideraron estadísticamente significativos los incrementos de RNAm o proteína en los que $p < 0,05$ según un test comparativo de ANOVA.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende, al menos, secuencias génicas capaces de hibridar con secuencias pertenecientes al gen P2X7 para el diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la corea de Huntington.

- 5 El tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de antagonistas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, los cuales son bloqueadores de la actividad del receptor P2X7, y de vehículos farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la corea de Huntington, donde dicho antagonista puede ser BBG, KN-62 o decavanadato y donde dichos antagonistas pueden
- 10 presentar unido un ligando o sonda detectable a nivel de cerebro mediante técnicas de neuroimagen.

- El cuarto aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, los cuales
- 15 son bloqueadores de la actividad del receptor P2X7, y vehículos farmacéuticamente aceptables, destinadas al tratamiento de la corea de Huntington en las que dichas composiciones pueden comprender sondas o ligandos detectables a nivel de cerebro mediante técnicas de neuroimagen.

- 20 El quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método de detección *in vitro* de fármacos útiles para el tratamiento de la corea de Huntington, que disminuyen las alteraciones neuronales inducidas por sustancias activadoras de P2X7 (p.ej. agonistas), que comprende las siguientes etapas:

- a) medir la concentración de calcio en los terminales y/o la proporción de
- 25 apoptosis en neuronas en cultivo que expresan la proteína huntingtina mutada, en presencia y ausencia del fármaco evaluado;
- b) calcular la diferencia entre ambas concentraciones;
- c) considerar fármacos eficaces aquellos en los que dicha diferencia sea estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

30

La detección de apoptosis se puede realizar mediante cualquier método habitual, p.ej. tinción con yoduro de propidio y calceína.

El último aspecto de la invención presenta un método de identificación de dosis efectivas de inhibidores de P2X7 para el tratamiento de la corea de Huntington, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) medir la concentración de calcio interna y/o la proporción de apoptosis en neuronas en cultivo que expresan huntingtina mutada, empleando dichas medidas como control;
- b) paralelamente, administrar una dosis del inhibidor a un cultivo de neuronas similar al de la etapa a);
- c) medir la concentración de calcio y la proporción de apoptosis neuronal en el
10 cultivo de la etapa b);
- d) identificar las dosis que producen una concentración de calcio y una proporción de apoptosis significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los controles de a).
- 15 En los métodos anteriormente descritos, se pueden emplear cultivos de neuronas de los modelos transgénicos o de animales silvestres transfectados con huntingtina mutada o cultivos de cualquier línea celular tales como los neuroblastomas, los feocromocitomas u otros con propiedades neuronales y transfectados con formas mutadas de htt.
- 20 Como se ha mencionado anteriormente, en la presente invención se evidencia un aumento en la transcripción y concentraciones de P2X7 en ciertas áreas cerebrales de los modelos murinos afectados por EH. Así, en la presente invención se generaron sondas de neuroimagen que permitieran detectar dicho aumento en el cerebro de pacientes de EH, permitiendo valorar el estado de progresión de la enfermedad y la
25 posible eficacia de una terapia. Por lo tanto, se trata de la generación de un producto, como por ejemplo un ligando del receptor P2X7, que sea detectable por técnicas de neuroimagen, como por ejemplo [11C] raclopride. Así, ese ligando o sonda es susceptible de ser unido a los antagonistas o inhibidores del receptor P2X7, descritos en la presente invención (por ejemplo BBG), o a fármacos que comprendan dichos
30 antagonistas que se unen selectivamente a P2X7 y usarlos para visualizar las concentraciones de P2X7 *in vivo*.

Por tanto el séptimo aspecto de la presente invención se refiere a sondas diseñadas para ser detectadas mediante técnicas de neuroimagen que permiten identificar el aumento en la transcripción y/o concentraciones de P2X7 a nivel de cerebro del paciente.

- 5 El último aspecto de la invención se refiere a la utilización de la citada sonda en un método de obtención de neuroimágenes, que permitiría analizar la progresión de la alteración de las concentraciones de P2X7 como indicador del estadio de progresión de la enfermedad en un paciente concreto a lo largo del tiempo, o como un indicador de la posible eficacia de un tratamiento tras distintos tiempos, dosis, o rutas de administración
- 10 del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1

5 En la presente figura se observa el incremento de los niveles de P2X7 en el estriado y sangre de modelos de ratón de la enfermedad de Huntington. Se representa el análisis por inmunotransferencia de extractos de corteza cerebral (izquierda) y estriatal (derecha) de dos modelos diferentes de ratón de la enfermedad de Huntington (modelo condicional Tet/HD94 (barras negras) y R6/1 (barras grises)), y animales control (barras blancas) con anticuerpos contra P2X7. Se incubaron las membranas con anti- α tubulina (α -Tub) para corregir cualquier posible desviación en la cantidad de proteína. Los histogramas muestran la cuantificación densitométrica de los niveles de P2X7 en ambos modelos de ratones transgénicos frente a controles a diferentes edades (de 3 a 16 meses para los Tet/HD94, y de 3 a 10 meses para los R6/1). Los niveles de RNA mensajero de P2X7 corticales y estriatales se midieron en ratones Tet/HD94 de 16 meses de edad y en los ratones R6/1 de 10 meses, y en sus correspondientes controles a la misma edad. Los histogramas muestran la cuantificación del mensajero P2X7 en ambos modelos versus controles. También se cuantificaron los niveles de la proteína P2X7 en sangre periférica de ratones R6/1 observándose un incremento de 2,5 veces respecto a los controles (* p <0.01, ** p <0.005, *** P <0.001). Es destacable que en sangre periférica el incremento de los niveles de expresión en el modelo de ratón huntingtoniano es de 2,5 veces medio con respecto al control.

WT: transferencia de tipo Western.

Figura 2

En la presente figura se puede observar la localización de P2X7 en proyecciones cortico-estriatales.

A y B. Se representan secciones corticales (A) y estriatales (B) de Tet/HD94 de 16 meses de edad marcadas con anti-P2X7.

C y D. Se representa una triple inmunofluorescencia con anticuerpos anti-P2X7 y anti- β III tubulina (BIII Tub) y marcaje nuclear con Dapi de secciones corticales de ratones Tet/HD94 de 16 meses de edad. Las flechas vacías muestran núcleos apoptóticos de neuronas piramidales que expresan P2X7. Las flechas blancas señalan proyecciones corticales que expresan P2X7.

E. Se representa un corte sagital de cerebro de ratón R6/1 de 10 meses que muestra el marcaje de P2X7 a nivel cortical (Cx), del cuerpo caloso (CC) y estriado (St).

F. Se representa una doble inmunofluorescencia con anti-P2X7 y anti-DARPP-32 (DARPP-32) de estriado de ratón R6/1 de 10 meses de edad. Escalas: en A y B 100 μ m; C y D 25 μ m.

Figura 3

La presente figura representa la expresión incrementada y respuesta alterada de P2X7 en terminales sinápticos de cerebro anterior de ratones Tet/HD94.

A y B. Representa una doble inmunofluorescencia de terminales sinápticos de cerebro anterior marcados con anti-sinaptofisina y anti-P2X7 de animales control (A) y Tet/HD94 (B).

C. Representa un histograma en el que se muestra la cuantificación de terminales sinápticos positivos para P2X7 en ratones control (barra blanca) y Tet/HD94 (barra negra).

D. Se representa la cuantificación de los terminales sinápticos que responden a la estimulación con BzATP de animales control (barra blanca) y Tet/HD94 (barra negra).

E y F. Se muestran las medias de la fluorescencia (Fura-2) registrada en el tiempo, de las dos diferentes cinéticas de respuesta de los terminales que responden a la estimulación con BzATP. Las barras superiores indican los periodos de estimulación

analizados con 10 μ M de BzATP. También se indican los porcentajes de los dos tipos de respuesta encontrados en las distintas poblaciones de terminales sinápticos. Todos los terminales analizados respondían a la estimulación con 30mM K⁺ (empleado como control de la funcionalidad del terminal). *p<0.01. (s/div: segundos/división de la
5 escala).

Figura 4.

En la presente figura se representa la permeabilidad al calcio alterada en la que
10 interviene P2X7, en terminales y somas de neuronas primarias que expresan *htt* mutante.

Se prepararon cultivos de neuronas primarias de corteza de ratones silvestres, que expresan el fragmento N-terminal de la htt con el fragmento de poliQ normal (17 CAG), y mutantes, que expresan el fragmento expandido (72 CAGs), fusionado a la GFP.

15

- A. Imagen de una neurona cortical que expresa el fragmento de 72 CAGs fusionado a la GFP (N-htt72QGFP). Las flechas vacías muestran acumulación nuclear de fluorescencia en el soma, que se corresponde con agregados del fragmento de poliQ de la htt, y las flechas llenas con agregados en el neurópilo.
- 20 B. Muestra el mismo campo de neuronas corticales que en la imagen A revelada con la sonda Fura-2. En ambas figuras las flechas triangulares muestran la presencia del N-htt72QGFP en terminales de neuronas transfectadas, las flechas circulares indican terminales nerviosos de neuronas no transfectadas.
- C. Medias de fluorescencia (Fura-2) en el tiempo de dos tipos de respuesta de
25 terminales nerviosos registrados, de neuronas corticales transfectadas y no transfectadas estimuladas con BzATP 10 μ M. También se muestran los porcentajes de terminales sinápticos que muestran cada tipo de perfil cinético en respuesta a Bz-ATP, tanto en las neuronas transfectadas como las no transfectadas. (CONT: Control).
- 30 D. Cambios en la fluorescencia (Fura-2) en el tiempo, registrados en somas de neuronas corticales no transfectadas o transfectadas con N-htt17QGFP o N-htt72QGFP, en respuesta a 0.5 μ M y 10 μ M de Bz-ATP. Los histogramas

muestran la cuantificación de neuronas corticales no transfectadas (barra blanca), transfectadas con el fragmento de 17 repeticiones (barra gris) y con el de 72 repeticiones (barra negra), con somas que responden a ambas dosis de BzATP.

- 5 **E.** El incremento del calcio intracelular inducido por BzATP 10 μ M en neuronas corticales se suprimió cuando las neuronas se incubaron previamente con BBG 1 μ M durante 2 minutos. Las barras indican los periodos de estimulación con los componentes ensayados en los diferentes experimentos. Todas las neuronas analizadas respondían a la estimulación con K^+ 30 mM.

10

(s/div: Segundos/división de la escala)

Figura 5.

- 15 La presente figura representa el incremento de la muerte celular en neuronas corticales de ratones Tet/HD94 en respuesta al tratamiento con BzATP. Se trataron cultivos primarios de neuronas corticales de ratones control y Tet/HD94 con BzATP 10 μ M durante 2 horas y se analizaron 48 horas después.
- 20 **A y B.** Imágenes de fluorescencia de neuronas corticales de ratones control (A) y Tet/HD94 (B) marcados con calbindina y yoduro de propidio tras el tratamiento con BzATP. En algunos casos las neuronas corticales se trataron previamente con BBG 1 μ M 10 minutos antes de la estimulación con BzATP.
- 25 **C.** Los histogramas muestran la cuantificación de neuronas corticales (izquierda) y estriatales (derecha) marcadas positivamente para el anticuerpo anti-calbindina tras el tratamiento con BzATP en presencia o ausencia de BBG. *** $p < 0.001$.

Figura 6.

La presente figura muestra el tratamiento *in vivo* de ratones huntingtonianos R6/1 con BBG. Se trataron ratones silvestres (WT) y R6/1 con BBG (1 mg/ 22 mg de peso corporal) o con solución salina cada 48 horas durante 21 días.

- A. Se midieron las concentraciones de BBG tanto en sangre (izquierda) como en cerebro (derecha), de los animales tratados, observándose unos niveles de 2,25 μ m y 130nM. (UA: Unidades de absorbancia).
- 10 B. La gráfica superior muestra el tiempo de permanencia de los ratones en el rotarod, observándose un freno significativo en el avance de la enfermedad en los ratones R6/1 tratados con el BBG. La gráfica inferior muestra la evolución en el peso corporal de los animales del experimento. Se observa una menor caída en el peso de los ratones R6/1 tratados con BBG que en los tratados únicamente con la solución salina.
- 15

Figura 7.

En la presente figura se representa la reducción de la incidencia de muerte celular en corteza de ratones R6/1 de nueve meses de edad en respuesta al tratamiento con BBG *in vivo*. Tras el tratamiento, se sacrificaron los ratones y se analizó la incidencia de neuronas marcadas positivamente para el anticuerpo anti-caspasa-3 endoproteolizada en corteza y estriado.

- 25 A-D. Detección inmunohistoquímica de neuronas apoptóticas marcadas con anti-caspasa-3.
- A-B. Secciones corticales de ratones R6/1 tratados con solución salina (A) o con BBG (B) marcadas con anticuerpos anti caspasa-3 endoproteolizada. Las flechas indican la presencia de neuronas marcadas, con morfología apoptótica. Los cuadros muestran un aumento de 2.0x de las células apoptótica identificadas con las flechas.
- 30

C-D. Secciones estriatales de ratones R6/1 tratados con solución salina (C) o BBG (D) marcados con anticuerpos anti caspasa-3 endoproteolizada. Las flechas indican la presencia de neuronas marcadas, con morfología apoptótica.

E-F. Los histogramas muestran las cuantificaciones de células marcadas positivamente con anticuerpos anti-caspasa-3 endoproteolizada en corteza y estriado de ratones silvestres (barras blancas) o R6/1 (barras negras) tratados con o sin BBG. * $p < 0.01$.

WT: Transferencia de tipo Western.

10 EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Incremento de los niveles de P2X7 en el estriado y sangre de modelos de ratón de la enfermedad de Huntington.

15 Se realizó el análisis por inmunotransferencia de extractos de corteza cerebral y estriatal de dos modelos diferentes de ratón de la enfermedad de Huntington (modelo condicional Tet/HD94 y R6/1), y animales control con anticuerpos contra P2X7 (Figura 1). Se incubaron las membranas con anti- α tubulina para corregir cualquier posible desviación en la cantidad de proteína. Los histogramas muestran la cuantificación

20 densitométrica de los niveles de P2X7 en ambos modelos de ratones transgénicos frente a controles a diferentes edades (de 3 a 16 meses para los Tet/HD94, y de 3 a 10 meses para los R6/1). Las concentraciones de RNA mensajero de P2X7 corticales y estriatales se midieron en ratones Tet/HD94 de 16 meses de edad y en los ratones R6/1 de 10 meses, y en sus correspondientes controles a la misma edad. Los histogramas muestran

25 la cuantificación del mensajero P2X7 en ambos modelos frente a controles. También se cuantificaron los niveles de la proteína P2X7 en sangre periférica de ratones R6/1 observándose un incremento de 2'5 veces respecto a los controles (* $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, *** $P < 0.001$). El presente ejemplo destaca que en sangre periférica el incremento de los niveles de expresión en el modelo de ratón transgénico es 2,5 veces respecto al control.

EJEMPLO 2. Localización de P2X7 en proyecciones cortico-estriatales.

Se realizaron secciones corticales y estriatales de ratones Tet/HD94 de 16 meses de edad las cuales fueron marcadas con anticuerpo anti-P2X7 (Figura 2). Se realizó una triple inmunofluorescencia con anticuerpos anti-P2X7 y anti- β III tubulina y marcaje nuclear con Dapi de secciones corticales de ratones Tet/HD94 de 16 meses de edad, mostrándose núcleos apoptóticos de neuronas piramidales que expresan P2X7 y señalándose proyecciones corticales que expresan P2X7. Se realizó un corte sagital de cerebro de ratón R6/1 de 10 meses de edad que muestra el marcaje de P2X7 a nivel cortical, a nivel del cuerpo calloso y a nivel del estriado. Finalmente, se realizó una doble inmunofluorescencia con anti-P2X7 y anti-DARPP-32 a nivel del estriado de ratón R6/1 de 10 meses de edad.

EJEMPLO 3. Expresión incrementada y respuesta alterada de P2X7 en terminales sinápticos de cerebro anterior de ratones Tet/HD94.

Se realizó una doble inmunofluorescencia de terminales sinápticos de cerebro anterior marcados con anti-sinaptofisina y anti-P2X7 de animales control y Tet/HD94 (Figura 3). Se realizó la cuantificación de terminales sinápticos positivos para P2X7 en ratones control y ratones Tet/HD94. Por otro lado, se cuantificaron los terminales sinápticos que responden a la estimulación con BzATP de ratones control y ratones Tet/HD94. Posteriormente, se midieron las medias de la fluorescencia registrada en el tiempo, de las dos diferentes cinéticas de respuesta de los terminales que responden a la estimulación con BzATP, indicando los periodos de estimulación analizados con 10 μ M de BzATP y los porcentajes de los dos tipos de respuesta encontrados en las distintas poblaciones de terminales sinápticos. Todos los terminales analizados respondieron a la estimulación con 30mM K⁺ (empleado como control de la funcionalidad del terminal).

*p<0.01.

EJEMPLO 4. El tratamiento con BzATP incrementa la muerte celular en neuronas corticales de ratones Tet/HD94.

En el presente ejemplo se evidencia la muerte celular de neuronas corticales de ratones Tet/HD94 debido al tratamiento con BzATP. Se trataron cultivos primarios de neuronas corticales de ratones control y Tet/HD94 con BzATP 10 μ M durante 2 horas y se analizaron 48 horas después (Figura 5). Se consiguieron imágenes de fluorescencia de neuronas corticales de ratones control y Tet/HD94 marcados con calbindina y yoduro de propidio tras el tratamiento con BzATP. En algunos casos las neuronas corticales se trataron previamente con BBG 1 μ M 10 minutos antes de la estimulación con BzATP. Se realizaron histogramas que muestran la cuantificación de neuronas corticales y estriatales marcadas positivamente para el anticuerpo anti-calbindina tras el tratamiento con BzATP en presencia o ausencia de BBG. ***p<0.001.

EJEMPLO 5. Tratamiento *in vivo* de ratones huntingtonianos R6/1 con BBG.

Se trataron ratones silvestres (WT) y R6/1 con BBG (1 mg/ 22 mg de peso corporal, correspondientes a 45,5 mg/kg de peso) o con solución salina cada 48 horas durante 21 días (Figura 6). Se midieron los niveles de BBG, tanto en sangre como en cerebro, de los animales tratados observándose unos niveles de 2,25 μ M y 130nM. B. Se mostró el tiempo de permanencia de los ratones en el rota-rod, observándose un freno significativo en el avance de la enfermedad en los ratones R6/1 tratados con el BBG y la evolución en el peso corporal de los animales del experimento. Se observó una menor caída en el peso de los ratones R6/1 tratados con BBG que en los tratados únicamente con la solución salina.

EJEMPLO 6. El tratamiento con BBG *in vivo* reduce la incidencia de muerte celular en corteza de ratones R6/1 de nueve meses de edad.

Tras el tratamiento con BBG, se sacrificaron los ratones y se analizó la incidencia de neuronas marcadas positivamente para el anticuerpo anti-caspasa-3 endoproteolizada en corteza y estriado (Figura 7). Se detectaron inmunohistoquímicamente neuronas

- apoptóticas marcadas con anti-caspasa-3. Se visualizaron secciones corticales de ratones R6/1 tratados con solución salina o con BBG marcadas con anticuerpos anti- caspasa-3 digerida, localizándose la presencia de neuronas marcadas, con morfología apoptótica. Se realizaron secciones estriatales de ratones R6/1 tratados con solución salina o BBG
- 5 marcados con anticuerpos anti caspasa-3 digerida y se indicó la presencia de neuronas marcadas, con morfología apoptótica. Se realizaron histogramas que muestran las cuantificaciones de células marcadas positivamente con anticuerpos anti-caspasa-3 en corteza y estriado de ratones silvestres o R6/1 tratados con o sin BBG. * $p < 0.01$.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la corea de Huntington, caracterizado por que posibilita la detección de un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la expresión y/o actividad del gen P2X7 a nivel neuronal, detectable en muestras de líquido cefalorraquídeo o de sangre periférica mediante:
- 5
- a) medición de la proporción de ARNm de P2X7 respecto a un control interno;
- 10 o
- b) medición de la concentración de proteína de P2X7 respecto a un control interno;
- c) comparación de estos valores con valores patrón obtenidos de individuos normales.
- 15
2. Método de diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, según la reivindicación 1, donde la medición de la proporción de ARNm se realiza mediante la técnica RT-PCR.
3. Método de diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, según la reivindicación 1, donde la medición de la concentración de proteína se realiza mediante transferencia de tipo Western, técnicas luminométricas o fluorimétricas, o citometría de flujo.
- 20
4. Kit que comprende, al menos, secuencias génicas capaces de hibridar con secuencias pertenecientes al gen P2X7, para el diagnóstico y/o pronóstico, *in vitro*, de la corea de Huntington.
- 25
5. Uso de antagonistas del receptor P2X7 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la corea de Huntington.
- 30
6. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho antagonista es Brilliant Blue-G (BBG).

7. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho antagonista es KN-62.
8. Uso según la reivindicación 5, en el que dicho antagonista es decavanadato.
- 5 9. Uso según las reivindicaciones 5-8, en el que el antagonista se presenta unido a una molécula visualizable en el cerebro mediante técnicas de neuroimagen.
- 10 10. Uso según las reivindicaciones 5-9, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por una vía diferente a la administración directa al sistema nervioso central.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por vía intravenosa.
- 15 12. Uso según la reivindicación 10, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por vía intraperitoneal.
13. Uso, según la reivindicación 12, en el que el antagonista administrado es BBG a una dosis de 45,5 mg/kg de peso corporal.
- 20 14. Composición farmacéutica que comprende un antagonista del receptor P2X7 capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, destinada al tratamiento de la corea de Huntington.
- 25 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración de la composición por una vía diferente a la administración directa al sistema nervioso central.
- 30 16. Método de detección *in vitro* de fármacos útiles para el tratamiento de la corea de Huntington, que disminuyen alteraciones neuronales inducidas por sustancias activadoras de P2X7, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- a) medir el incremento en la concentración de calcio en los terminales neuronales y/o la proporción de apoptosis en neuronas en cultivo que expresan la proteína huntingtina mutada, en presencia y ausencia del fármaco evaluado;
- b) calcular la diferencia entre los valores en presencia y ausencia del fármaco;
- 5 c) considerar fármacos eficaces aquellos en los que dicha diferencia sea estadísticamente significativa ($p < 0,05$).
17. Método según la reivindicación 16, en el que la proporción de apoptosis neuronal se detecta mediante tinción con yoduro de propidio y calceína
- 10
18. Método de identificación de dosis efectivas de inhibidores de P2X7 para el tratamiento de la corea de Huntington, que comprende las siguientes etapas:
- a) medir la concentración de calcio interna y/o la proporción de apoptosis en un cultivo de neuronas que expresan huntingtina mutada, empleando dichas
- 15 medidas como control;
- b) paralelamente, administrar una dosis del inhibidor, a un cultivo paralelo de neuronas como el de la etapa a);
- c) medir la concentración de calcio y/o la proporción de apoptosis neuronal en el cultivo de la etapa b);
- 20 d) identificar las dosis que producen una concentración de calcio y/o una proporción de apoptosis significativamente inferiores ($p < 0,05$) a las detectadas en la etapa a).
19. Método según la reivindicación 18, en el que la proporción de apoptosis neuronal se detecta mediante tinción con yoduro de propidio y calceína.
- 25
20. Sonda de neuroimagen que permite detectar el aumento de la concentración de P2X7 en el cerebro del paciente, que comprende un ligando que se une selectivamente al receptor P2X7 y está unido a una molécula visualizable
- 30 mediante técnicas de neuroimagen.

21. Sonda según la reivindicación 20, en la que el ligando es un agonista o antagonista del receptor P2X7 que atraviesa la barrera hematoencefálica.
- 5 22. Sonda según la reivindicación 21 en la que el ligando es el antagonista de P2X7 Brilliant Blue G (BBG).
- 23 Sonda según la reivindicación 21, en la que el ligando es el antagonista de P2X7 KN-62.
- 10 24 Sonda según la reivindicación 21, en la que el ligando es el antagonista de P2X7 decavanadato.
- 15 25. Método de obtención de neuroimágenes de un ser humano *in vivo*, usando la sonda descrita en las reivindicaciones 20-24, en el que la sonda permite detectar el aumento de P2X7 en individuos que padecen corea de Huntington .

1/7

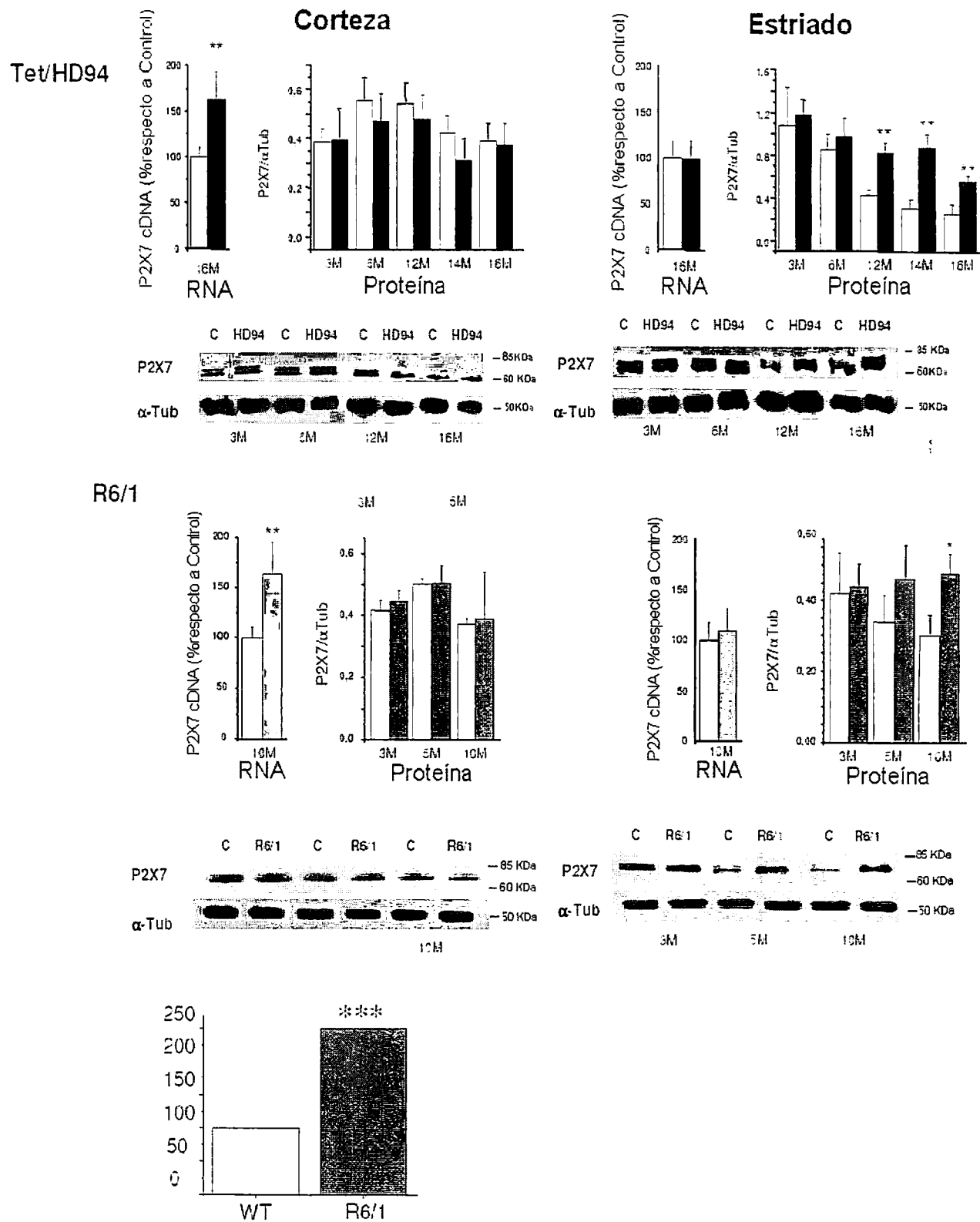


FIG. 1

2/7

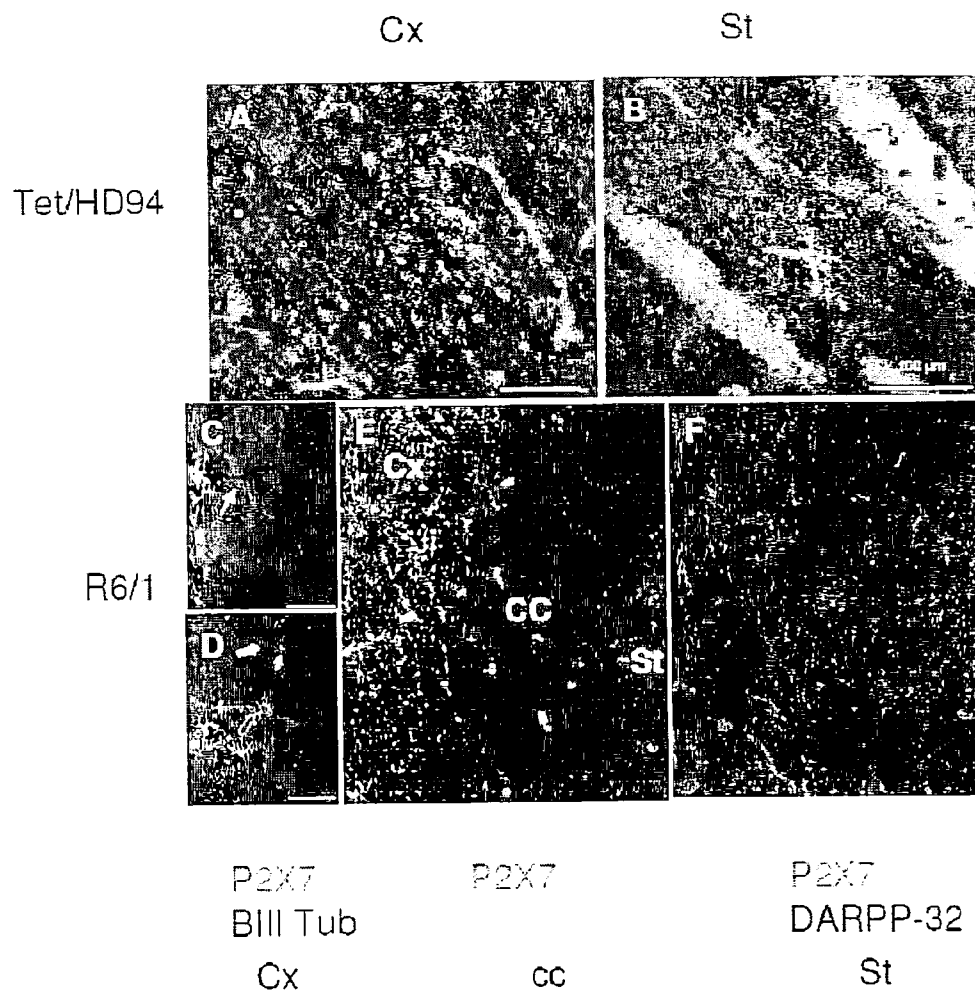


FIG. 2

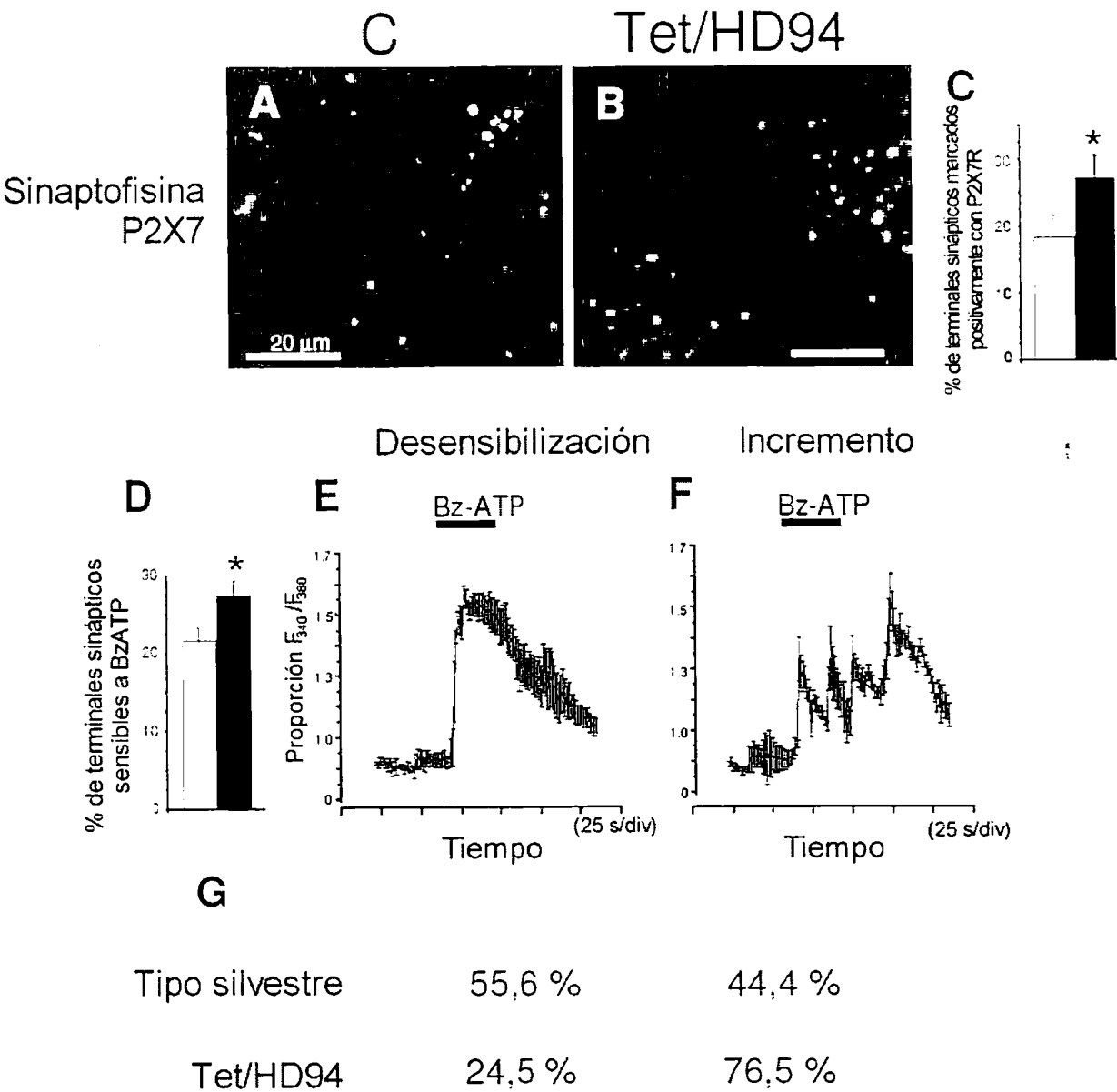


FIG. 3

4/7

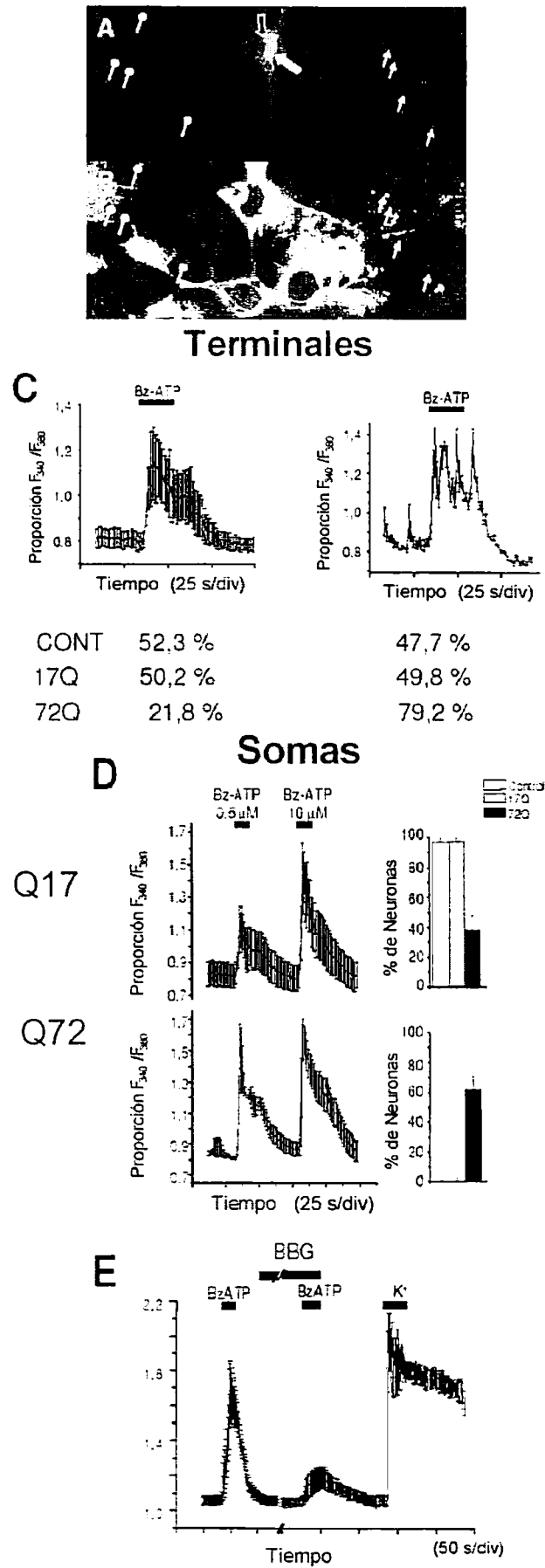


FIG. 4

5/7

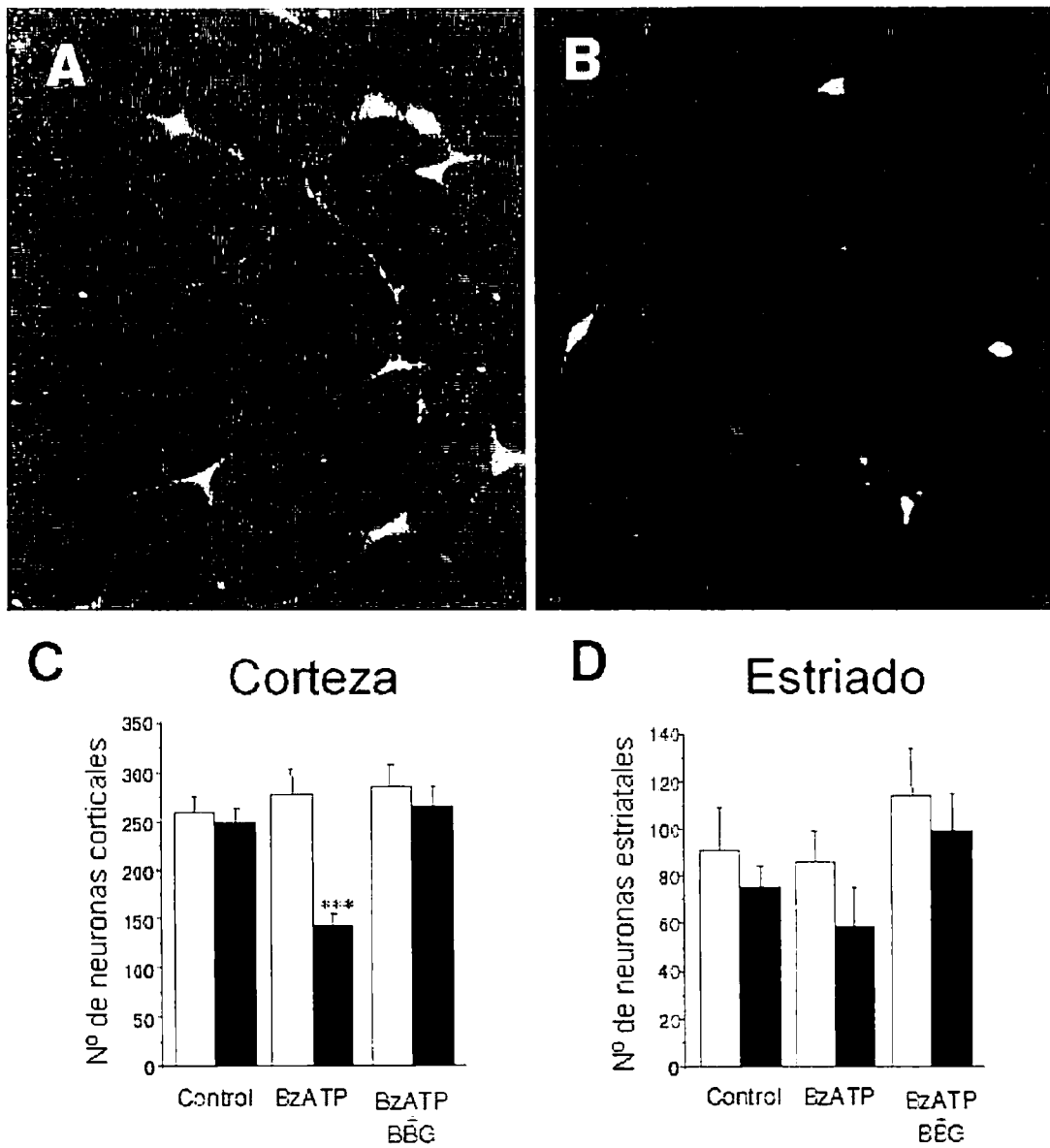
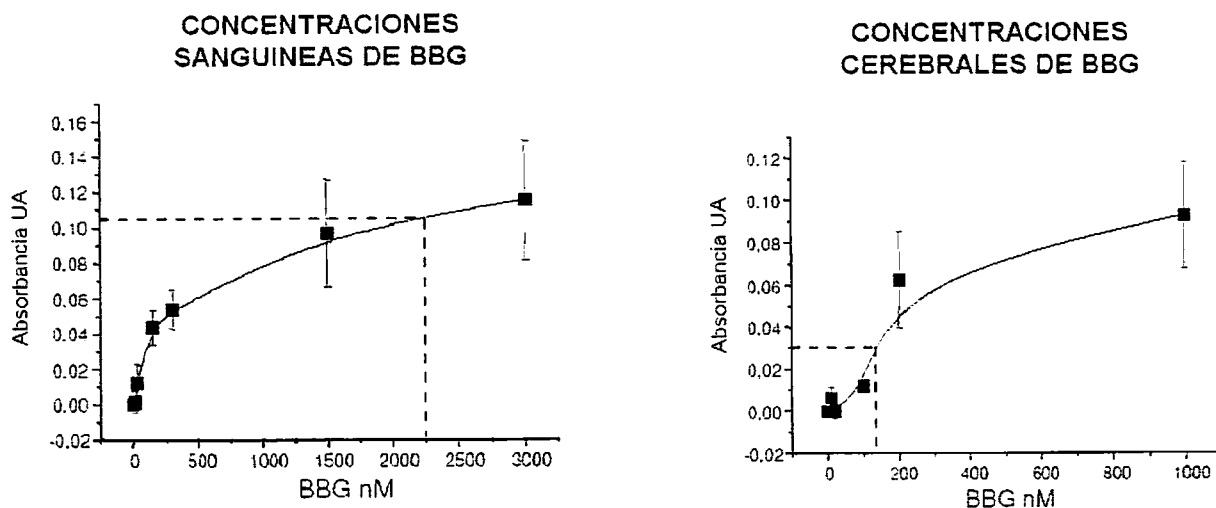


FIG. 5

6/7



Δ BBG plasma 0,10635 = 2.25 μ M

Δ BBG cerebro 0,0301 = 130 nM

TRATAMIENTO BBG IN VIVO

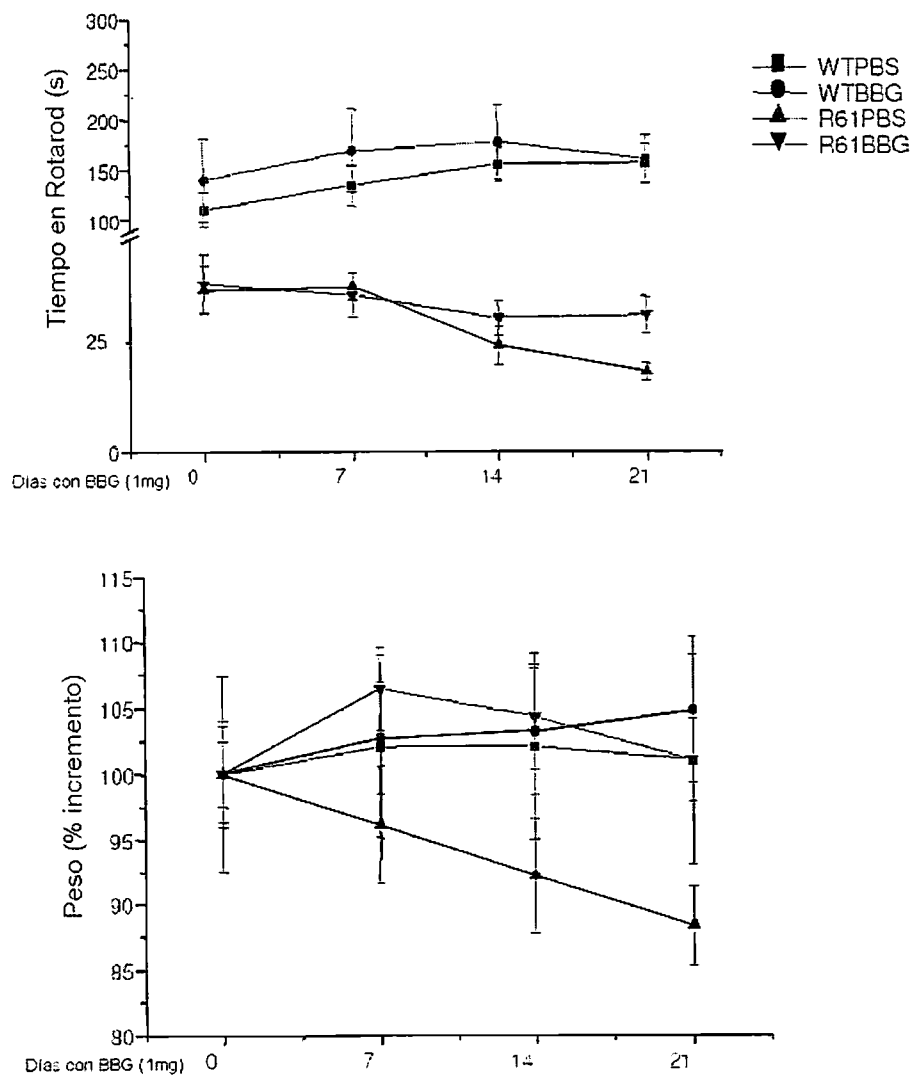


FIG. 6

7/7

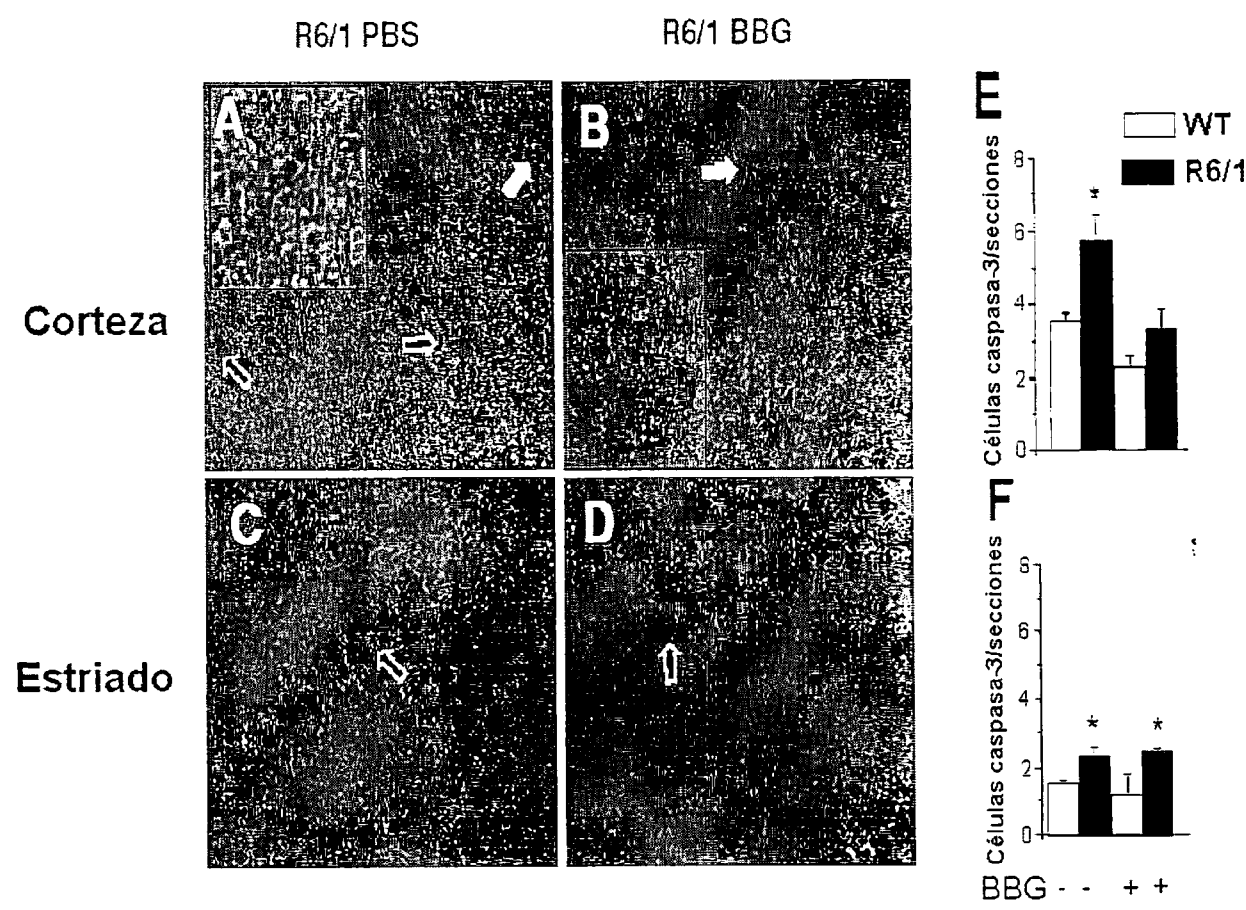


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2008/070092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q, G01N, C07H, C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LE FEUVRE R. et al. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. European Journal of Pharmacology. 2002. Vol. 447, pages 261-269, page 261, abstract; columns 1-2; page 262, column 1, paragraphs 1-2; page 263, column 1, paragraph 5 - column 2, paragraphs 1-2; page 264, column 1, paragraphs 3-4; column 2, paragraph 3; page 266, column 1, paragraphs 2-3	1-4
Y		16-19
Y	US 6133434 A (BUELL GN et al.) 17.10.2000,column 1, lines 1-11, column 4, line 66 - column 5, line 45; column 7, lines 1-44	16-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 October 2008 (02.10.2008)

Date of mailing of the international search report

(02/10/2008)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M^a D. García Grávalos

Telephone No. +34 913493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2008/070092

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

BOX II.2

The subject matter of claims 5, 9, 14-15 and 20-25 does not meet the requirements of PCT Article 6 with respect to clarity and conciseness, and hence it is not possible to carry out a meaningful search for said claims.

BOX III

The application does not meet the requirement of unity of invention, since it does not relate to a single invention or to a group of inventions that are so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1). Consequently, the International Searching Authority considers that the application contains four inventions in the following claims:

INVENTION 1:

- in vitro diagnostic and/or prognostic method for Huntington' s chorea, on the basis of the increase in expression and/or activity of the P2X7 gene in cerebrospinal fluid or peripheral blood samples (claims 1-3);
- diagnostic and/or prognostic kit for said disease (claim 4);
- screening method for detecting drugs useful for the treatment of Huntington' s chorea (claims 16-19).

INVENTION 2:

- use of the Brilliant Blue-G (BBG) compound, which is an antagonist of the P2X7 receptor, to prepare medicaments for the treatment of Huntington' s chorea, and pharmaceutically acceptable excipient (claim 6),
- indirectly administered to the central nerve system, preferably intravenously or intraperitoneally (claims 10-12);
- a dose of BBG equal to 45.5 mg/kg of body weight (claim 13).

INVENTION 3:

- use of the KN62 calmodulin compound, which is an antagonist of the P2X7 receptor, to prepare medicaments for the treatment of Huntington' s chorea, and pharmaceutically acceptable excipient (claim 7),
- indirectly administered to the central nerve system, preferably intravenously or intraperitoneally (claims 10-12).

INVENTION 4:

- use of the decavanadate compound, which is an antagonist of the P2X7 receptor, to prepare medicaments for the treatment of Huntington' s chorea, and pharmaceutically acceptable excipient (claim 8),
- indirectly administered to the central nerve system, preferably intravenously or intraperitoneally (claims 10-12).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2008/070092

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005041892 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC)12.05.2005, page 2, paragraphs 0007-0011; page 5, paragraphs 0014-0015; page 9, paragraph 0032; page 10, paragraphs 0033-0035; page 11, paragraph 0041; page 16, paragraph 0108	6-8, 10-13
X	US 20050288288 A1 (LEONARD JA et al.)29.12.2005, page 1, paragraph 0005; page 4, paragraphs 0023-0024; page 22, paragraph 0095 - page 23 paragraph 0097; page 23 paragraph 0110	6-8, 10-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2008/070092

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6133434 A	17.10.2000	US 6509163 B	21.01.2003
-----	-----	-----	-----
WO 2005041892 A	12.05.2005	US 2005164975 A	28.07.2005
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2008/070092

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2008/070092

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q, G01N, C07H, C07K, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	LE FEUVRE R. et al. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. European Journal of Pharmacology. 2002. Vol. 447, páginas 261-269, página 261, resumen; columnas 1-2; página 262, columna 1, párrafos 1-2; página 263, columna 1, párrafo 5 - columna 2, párrafos 1-2; página 264, columna 1, párrafos 3-4; columna 2, párrafo 3; página 266, columna 1, párrafos 2-3	1-4
Y		16-19
Y	US 6133434 A (BUELL GN et al.) 17.10.2000,columna 1, líneas 1-11, columna 4, línea 66 - columna 5, línea 45; columna 7, líneas 1-44	16-19

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

02 Octubre 2008 (02.10.2008)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

02 de Octubre de 2008 (02/10/2008)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

Mª D. García Grávalos

Nº de teléfono +34 913493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2008/070092

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°s: 5, 9, 14-15, 20-25
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones 5, 9, 14-15, 20-25 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT por lo que no es posible realizar una búsqueda significativa basada en esas reivindicaciones.
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

La solicitud de patente no satisface la exigencia de unidad de invención, puesto que no está relacionada con una sola invención o un grupo de invenciones vinculadas entre sí de tal manera que formen un solo concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT. En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay cuatro invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones:

(Ver hoja adicional)

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2008/070092

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 2005041892 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC)12.05.2005, página 2, párrafos 0007-0011; página 5, párrafos 0014-0015; página 9, párrafo 0032; página 10, párrafos 0033-0035; página 11, párrafo 0041; página 16, párrafo 0108	6-8, 10-13
X	US 20050288288 A1 (LEONARD JA et al.)29.12.2005, página 1, párrafo 0005; página 4, párrafos 0023-0024; página 22, párrafo 0095 - página 23 párrafo 0097; página 23 párrafo 0110	6-8, 10-13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2008/070092

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 6133434 A	17.10.2000	US 6509163 B	21.01.2003
-----	-----	-----	-----
WO 2005041892 A	12.05.2005	US 2005164975 A	28.07.2005
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

La solicitud de patente no satisface la exigencia de unidad de invención, puesto que no está relacionada con una sola invención o un grupo de invenciones vinculadas entre sí de tal manera que formen un solo concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT. En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay cuatro invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones:

Invención 1ª:

- método in vitro de diagnóstico y/o pronóstico de la corea de Huntington, basado en el incremento de la expresión y/o actividad del gen P2X7 en muestras de líquido cefalorraquídeo o de sangre periférica (reivindicaciones 1-3)
- kit de diagnóstico y/o pronóstico de esta enfermedad (reivindicación 4)
- método de screening para detección fármacos útiles para el tratamiento de la corea de Huntington (reivindicaciones 16-19)

Invención 2ª:

- uso del compuesto Brilliant Blue-G (BBG), antagonista del receptor P2X7, para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la corea de Huntington y vehículo farmacéuticamente aceptable (reivindicación 6)
- administrado por vía no directa al SNC, preferentemente por vía intravenosa o intraperitoneal (reivindicaciones 10-12)
- dosis de BBG de 45,5 mg/Kg. peso corporal (reivindicación 13)

Invención 3ª:

- uso del compuesto calmodulina KN62, antagonista del receptor P2X7, para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la corea de Huntington y vehículo farmacéuticamente aceptable (reivindicación 7)
- administrado por vía no directa al SNC, preferentemente por vía intravenosa o intraperitoneal (reivindicaciones 10-12)

Invención 4ª:

- uso del compuesto decavanadato, antagonista del receptor P2X7, para la elaboración de medicamentos destinados al tratamiento de la corea de Huntington y vehículo farmacéuticamente aceptable (reivindicación 8)
- administrado por vía no directa al SNC, preferentemente por vía intravenosa o intraperitoneal (reivindicaciones 10-12)