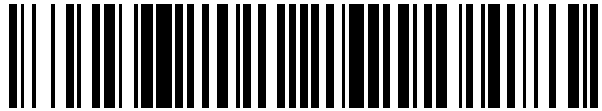


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 006**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2010 E 10781677 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2502079**

54 Título: **Nuevas herramientas de diagnóstico para la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth**

30 Prioridad:

20.11.2009 EP 09306121

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

23.03.2015

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)
11 Rue des Peupliers
92130 Issy-les-Moulineaux , FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;
CHUMAKOV, ILYA;
GUERASSIMENKO, OXANA y
NABIROCHKIN, SERGUEI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 532 006 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas herramientas de diagnóstico para la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

La presente invención se refiere en general al campo de la medicina. La presente invención se refiere en particular a métodos de detección de la predisposición o de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) y trastornos relacionados. Más específicamente, la invención se refiere al desarrollo, validación y aplicación de nuevos biomarcadores, que se pueden usar para detectar la presencia o el riesgo de la enfermedad de CMT y trastornos relacionados. En particular, la presente invención se refiere a biomarcadores metabolitos, lípidos, hidratos de carbono y proteínicos que se pueden medir en los fluidos corporales biológicos y extractos de biopsias fácilmente disponibles, que se pueden usar para ayudar a detectar, predecir el tratamiento con fármacos y seguir este tratamiento de trastornos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de CMT. La presente invención también se refiere a métodos para la identificación de subtipos de enfermedad de CMT, evaluando la sensibilidad a los tratamientos y la eficacia de los tratamientos en sujetos que tienen la enfermedad de CMT o un trastorno relacionado.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ("CMT") es una polineuropatía periférica genética rara. Afectando a aproximadamente 1 de 2.500 individuos, esta enfermedad es el trastorno hereditario más común del sistema nervioso periférico. Su inicio ocurre típicamente durante la primera o segunda década de vida, aunque se puede detectar en la infancia. La evolución de la enfermedad es crónica con degeneración neuromuscular gradual. La enfermedad es incapacitante con casos en los que va acompañada de dolor neurológico y discapacidad muscular extrema. La enfermedad de CMT es una de las patologías genéticas mejor estudiadas con aproximadamente 30.000 casos en Francia. Aunque la mayoría de los pacientes de la enfermedad de CMT albergan un fragmento duplicado del cromosoma 17 que contiene un gen de mielina: PMP22 (forma CMT1A), se han implicado más de dos docenas de genes en diferentes formas de la enfermedad de CMT. Por consiguiente, aunque es de origen monogénico, esta patología manifiesta heterogeneidad clínica debido a posibles genes moduladores. Los genes mutados en pacientes de CMT se agrupan alrededor de rutas moleculares estrechamente conectadas, que afectan a la diferenciación de células de Schwann o neuronas o cambian la interacción de estas células en nervios periféricos.

Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad de CMT se basa en criterios clínicos y datos de electrofisiología que distinguen solo algunos subtipos de esta enfermedad. La clasificación más precisa se basa en el análisis de mutaciones en genes relevantes si se conocen.

Las mutaciones múltiples que conducen a la enfermedad de CMT ocurren en más de 25 genes diferentes. No están identificadas para todos los casos de enfermedad de CMT y no se pueden clasificar exhaustivamente por tipificación genética (Suter y Scherer, 2003; Berger et al., 2006; Niemann et al, 2006; Nave et al., 2007). Además, se encuentra heterogeneidad clínica y no solo es importante para la caracterización clínica sino que proporciona mayor implicación de la atención integral/tratamiento específico para formas funcionalmente diferentes (Sereda et al., 2003; Passage et al, 2004; Sahenk et al, 2005; Young et al., 2008).

Por el momento, no existe tratamiento con fármacos para esta enfermedad pero se han descrito algunos procedimientos de atención integral clínica (Grandis y Shy, 2005; Kapur et al, 2007; Weiner et al, 2008) y se están realizando ensayos clínicos con ácido ascórbico para el tratamiento de la forma CMT1A de esta enfermedad (Burns et al., 2009).

La progresión de esta enfermedad medida por la puntuación de la neuropatía CMT (CMTNS) es más bien lento y necesita ensayos clínicos largos con cientos de pacientes.

Se han propuesto recientemente los niveles de proteína y ARN de PMP22 como marcadores biológicos para el seguimiento farmacodinámico de dichos ensayos como un sustituto para el criterio de valoración de la CMTNS en un caso de CMT1A (Li et al, 2005; Meyer zu Horste et al, 2007). Este análisis también es tedioso y requiere procedimiento invasivo. Además la expresión de PMP22 en dichas biopsias no está correlacionada con la gravedad de la enfermedad (Katona et al., 2009).

Patrocolo et al., 2009 describen niveles de colesterol total y triglicéridos elevados en un paciente con neuropatía sensitivo-motora hereditaria autosómica dominante con implicación proximal dominante (HMSN-P).

Yao et al., 1978, estudian la distribución de fracciones específicas de ésteres de colesterilo en pacientes que tienen neuropatías hereditarias. Este documento no proporciona información relacionada con los niveles de colesterol libre o colesterol LDL.

Swartz et al., 1988, se refiere a la inmunogenicidad del colesterol y producción de anticuerpos que fijan el complemento de IgM monoclonal al colesterol.

Niebroj-Dobosz et al., 1976, se refiere a patrones de diferentes fracciones lipídicas en pacientes neuropáticos (tales como lípidos totales, fosfolípidos totales, ácidos grasos libres o ésteres de colesterol). Los autores concluyen que no hay correlación entre el tipo de cambios del patrón lipídico y el síndrome clínico.

La disponibilidad de los marcadores biológicos fácilmente detectables permitiría el diagnóstico rápido de formas funcionalmente relevantes de las enfermedades de CMT y relacionadas, el ensayo clínico de la eficacia de nuevos medicamentos y el control de la respuesta individual de pacientes al tratamiento con fármacos y atención integral de la enfermedad.

- 5 Patroclo et al. (2009, *Arq. Neuropsiquiatr.*, Vol. 67, pág. 892-896) describe un paciente con HMSN en el que el colesterol total era elevado.

Dong et al. (5.10.2007, *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS*, vol. 858, páginas 239 - 246) describe métodos de determinación del colesterol libre en muestras biológicas.

Resumen de la invención

- 10 La invención en su forma más amplia se define por las reivindicaciones independientes 1, 2, 9, 13:

1. Un método in vitro de detección de la presencia o el riesgo de enfermedad de CMT en un mamífero, o para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad de CMT, comprendiendo el método determinar la cantidad (relativa) o nivel de colesterol libre en una muestra de sangre, plasma y/o suero del mamífero, en donde una cantidad o nivel menor es indicativo de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de dicha enfermedad.

- 15 2. Un método in vitro para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la enfermedad de CMT en un mamífero, comprendiendo el método determinar en una muestra de sangre, plasma y/o suero del mamífero, durante el tratamiento, la cantidad (relativa) o nivel de colesterol libre, y comparar dicha cantidad o nivel con un nivel de colesterol libre determinado antes del tratamiento o en una etapa anterior del tratamiento en dicho mamífero, en donde un aumento es indicativo de la eficacia del tratamiento.

- 20 9. Uso del colesterol libre en un método in vitro de detección de la predisposición o de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de CMT y/o en un método de evaluación del tratamiento de la enfermedad de CMT en un sujeto mamífero.

- 25 13. Uso in vitro de un kit que comprende al menos un compuesto que se une o reacciona con el colesterol libre en el diagnóstico, pronóstico y/o para evaluar la eficacia de un tratamiento o seguir la evolución de la enfermedad de CMT1A.

Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 3-8 y 10-12.

El biomarcador usado en la invención es o comprende al menos colesterol libre.

Descripción detallada de la invención

- 30 La presente invención proporciona nuevos métodos de diagnóstico y herramientas para la CMT y otros trastornos relacionados.

Dentro del contexto de esta invención, la enfermedad de CMT incluye CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E, CMT2F, CMT2I, CMT2J, CMT2-P0, CMT2K, CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4C, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, CMT4J u otras formas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. En la realización más preferida, la enfermedad de CMT es CMT1A.

- 35 El propósito de la presente invención es proporcionar nuevos biomarcadores de fluidos biológicos para el diagnóstico o control de la CMT, y para evaluar la sensibilidad de los sujetos o la eficacia de tratamientos terapéuticos en sujetos que tienen la enfermedad de CMT o un trastorno relacionado. Por lo tanto, según una realización preferida, el método de la invención comprende la detección de la presencia o ausencia o cantidad (relativa) de metabolitos en fluidos corporales como se reivindica.

- 40 Un objeto de la invención reside en la detección (in vitro o ex vivo) de la presencia o del riesgo de desarrollar CMT en un mamífero, que comprende la determinación de la presencia, en una muestra biológica del mamífero, de una alteración en uno o más biomarcadores de fluidos corporales seleccionados, como se reivindica.

- 45 Otro objeto de la invención reside en un método para detectar (in vitro o ex vivo) la presencia o el riesgo de desarrollar CMT en un mamífero, que comprende la determinación de la presencia, en una muestra biológica del mamífero, de una alteración del nivel en uno o más marcadores, siendo indicativa la presencia de dicha alteración de la presencia de o del riesgo de desarrollar la enfermedad de CMT en dicho mamífero, como se reivindica.

- 50 En una realización preferida, un método de la invención es un método in vitro para detectar la presencia o riesgo de enfermedad de CMT en un mamífero, o para ayudar en el diagnóstico, pronóstico o subclasificación de la enfermedad de CMT, o ayudar en la etapa de estratificación de pacientes en ensayos clínicos, comprendiendo el método determinar la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de un biomarcador diana en una muestra biológica de fluido del sujeto, en donde dicha cantidad o alteración es indicativa de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de dicha enfermedad, y en donde dicho biomarcador es el colesterol libre.

5 En el contexto de la presente invención, el término “alteración” de un biomarcador diana puede designar un aumento o una disminución de la cantidad de biomarcador diana en una muestra biológica de fluido del sujeto, en comparación con una muestra de control o valor de referencia. Típicamente, el término “disminución” en relación con un nivel de biomarcador, indica una reducción de la concentración o nivel del biomarcador en una muestra biológica del sujeto de al menos 5% o 10% o 15% en comparación con una muestra de control o valor de referencia o medio. Las disminuciones pueden ser más sustanciales, tal como una reducción en al menos 20% o 30% o 40% o incluso más. Igualmente, el término “aumento” en relación con el nivel de biomarcador, indica un aumento de la concentración o nivel del biomarcador en una muestra biológica del sujeto de al menos 5% o 10% o 15% en comparación con una muestra de control o valor de referencia o medio. Los aumentos pueden ser más sustanciales, tal como aumentos de al menos 20% o 30% o 40%, o incluso más.

10 Los tipos preferidos de alteraciones se describen a continuación para cada biomarcador en la tabla A. Esta tabla indica, para cada biomarcador, si un aumento o una disminución es indicativa de enfermedad de CMT en sujetos humanos. También se proporciona una distinción entre pacientes masculinos y femeninos. Los biomarcadores que no están en las reivindicaciones están solo por referencia.

15 Tabla A: Aumento (+) o disminución (-) de una concentración de biomarcador en pacientes de CMT

| | total | mujer | hombre |
|--------------------------|-------|-------|--------|
| Adrenalina | | - | |
| Alanina | - | - | |
| Ácido alfa-aminobutírico | | - | |
| Citrullina | | | - |
| Cistina | - | | |
| Dopamina | + | | |
| Colesterol libre | - | - | - |
| Glutamina | - | - | |
| Hidroxiprolina | - | - | |
| Hierro | + | | |
| Colesterol LDL | | | - |
| LTB4 | | - | |
| Lisina | | - | |
| Metionina | | | + |
| Prolina | | | + |
| Serotonina | + | | |
| T4 | - | | - |
| Testosterona | | | + |
| Treonina | - | | |
| Triptófano | + | | + |
| Tirosina | | - | |

Los ejemplos específicos de alteraciones de cada biomarcador(es) diana según la invención, se muestran en las tablas 1-4 de la parte experimental.

20 Otra realización de la presente invención comprende calificar y subclasificar una enfermedad de CMT, por ejemplo, CMT1A, CMT1B, CMT1C, CMT1D, CMT1X, CMT2A, CMT2B, CMT2D, CMT2E CMT2F, CMT2I, CMT2J, CMT2-P0, CMT2K, CMT4A, CMT4B1, CMT4B2, CMT4C, CMT4D, CMT4F, CMT4, AR-CMT2A, CMT4J u otras formas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o trastornos relacionados con CMT en un sujeto, que comprende medir conjuntos de biomarcadores complejos de la presente invención.

25 En otros aspectos, los métodos de la presente invención comprenden además la etapa de asistencia del tratamiento individual. Por ejemplo, si la medición del conjunto de biomarcadores se correlaciona con la presencia del subtipo clínico de enfermedad de CMT, entonces el tratamiento de asistencia comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos que corresponda para ralentizar o invertir la progresión de la enfermedad. Se pueden comparar otras mediciones con las mediciones previas, o la referencia para controlar la progresión de la enfermedad.

30 En otro aspecto de la invención, el método comprende además medir el biomarcador después de que el tratamiento ha empezado, para controlar la progresión de la enfermedad.

En otra realización, el método de la presente invención comprende controlar la progresión de una enfermedad de CMT, preferiblemente CMT1A, y medir un nivel de los conjuntos de biomarcadores de la presente invención.

35 Otro objeto de la invención se refiere a un método para evaluar o seguir la respuesta a un tratamiento para la enfermedad de CMT en un sujeto, comprendiendo el método una etapa de medir el nivel de uno o más marcadores,

la presencia de dicha alteración antes y/o durante el tratamiento, y una comparación del nivel así medido con el medido en una etapa anterior del tratamiento o antes de tratamiento.

5 Otro objeto de la invención se refiere a un método para evaluar o seguir la respuesta a un tratamiento de CMT en un sujeto, comprendiendo el método una etapa de medir la cantidad de uno o más biomarcadores de fluidos corporales seleccionados, antes y/o durante el tratamiento, y una comparación de la cantidad así medida con la medida en una etapa anterior del tratamiento o antes del tratamiento.

10 El nivel del(de los) biomarcador(es), medido según el método de la presente invención, se correlaciona con la enfermedad neurológica, preferiblemente la enfermedad de CMT. En realizaciones preferidas, esto se puede llevar a cabo comparando la cantidad medida con un valor de referencia para el(los) biomarcador(es). El valor de referencia se puede obtener midiendo una cantidad del(de los) biomarcador(es) en sujetos de control de edad correspondiente que no están afectados por la enfermedad o no tienen la enfermedad.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un método in vitro para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la enfermedad de CMT en un mamífero, comprendiendo el método determinar en una muestra de fluido biológico del sujeto, durante el tratamiento, la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de un biomarcador diana, seleccionado de lípidos, aminoácidos, hormonas esteroideas, metales, metabolitos del ácido araquidónico, aminos biogénicas, hidratos de carbono, péptidos, nucleósidos y nucleótidos, y comparar dicha cantidad o alteración con un nivel de dicho biomarcador determinado antes de tratamiento o en una etapa anterior del tratamiento en dicho mamífero, en donde una desviación es indicativa de la eficacia del tratamiento.

20 Otra realización de la presente invención comprende controlar la eficacia de un método de tratamiento de una enfermedad de CMT, que comprende medir un nivel de un conjunto complejo de biomarcadores de la presente invención. En realizaciones, la eficacia del tratamiento se mide controlando los niveles del biomarcador en el sujeto comparado con una referencia, y/o comparado con otros ensayos previos del sujeto o con una etapa anterior del tratamiento/enfermedad en el sujeto.

25 Otro objeto de la invención es refiere a una mejora de los métodos de tratamiento de la enfermedad de CMT o trastornos relacionados, consistiendo la mejora en medir el nivel de expresión de uno o, preferiblemente, varios biomarcadores antes y/o durante el tratamiento. La medición del nivel de expresión del biomarcador, permite adaptar el tratamiento según la evolución de la patología y/o la eficacia del tratamiento.

30 En una realización preferida, el diagnóstico o control de la enfermedad de CMT y trastornos relacionados, comprende la determinación de la cantidad (o de la presencia o de la ausencia), en una muestra biológica del mamífero, de dicho(s) biomarcador(es) de fluidos corporales seleccionados de lípidos, aminoácidos, hormonas esteroideas, hidratos de carbono, metales, metabolitos del ácido araquidónico, aminos biogénicas, nucleósidos y nucleótidos, péptidos pequeños y proteínas.

35 En una realización preferida, el método de la invención comprende la determinación de la cantidad (o de la presencia o de la ausencia) en una muestra de fluido biológico del mamífero, de uno o más biomarcadores de fluidos corporales, en donde dichos biomarcadores de fluidos corporales se seleccionan de:

- lípidos, preferiblemente colesterol y sus metabolitos, incluyendo deshidroepiandrosterona (DHEA), e incluyendo más preferiblemente colesterol libre o colesterol LDL, o su cantidad en relación con el colesterol total,
- aminoácido o sus derivados, preferiblemente incluyendo alanina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, metionina, prolina, treonina, triptófano y tirosina, y/o arginina, asparaginas, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, 1-metil-histidina, isoleucina, leucina, ornitina, fenilalanina, serina, taurina y valina,
- hormonas esteroideas y sus precursores o derivados, incluyendo preferiblemente las hormonas tiroideas T3 y T4, testosterona, 5 α -dihidroprogesterona, alopregnanolona y corticoesterona,
- metales, preferiblemente hierro y cinc,
- metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo preferiblemente leucotrienos (p. ej., LTB4/5), y prostaglandinas PGE2, prostaciclina PGI2 y tromboxanos TXA2 y TXB2,
- aminos biogénicas, incluyendo preferiblemente adrenalina, dopamina y serotonina,
- hidratos de carbono, preferiblemente sorbitol,
- nucleótidos, preferiblemente monofosfato 3',5'-cíclico de adenosina (cAMP), y
- cualquier combinación de los mismos.

50 Más preferiblemente, dichos biomarcadores de fluidos corporales se seleccionan de:

- lípidos, preferiblemente colesterol y sus metabolitos, incluyendo colesterol libre o colesterol LDL, o su cantidad en

relación con el colesterol total,

- aminoácido o sus derivados, incluyendo preferiblemente alanina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, metionina, prolina, treonina, triptófano y tirosina,

- hormonas esteroideas, incluyendo preferiblemente la hormona tiroidea T4 y testosterona,

5 - metales, preferiblemente hierro,

- metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo preferiblemente leucotrienos (p. ej., LTB4/5),

- aminas biogénicas, incluyendo preferiblemente adrenalina, dopamina y serotonina, y

- cualquier combinación de los mismos.

10 En otra realización preferida, el método de la invención comprende la determinación de la cantidad (o de la presencia o de la ausencia) en una muestra de fluido biológico del mamífero, de uno o más biomarcadores de fluidos corporales, en donde dichos biomarcadores de fluidos corporales se seleccionan de:

- metabolitos del colesterol, incluyendo preferiblemente un éster de colesterol, 27-hidroxicolesterol, pregnenolona, sulfato de pregnenolona, y sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEA),

15 - hormonas esteroideas y sus precursores o derivados, incluyendo preferiblemente cortisol, cortisona, aldosterona, androstanodiol, androstenodiona, estradiol y estrona,

- metabolitos del ácido araquidónico, incluyendo preferiblemente las prostaglandinas PGD2 y PGF2 α , ácido 12-hidroxicosatótrico (12-HETE) y lipoxinas (LXA4 y LXB4),

- inositol y sus derivados, incluyendo preferiblemente monofosfatos de inositol, fosfatidilinositol-3-fosfato [PI3P] y fosfatidilinositol-(3,5)-bi-fosfato [PI(4,5)P2],

20 - esfingolípidos o fosfolípidos o sus derivados, incluyendo preferiblemente ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico y esfingosina-1-fosfato (S1P),

- endocannabinoides, incluyendo preferiblemente araquidonoiletanolamina, 2-araquidonoil-glicerol, éter de 2-araquidonoilo y glicerilo, N-araquidonoil-dopamina y virodamina, y

- cualquier combinación de los mismos.

25 En otra realización preferida, un método de la invención comprende determinar en una muestra de fluido biológico del sujeto, la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de un biomarcador seleccionado de colesterol, alanina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, metionina, prolina, treonina, triptófano, tirosina, hormona tiroidea T4, testosterona, hierro, LTB4, adrenalina, dopamina y serotonina, así como cualquier combinación de los mismos.

30 El biomarcador usado en la invención es o comprende al menos colesterol libre, y opcionalmente colesterol LDL y/o su cantidad en relación con el colesterol total. En el contexto de la presente invención, la expresión "colesterol LDL" indica todas las formas de colesterol contenidas en el LDL, incluyendo el colesterol no esterificado.

Como se muestra en la parte experimental, los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que el nivel de colesterol libre o el nivel de colesterol LDL disminuye en animales enfermos.

35 Por lo tanto, el método de la invención comprende determinar una disminución del colesterol libre y opcionalmente el colesterol LDL y/o su cantidad con respecto al colesterol total, en una muestra de fluido biológico del sujeto, en donde dicha disminución del colesterol libre y/o colesterol LDL y/o su cantidad con respecto al colesterol total, es indicativa de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de la enfermedad.

40 En una realización particular, el método de la invención comprende determinar en una muestra de fluido biológico del sujeto, una disminución de la relación de colesterol libre a colesterol total.

En otra realización particular, el método de la invención comprende determinar una disminución de la relación de colesterol LDL a colesterol total.

Como se ha indicado, el método puede comprender la determinación de varios biomarcadores, p. ej., 2, 3, 4, 5 o incluso más. Estos se pueden determinar de forma simultánea o secuencial en una muestra de fluido biológico.

45 En una variante particular, se determina la presencia o la ausencia o la cantidad (relativa) de al menos tres biomarcadores de forma simultánea o secuencial en una muestra de fluido biológico del sujeto mamífero.

En otra realización, el método de la invención comprende la determinación de la presencia o la ausencia o la

cantidad (relativa), en una muestra biológica del mamífero, de al menos cuatro biomarcadores distintos.

En otra realización, los conjuntos de biomarcadores usados en los métodos de la invención se seleccionan de la tabla 5.

En una realización preferida, los conjuntos de biomarcadores comprenden:

- 5 - colesterol libre y alanina;
- colesterol libre y T4 y triptófano e hidroxiprolina;
- colesterol libre e hidroxiprolina;
- colesterol libre y T4 y triptófano;
- colesterol libre y T4 y serotonina;
- 10 - colesterol libre y T4 e hidroxiprolina;
- colesterol libre y T4; o
- colesterol libre y serotonina.

15 Como se ilustra en los ejemplos, dichos conjuntos de biomarcadores son particularmente eficaces para predecir la presencia de la enfermedad de CMT. En particular, los resultados representados en los ejemplos muestran rendimientos de 100% en ensayos de entrenamiento y entre 78% y 100% en ensayos de validación para estos conjuntos de biomarcadores.

20 El nivel de dicho(s) biomarcador(es) se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica, tal como, sin limitación, métodos inmunológicos, métodos bioquímicos, métodos cromatográficos, métodos enzimáticos, ensayos basados en células, ensayos in vitro, etc. Los ejemplos de métodos adecuados se describen en la sección experimental. El nivel del(de los) biomarcador(es) determinado se puede comparar con un valor de referencia, un control o un valor medio, en donde una desviación de dicho valor es indicativo de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de la enfermedad de CMT. La desviación típicamente debe ser superior a 5%, más preferiblemente a 10%, incluso más preferiblemente a 15%.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a un uso de uno o más biomarcadores seleccionados de colesterol, alanina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, metionina, prolina, treonina, triptófano, tirosina, hormona tiroidea T4, testosterona, hierro, LTB4, adrenalina, dopamina y serotonina, en un método de detección de la predisposición a o de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de CMT en un sujeto mamífero.

30 En una realización particular, los biomarcadores anteriores se usan en un método de detección de la predisposición, diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de CMT, o de ayuda en la etapa de estratificación de pacientes en ensayos clínicos, junto con al menos un ensayo de diagnóstico o marcador adicional para la enfermedad de CMT, seleccionado preferiblemente de ensayo o marcador proteínico, fisiológico, neurofisiológico, genético, de comportamiento, electrofisiológico, clínico y fenotípico.

35 En otra realización particular, el nivel de dicho(s) biomarcador(es) usado(s) en un método de detección de la predisposición a, de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de CMT, o de ayuda en la etapa de estratificación de pacientes en ensayos clínicos, se compara con un valor de referencia, en donde la desviación de dicho valor es indicativa de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de la enfermedad de CMT.

40 En una realización particular, cualquiera de los biomarcadores de fluidos corporales mencionados antes, o sus combinaciones, se pueden usar junto con al menos un ensayo de diagnóstico o marcador adicional para la enfermedad de CMT, seleccionado preferiblemente de ensayo o marcador de ácidos nucleicos, proteínico, fisiológico, neurofisiológico, genético, de comportamiento, electrofisiológico, clínico y fenotípico.

45 Dichos biomarcadores proteínicos, detectables en fluidos corporales, que se pueden usar para el diagnóstico de la enfermedad de CMT o para el control de la progresión de la enfermedad de CMT, o para el control de la eficacia de fármacos relevantes para la enfermedad de CMT, incluyen el neurofilamento NEFH, receptor del factor de crecimiento nervioso p75/LNGFR, receptor NTRK3, factor de transcripción SCIP, ciclina D1, proteína de membrana asociada a lisosomas LAMP1, homólogo 7 relacionado con autofagia ATG7, subunidades del activador de proteosoma PSME1/2, subunidad de proteosoma PSMA1, integrinas ITGB1/4, factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina 1/2/5 (IGFBP1/2/5), vitronectina (VTN), tenascinas (TNC/R/XB), canal de sodio regulado por voltaje SCN10A, canal de potasio regulado por voltaje KCNC1, aldosa reductasas incluyendo AKR1B1, sorbitol deshidrogenasa (SORD), inositol(mio)-1(o 4)-monofosfatasas IMPA1/2, factor de ADP-ribosilación 6 (ARF6), calnexina (CANX), factores de crecimiento FGF2, PDGFA/B/C, VEGFA/B/C y TGFB1/2, neuregulinas incluyendo NRG1, metalopeptidasa de matriz 2/9, activadores del plasminógeno tisular y tipo uroquinasa PLAT y PLAU, proteína quimioattractora de monocitos-1 (CCL2), factor

inhibidor de leucemia (LLF), interleuquina 6, transferrina, y opiáceos endógenos POMC, PENK y PDYN así como péptidos más pequeños y otros derivados producidos por el metabolismo de las moléculas mencionadas antes.

5 Los biomarcadores proteínicos adicionales, útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) o para el control de la progresión de la enfermedad de CMT, o para el control de la eficacia de fármacos relevantes para la enfermedad de CMT, se pueden seleccionar de la proteína de mielina periférica 22 PMP22, del factor neutrófico ciliar CNTF, ácido graso elongasa ELOV16, glicoproteína GPC3, miosinas MYO1B/1G, fosfoproteína enriquecida en astrocitos PEA15, proteínas de unión a calcio S100A3/4, troponinas TNNT1/3 y ferritina FTH1, así como péptidos más pequeños y otros derivados producidos por su metabolismo.

10 Biomarcadores proteínicos adicionales, detectables en fluidos corporales y útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth o para el control de la progresión de la enfermedad de CMT, o para el control de la eficacia de fármacos relevantes para la enfermedad de CMT, se pueden seleccionar de proteínas o péptidos más pequeños y sus derivados, codificados por los genes ATP1A1, FGL2, ACAT2, ACTN2, AK1, ANK3, ANXA1, APOD, CD151, CD24A, CD9, CD99, CETN2, CHN1, CLIC4, COL1A1/2, COL2A1, COL3A1, COL4A1, CRYAB, CTSC, CYB5B, CYB561, DEAF1, EMID1, EPB4.1L2, EZR, FASN, FBLN2, FDFT1, FHLI, FOS, GAPD, GATM, HBA1, HBB, IGF2, ITIH5, KIT, LGALS1, LPL, LXN, MAPK3, MFGE8, MGLL, MMP12, MRAS, MSLN, MTAP1B, NECL1, NPR3, ODF2, OGN, OLFM1, PCOLCE, PMM1, PROS1, PYGM, RAB2, RAP1GDS1, SERPINE2, SH3GL3, SIRT2, SPP1, TPM1/2, TUBA2 y UCHL1.

15 Los grupos anteriores de genes (o las proteínas o ligandos correspondientes) representan biomarcadores valiosos que se pueden usar, solos o en diferentes combinaciones, para el diagnóstico de la enfermedad de CMT o trastornos relacionados.

20 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de un kit como se reivindica, que comprende un soporte sólido que comprende al menos un agente de captura unido al mismo, en donde el agente de captura se une o reacciona con uno o más componentes del complejo de proteínas biomarcadoras de la presente invención.

25 En una realización preferida, el kit de la invención comprende un soporte sólido que comprende al menos un agente de captura unido al mismo, en donde el agente de captura se une o reacciona con al menos un biomarcador seleccionado de colesterol, alanina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, metionina, prolina, treonina, triptófano, tirosina, hormona tiroidea T4, testosterona, hierro, LTB4, adrenalina, dopamina y serotonina. En una realización preferida, el kit de la invención comprende al menos un compuesto que se une a o reacciona con al menos un biomarcador seleccionado de colesterol, alanina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, lisina, metionina, prolina, treonina, triptófano, tirosina, hormona tiroidea T4, testosterona, hierro, LTB4, adrenalina, dopamina y serotonina, para el diagnóstico, pronóstico y/o para evaluar la eficacia de un tratamiento o seguir la evolución de la enfermedad de CMT1A.

30 El método de la invención es aplicable a cualquier muestra biológica del mamífero que se va a ensayar, en particular cualquier muestra que comprende metabolitos. Los ejemplos de dichas muestras incluyen sangre, plasma, suero, saliva, orina, heces, biopsia tisular, etc. La muestra se puede obtener por cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo por recolección usando, p. ej., técnicas no invasivas, o de colecciones o bancos de muestras, etc. La muestra además se puede tratar previamente para facilitar la accesibilidad de las moléculas diana, por ejemplo, por lisis (mecánica, química, enzimática, etc.), purificación, centrifugación, separación, etc.

La invención es aplicable a cualquier mamífero, preferiblemente a un ser humano.

40 Se describirán aspectos y ventajas adicionales de esta invención en la siguiente sección experimental, que debe considerarse solo ilustrativa.

Ejemplos

I. Identificación de nuevos marcadores y cuantificación de biomarcadores

45 La invención describe biomarcadores de fluidos corporales útiles para el diagnóstico, pronóstico y/o para evaluar la eficacia de un tratamiento o seguir la evolución de la enfermedad de CMT.

I.1 Modelo de rata transgénica de CMT1A y recolección de muestras de suero

50 El modelo de rata transgénica de CMT es una rata transgénica homocigótica para PMP22 que lleva tres copias adicionales del gen PMP22 de ratón, que muestra signos de desmielinización en nervios periféricos y craneales (Sereda et al., 1996; Grandis et al., 2004). Este modelo de rata de CMT es una buena aproximación a la enfermedad de CMT1A humana desde un punto de vista clínico. Además las ratas con enfermedad de CMT ya sirven como un modelo para una terapia experimental para CMT1A (Meyer zu Hörste et al., 2007).

Los autores de la invención han buscado moléculas pequeñas que muestren niveles diferenciales en ratas sin manipulación genética y transgénicas, constituyendo así biomarcadores relevantes para la enfermedad de CMT.

Salvo que se especifique de otra forma, las ratas modelo de CMT1A, de cuatro meses de edad, se anestesian con

ketamina (Imalgene) 100 mg/kg, i.p. La sangre se recoge por punción cardiaca en dos tubos diferentes:

- en un tubo de recogida de sangre esterilizado para la coagulación; se recoge el suero y se almacena a -80°C
- en un tubo exento de RNasa EDTA; después de centrifugación (+4°C; 1260 g; 10 min), el plasma se almacena a -80°C.

5 1.2 Métodos de cuantificación

- Colesterol libre

El colesterol se extrajo primero de las muestras con heptanos. El colesterol libre se analizó después usando un método adaptado de Dong et al. (2007): la colest-4-en-3,6-diona formada por la oxidación del colesterol no esterificado por oxidación de Jones, se midió por análisis de HPLC/UV. Se usó el estigmasterol como una referencia interna.

10

- Sorbitol

Las proteínas se hacen precipitar primero con etanol. El sorbitol se analiza principalmente según la nota técnica nº 20 de Dionex, usando cromatografía de intercambio aniónico acoplada con detector electroquímico.

- Metales

15 La cuantificación del hierro y cinc se llevó a cabo por ICP/MS después de mineralización de las muestras de suero.

- Metabolitos del ácido araquidónico

Se usaron kits de inmunoensayo enzimático (EIA) de Cayman Chemical, para analizar:

Prostaglandina E₂ (ref. 514010)

Leucotrieno B₄ (ref. 520111)

20 Tromboxano B₂ (ref. 519031)

6-ceto-Prostaglandina F_{1α} (ref. 515211)

- Monofosfato cíclico de adenosina

Después de precipitación de las proteínas del plasma con etanol, se analiza el cAMP con un kit de EIA de Cayman Chemical (ref. 581001) según las instrucciones del fabricante.

25 - Catecolaminas

Se llevó a cabo una extracción en fase sólida (SPE) para concentrar y purificar las muestras. La adrenalina, dopamina y serotonina se analizaron además por cromatografía de pares iónicos.

- Aminoácidos

30 Las proteínas del plasma precipitaron con ácido sulfosalicílico antes de analizarlas. Se llevó a cabo la cuantificación de los aminoácidos derivatizados con un espectrofotómetro después de un procedimiento de cromatografía de intercambio catiónico automático.

- Hormonas tiroideas

35 Antes de la precipitación de las proteínas del plasma con metanol, se añadió una referencia interna a las muestras. Después se cuantificaron la triyodotironina (T3) y la tiroxina (T4) por un HPLC acoplado a un LC-MS/MS principalmente según Soukhova et al. (2004).

- Neuroesteroides

Ratas modelo de CMT1A, de cuatro meses de edad, se decapitaron y se recogió la sangre en dos tubos diferentes;

- en un tubo de recolección de sangre esterilizado para la coagulación; se recogió el suero y se almacenó a -80°C

40 - en un tubo exento de RNasa EDTA; después de centrifugación (+4°C; 1260 g; 10 min), el plasma se almacenó a -80°C.

Antes del análisis, se hicieron precipitar las proteínas de plasma y después se purificaron los neuroesteroides y se concentraron por SPE. Los neuroesteroides después se derivatizaron químicamente con 2-hidroxi-1-metilpiridina (para disminuir el umbral de detección (Higashi et al., 2005)) o ácido picolínico (Yamashita et al, 2007). Según el

método de derivatización, la referencia interna es ²H-testosterona o ²H-3α-androstanodiol. El análisis por HPLC de neuroesteroides se acopló con un espectrómetro de masas. Los neuroesteroides buscados y derivados eran aldosterona, sulfato de pregnenolona, alopregnanolona, progesterona, 5α-dihidroprogesterona (DHP), 3α-androstanodiol, testosterona, 5α-dihidrotestosterona, DHEA y corticosterona.

5 - Estrógenos

Se recoge sangre como antes. Como para los neuroesteroides, la estrona y el estradiol se extraen de la muestra con acetato de etilo antes de la derivatización con ácido picolínico, purificación y una etapa de concentración y purificación por SPE. Se usan como referencias internas la ²H-estrona y ²H-17β-estradiol.

I.3 Resultados

10 Se analizó cada uno de los biomarcadores en las muestras por duplicado. Se llevó a cabo el análisis estadístico (prueba de Student, bilateral, de tipo 3) comparando las ratas sin manipulación genética frente a las ratas (transgénicas) con CMT1A. Los resultados se resumen en las tres tablas a continuación. Estas tablas describen el nivel medio de biomarcadores que presentan una diferencia notable ($P < 0,2$) entre las ratas sin manipulación genética y CMT1A, en machos y hembras (tabla 1), solo en machos (tabla 2) y solo en hembras (tabla 3).

15 El análisis de biomarcadores ha puesto de manifiesto que el nivel de colesterol libre plasmático es significativamente menor en ratas macho ($P=0,05$) y ratas hembra ($P=0,06$) CMT1A comparado con ratas sin manipulación genética. En hembras, los resultados de los autores de la invención presentaban una disminución significativa de los niveles plasmáticos de ácido alfa-aminobutírico ($P=0,019$), glutamina ($P=0,025$) y tirosina ($P=0,03$) frente a los controles.

20 Los resultados de los autores de la invención también muestran una disminución significativa de los siguientes biomarcadores: alanina, cistina, glutamina, hidroxiprolina, treonina, hormona tiroidea T4, citrulina, LTB4, adrenalina, y lisina; y un aumento significativo de los siguientes biomarcadores: triptófano, testosterona, dopamina, serotonina, hierro, metionina y prolina (tabla 1, 2 y 3).

I.4. Recolección de muestras de fluidos biológicos y métodos de cuantificación

25 Los biomarcadores de la invención se pueden cuantificar fácilmente de otros fluidos biológicos. Como un ejemplo, describen la cuantificación de muestra de saliva Karjalainen et al. (2007) para el colesterol, Syrjänen et al. (1990) para la glutamina y tirosina. Igualmente, esas moléculas pequeñas se pueden cuantificar en la orina como se describe en otra parte para el colesterol (Cenedella et al., 1981) y para aminoácidos (Venta et al., 2001).

Tabla 1

| biomarcadores | Sin manipulación genética | | TG | | P |
|--------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | Media | s.e.m. | Media | s.e.m. | |
| Colesterol libre (µg/ml) | 144,82 | 4,18 | 118,45 | 3,96 | 0,0004 |
| Alanina (µmol/l) | 659,67 | 44,19 | 523,50 | 46,31 | 0,059 |
| Cistina (µmol/l) | 15,50 | 2,85 | 8,67 | 2,51 | 0,103 |
| Glutamina (µmol/l) | 792,00 | 60,46 | 694,50 | 18,11 | 0,174 |
| Hidroxiprolina (µmol/l) | 54,00 | 4,41 | 41,33 | 6,31 | 0,135 |
| Treonina (µmol/l) | 295,00 | 20,30 | 258,17 | 15,76 | 0,184 |
| Triptófano (µmol/l) | 79,83 | 4,76 | 93,00 | 3,94 | 0,060 |
| Dopamina (ng/ml) | 0,30 | 0,02 | 0,41 | 0,07 | 0,195 |
| Serotonina (ng/ml) | 112,50 | 22,82 | 406,05 | 133,26 | 0,079 |
| T4 (ng/ml) | 52,57 | 4,26 | 42,64 | 3,11 | 0,092 |

Tabla 2

| biomarcadores | macho | | | | P |
|--------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|-------|
| | Sin manipulación genética | | TG | | |
| | Media | s.e.m. | Media | s.e.m. | |
| Colesterol libre (µg/ml) | 146,11 | 7,80 | 120,74 | 6,78 | 0,050 |
| Citrulina (µmol/l) | 109,00 | 9,29 | 92,00 | 3,61 | 0,201 |
| Metionina (µmol/l) | 49,67 | 2,73 | 55,67 | 1,76 | 0,150 |
| Prolina (µmol/l) | 224,67 | 19,54 | 265,00 | 14,50 | 0,179 |
| Triptófano (µmol/l) | 84,33 | 5,24 | 99,00 | 4,93 | 0,111 |
| Tirosina (µmol/l) | 87,00 | 5,13 | 98,67 | 3,93 | 0,150 |
| Testosterona (ng/ml) | 1,81 | 0,40 | 3,37 | 0,85 | 0,201 |
| T4 (ng/ml) | 59,23 | 3,21 | 48,84 | 2,00 | 0,063 |
| Hierro (µg/ml) | 4,77 | 0,45 | 7,03 | 1,24 | 0,134 |

30

Tabla 3

| | hembra | | | | P |
|-----------------------------------|---------------------------|--------|--------|--------|-------|
| | Sin manipulación genética | | TG | | |
| biomarcadores | Media | s.e.m. | Media | s.e.m. | |
| Colesterol libre (µg/ml) | 143,54 | 4,41 | 116,16 | 4,88 | 0,006 |
| LTB4 (pg/ml) | 421,46 | 43,75 | 335,67 | 26,36 | 0,184 |
| Alanina (µmol/l) | 660,33 | 46,83 | 551,33 | 44,86 | 0,168 |
| Ácido alfa-aminobutírico (µmol/l) | 13,33 | 1,33 | 6,67 | 0,88 | 0,019 |
| Glutamina (µmol/l) | 905,33 | 46,94 | 687,33 | 38,84 | 0,025 |
| Hidroxiprolina (µmol/l) | 49,00 | 6,66 | 29,00 | 2,52 | 0,081 |
| Lisina (µmol/l) | 510,67 | 25,96 | 419,00 | 22,50 | 0,057 |
| Tirosina (µmol/l) | 80,00 | 2,65 | 56,33 | 5,36 | 0,030 |
| Adrenalina (ng/ml) | 7,99 | 0,76 | 5,97 | 0,58 | 0,107 |

II. Identificación y cuantificación de otros biomarcadores relacionados con el colesterol

II.1. Modelo de rata transgénica de CMT1A y recolección de muestras de suero

5 El moldeo de rata transgénica de CMT y la recolección de muestras son los mismos que los descritos antes (véase la sección I.1).

II.2. Métodos de cuantificación del colesterol

- Colesterol total

10 El colesterol total se ha determinado por un ensayo enzimático con el kit ABX Pentra Cholesterol CP (Horiba). El colesterol es consumido por la colesterol esterasa y colesterol oxidasa en una reacción de formación de color, donde el color producido es proporcional a la cantidad de colesterol total presente en la muestra.

- Colesterol LDL

15 El colesterol LDL se ha determinado por un ensayo enzimático con el kit ABX Pentra LDL Direct CP (Horiba). El método es un formato de dos reactivos y depende de las propiedades de los detergentes usados. El primer detergente solubiliza todas las partículas que no son lipoproteína LDL. El colesterol liberado es consumido por la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa en una reacción que no forma color. El segundo detergente solubiliza las partículas de LDL restantes y un agente de acoplamiento cromogénico permite la formación de color. La reacción enzimática en presencia del agente de acoplamiento produce color que es específicamente proporcional a la cantidad de colesterol LDL presente en la muestra.

II.3. Resultados

20 Los resultados presentados en la tabla 4 a continuación se extrajeron de ensayos independientes y se analizaron con una prueba t de Student bilateral comparando 20 ratas sin manipulación genética frente a 19 ratas CMT1A (transgénicas).

Tabla 4

| Biomarcadores | Sin manipulación genética | | TG | | P |
|------------------|---------------------------|--------|-------|--------|---------|
| | Media | s.e.m. | Media | s.e.m. | |
| Colesterol total | 1,81 | 0,07 | 1,77 | 0,05 | 0,66129 |
| Colesterol LDL | 0,26 | 0,02 | 0,21 | 0,01 | 0,03951 |

25 Los resultados de los autores de la invención muestran que el nivel de colesterol LDL es significativamente menor ($P=0,039$) en ratas CMT1A (TG) comparado con ratas sin manipulación genética, mientras que el nivel de colesterol total no se modifica significativamente. El nivel de colesterol LDL es muy fácilmente cuantificable con los kits de detección usados habitualmente.

30 Correlación de la concentración de biomarcadores con resultados de los ensayos de comportamiento, histología, expresión génica y electrofisiología

35 Se compararon el rendimiento motor y la fuerza muscular, potenciales de acción nerviosa sensorial (SNAP), distribución de los diámetros axonales y vainas de mielina del nervio ciático fijado, contenido de fibra en músculos fijados y expresión de ARNm de pmp22, con la cantidad de biomarcadores medidos en fluidos biológicos. El ensayo usado es un ensayo de asociación lineal entre muestras emparejadas usando la correlación de producto-momento de Pearson. Es un ensayo unilateral y se aplica un umbral de significación de 0,05 en p valores.

Dichos análisis demuestran que los niveles de los biomarcadores de la invención se correlacionan con algunos de

los ensayos de comportamiento mencionados antes, histología, expresión de gen PMP22 y electrofisiología, confirmando así la importancia de estos biomarcadores en la fisiología de CMT1A y la pertinencia del uso de estos biomarcadores en el diagnóstico y seguimiento de la CMT1A.

III. Identificación de predictores de enfermedad a partir de los biomarcadores de la invención

- 5 Los análisis estadísticos del nivel de biomarcadores de la invención obtenidos en los experimentos anteriores, muestran que dichos biomarcadores también se pueden usar en diferentes conjuntos de biomarcadores agrupados para predecir la presencia de la enfermedad con una buena puntuación. Se muestran las puntuaciones de predictibilidad para algunos de los conjuntos posibles que comprenden varias de las moléculas identificadas en la presente memoria como biomarcadores para la enfermedad de CMT (tabla 5).
- 10 Brevemente, el diagnóstico de la enfermedad se llevó a cabo aplicando un análisis discriminante lineal (LDA), usado habitualmente en estadística, reconocimiento de patrón y aprendizaje automático, para encontrar una combinación lineal de características que caractericen o separan dos o más clases de objetos. El LDA se implementó en R (<http://www.r-project.org/>).
- 15 Se aplicó el algoritmo de LDA en varios conjuntos de biomarcadores seleccionados basándose en su correlación con el rasgo de interés (aquí transgénico frente a sin manipulación genética). Con el fin de evaluar adecuadamente los rendimientos de cada uno de los conjuntos de biomarcadores, se dividieron grupos de ratas en el “conjunto de entrenamiento” independiente (75% de las ratas) en el que se entrenó el LDA, y un “conjunto de validación” (25% de las ratas), en el que se validó el algoritmo entrenado. Para ser homogéneo, los conjuntos de entrenamiento y validación se hicieron de proporciones iguales de ratas transgénicas/sin manipulación genética y macho/hembra.
- 20 Puesto que el nivel de los biomarcadores difiere entre machos y hembras, para un conjunto de biomarcadores dado, se entrenó el LDA y se validó por separado en machos y hembras. Finalmente el LDA entrenado se usó para clasificar cada rata de los conjuntos de entrenamiento y validación en “sin manipulación genética” y “transgénicas”, y la proporción de ratas que se clasificaron permitió evaluar los rendimientos del algoritmo. Este procedimiento se volvió a aplicar iterativamente con el fin de hacer la media de los rendimientos frente a todas las tomas de muestra posibles.
- 25

Tabla 5

| Biomarcadores | Entrenamiento | | | Validación | | |
|---|---------------|--------|----------------|------------|--------|----------------|
| | Macho | Hembra | Macho y hembra | Macho | Hembra | Macho y hembra |
| Hidroxirolina y alanina | 68% | 100% | 84% | 45% | 83% | 64% |
| Triptófano e hidroxiprolina | 86% | 100% | 93% | 56% | 84% | 70% |
| T4 y triptófano e hidroxiprolina y alanina | 92% | 100% | 96% | 60% | 89% | 75% |
| T4 e hidroxiprolina | 92% | 100% | 96% | 60% | 79% | 69% |
| T4 e hidroxiprolina y alanina | 92% | 100% | 96% | 61% | 83% | 72% |
| Hidroxirolina y serotonina y alanina | 81% | 100% | 90% | 61% | 84% | 72% |
| Hidroxirolina y serotonina | 74% | 100% | 87% | 61% | 72% | 67% |
| T4 y triptófano e hidroxiprolina | 94% | 100% | 97% | 61% | 89% | 75% |
| Triptófano e hidroxiprolina y alanina | 89% | 100% | 94% | 61% | 73% | 67% |
| Total de 20 biomarcadores* | 100% | 100% | 100% | 62% | 72% | 67% |
| T4 y triptófano e hidroxiprolina y serotonina | 95% | 100% | 97% | 67% | 77% | 72% |
| Triptófano e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 86% | 100% | 93% | 67% | 72% | 69% |
| T4 y serotonina | 95% | 74% | 84% | 71% | 62% | 67% |
| Triptófano e hidroxiprolina y serotonina | 89% | 100% | 95% | 72% | 72% | 72% |
| T4 y triptófano y serotonina y alanina | 92% | 95% | 93% | 72% | 77% | 75% |
| T4 y triptófano | 95% | 97% | 96% | 72% | 77% | 75% |
| T4 e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 85% | 95% | 90% | 72% | 83% | 78% |
| T4 y triptófano y alanina | 94% | 97% | 96% | 72% | 78% | 75% |
| T4 e hidroxiprolina y serotonina | 91% | 100% | 96% | 73% | 71% | 72% |
| T4 y alanina | 89% | 83% | 86% | 73% | 73% | 73% |
| T4 y triptófano e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 94% | 100% | 97% | 73% | 83% | 78% |
| Serotonina y alanina | 78% | 78% | 78% | 73% | 71% | 72% |
| T4 y serotonina y alanina | 86% | 78% | 82% | 73% | 71% | 72% |
| T4 y triptófano y serotonina | 94% | 97% | 96% | 73% | 77% | 75% |
| Triptófano y alanina | 92% | 83% | 87% | 77% | 61% | 69% |
| Colesterol libre e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 78% | 78% | 78% |
| Colesterol libre y triptófano e hidroxiprolina y alanina | 100% | 100% | 100% | 78% | 84% | 81% |
| Colesterol libre y triptófano e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 78% | 72% | 75% |
| Colesterol libre e hidroxiprolina y alanina | 100% | 100% | 100% | 78% | 88% | 83% |

ES 2 532 006 T3

| Biomarcadores | Entrenamiento | | | Validación | | |
|--|---------------|--------|----------------|------------|--------|----------------|
| | Macho | Hembra | Macho y hembra | Macho | Hembra | Macho y hembra |
| Triptófano y serotonina | 86% | 82% | 84% | 78% | 66% | 72% |
| Colesterol libre y triptófano e hidroxiprolina | 100% | 100% | 100% | 83% | 83% | 83% |
| Colesterol libre y triptófano y alanina | 100% | 100% | 100% | 84% | 72% | 78% |
| Triptófano y serotonina y alanina | 83% | 84% | 83% | 84% | 72% | 78% |
| Colesterol libre y triptófano y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 84% | 72% | 78% |
| Colesterol libre e hidroxiprolina y serotonina | 100% | 100% | 100% | 84% | 77% | 80% |
| Colesterol libre y triptófano e hidroxiprolina y serotonina | 100% | 100% | 100% | 84% | 73% | 79% |
| Colesterol libre y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 84% | 79% | 81% |
| Colesterol libre y T4 y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 88% | 78% | 83% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano y alanina | 100% | 100% | 100% | 89% | 88% | 88% |
| Colesterol libre y T4 e hidroxiprolina y alanina | 100% | 100% | 100% | 89% | 90% | 89% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 89% | 77% | 83% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 89% | 78% | 84% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano e hidroxiprolina y alanina | 100% | 100% | 100% | 89% | 88% | 89% |
| Colesterol libre y T4 e hidroxiprolina y serotonina y alanina | 100% | 100% | 100% | 89% | 78% | 84% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano e hidroxiprolina | 100% | 100% | 100% | 94% | 94% | 94% |
| Colesterol libre y T4 e hidroxiprolina y serotonina | 100% | 100% | 100% | 94% | 77% | 86% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano y serotonina | 100% | 100% | 100% | 94% | 79% | 87% |
| Colesterol libre y T4 y alanina | 100% | 100% | 100% | 94% | 83% | 89% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano e hidroxiprolina y serotonina | 100% | 100% | 100% | 94% | 77% | 86% |
| Colesterol libre e hidroxiprolina | 100% | 100% | 100% | 94% | 94% | 94% |
| Colesterol libre y triptófano y serotonina | 100% | 100% | 100% | 95% | 67% | 81% |
| Colesterol libre y alanina | 100% | 100% | 100% | 95% | 89% | 92% |
| Colesterol libre y T4 y triptófano | 100% | 100% | 100% | 95% | 89% | 92% |
| Colesterol libre y triptófano | 100% | 100% | 100% | 95% | 78% | 86% |
| Colesterol libre y T4 y serotonina | 100% | 100% | 100% | 100% | 78% | 89% |
| Colesterol libre y serotonina | 100% | 100% | 100% | 100% | 79% | 89% |
| Colesterol libre y T4 e hidroxiprolina | 100% | 100% | 100% | 100% | 95% | 97% |
| Colesterol libre y T4 | 100% | 100% | 100% | 100% | 95% | 97% |

*Total de 20 biomarcadores: colesterol libre, T4, triptófano, hidroxiprolina, serotonina, alanina, ácido alfa-aminobutírico, citrulina, cistina, glutamina, lisina, metionina, prolina, treonina, tirosina, testosterona, hierro, LTB4, adrenalina, dopamina.

Bibliografia

Berger P. *et al.* Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia*. 2006; 54(4):243-257.

Burns J. *et al.* Ascorbic acid for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled, safety and efficacy trial. *Lancet Neurol*. 2009; 8(6):537-544.

Cenedella R.J. *et al.* Studies on the source of urinary cholesterol in the normal human male. *The Journal of Lipid Research*. 1981; 22:122-130.

Dong J. *et al.* Jones oxidation and high performance liquid chromatographic analysis of cholesterol in biological samples. *J. Chromatogr. B* (2007);858:239-246.

Grandis M. *et al.* Early abnormalities in sciatic nerve function and structure in a rat model of Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Exp Neurol*. (2004);190(1):213-23.

Grandis M & Shy ME. Current Therapy for Charcot-Marie-Tooth Disease. *Curr Treat Options Neurol*. 2005; 7(1):23-31.

Higashi T. *et al.* 2-Hydrazino-1-methylpyridine: a highly sensitive derivatization reagent for oxosteroids in liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (2005);825:214-222.

Kapur S. *et al.* Anesthetic management of a parturient with neurofibromatosis 1 and Charcot-Marie-Tooth disease. *J Clin Anesth*. 2007;19(5):405-406.

Karjalainen S. *et al.* Salivary cholesterol of healthy adults in relation to serum cholesterol concentration and oral health. *J Dent Res*. 1997;76(10):1637-1643.

Katona I. *et al.* PMP22 expression in dermal nerve myelin from patients with CMT1A. *Brain*. 2009; 132(Pt 7):1734-1740.

Li J. *et al.* Skin biopsies in myelin-related neuropathies: bringing molecular pathology to the bedside. *Brain*. 2005;128(Pt 5):1168-1177.

Meyer zu Horste G *et al.* Antiprogestrone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol*. (2007); 61(1):61-72.

Nave KA. *et al.*, Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3(8): 453-464.

Niebrój-Dobosz I. *et al.* Serum lipids in various polyneuropathies. *Neurol Neurochir Pol.* 1977;11(4):421-426

Niemann A. *et al.* Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 2006; 8(1-2):217-242.

Passage E. *et al.* Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of CMT disease. *Nature Med.* 2004; 10(4): 396-401.

Patrocló CB. *et al.* Autosomal dominant HMSN with proximal involvement: new Brazilian cases. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 2008; 67(3B):892-896

Sahenk Z. *et al.* NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology.* 2005; 65(5):681-689.

Sereda M. *et al.* A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron.* (1996);16(5):1049-60.

Sereda MW. *et al.* Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat Med* 2003; 9: 1533–1537.

Suter U & Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 714-726.

Soukhova N. *et al.* Isotope dilution tandem mass spectrometric method for T4/T3. *Clin Chim Acta.* (2004);343(1-2):185-90.

Syrjänen SM. *et al.* Free amino acid levels in oral fluids of normal subjects and patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 1990;35(3):189-193.

Venta R. *et al.* Year-Long Validation Study and Reference Values for Urinary Amino Acids Using a Reversed-Phase HPLC Method. *Clinical Chemistry.* 2001; 47: 575-583

Weiner DS. *et al.* The Akron dome midfoot osteotomy as a salvage procedure for the treatment of rigid pes cavus: a retrospective review. *J Pediatr Orthop.* 2008; 28(1):68-80. Yamashita K. *et al.* Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids* (2007);72:819-827.

Yao JK. *et al.* Lipid abnormalities in hereditary neuropathystar: Part 2. Serum phospholipids. *Journal of the Neurological Sciences.* 1978; 36(2):225-236.

Young P. *et al.* Treatment for Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (1): CD006052.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método in vitro para detectar la presencia o el riesgo de enfermedad de CMT en un mamífero, o para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad de CMT, comprendiendo el método determinar la cantidad (relativa) o nivel de colesterol libre en una muestra de sangre, plasma y/o suero del mamífero, en donde una cantidad o nivel menor es indicativo de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de dicha enfermedad.
- 10 2.- Un método in vitro para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la enfermedad de CMT en un mamífero, comprendiendo el método determinar en una muestra de sangre, plasma y/o suero del mamífero, durante el tratamiento, la cantidad (relativa) o nivel de colesterol libre, y comparar dicha cantidad o nivel con un nivel de colesterol libre determinado antes del tratamiento o en una etapa anterior del tratamiento en dicho mamífero, en donde un aumento es indicativo de la eficacia del tratamiento.
- 3.- El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha cantidad o nivel de colesterol libre se mide en relación con el colesterol total.
- 4.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la determinación de uno cualquiera de las siguientes combinaciones de biomarcadores:
- 15 - colesterol libre y alanina;
 - colesterol libre y T4 y triptófano e hidroxiprolina;
 - colesterol libre e hidroxiprolina;
 - colesterol libre y T4 y triptófano;
 - colesterol libre y T4 y serotonina;
- 20 - colesterol libre y T4 e hidroxiprolina;
 - colesterol libre y T4; o
 - colesterol libre y serotonina.
- 25 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa al menos un ensayo de diagnóstico o marcador adicional para la enfermedad de CMT, seleccionado de ensayo o marcador de ácidos nucleicos, proteínico, fisiológico, neurofisiológico, genético, de comportamiento, electrofisiológico, clínico y fenotípico.
- 30 6.- Un método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el nivel de dicho(s) biomarcador(es) se compara con un valor de referencia, en donde una desviación de dicho valor es indicativo de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de la enfermedad de CMT.
- 7.- Un método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para el pronóstico de la enfermedad de CMT, subclasificación de la enfermedad de CMT, o etapa de estratificación de pacientes en ensayos clínicos.
- 8.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enfermedad de CMT es CMT1A.
- 35 9.- Uso del colesterol libre en un método in vitro de detección de la predisposición a o diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de CMT y/o en un método de evaluación del tratamiento de la enfermedad de CMT en un sujeto mamífero.
- 10.- El uso de la reivindicación 9, en donde el nivel del colesterol libre se usa en relación con el colesterol total.
- 40 11.- El uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el colesterol libre se usa junto con al menos un ensayo de diagnóstico o marcador adicional para la enfermedad de CMT, seleccionado preferiblemente de ensayo o marcador de ácidos nucleicos, proteínico, fisiológico, neurofisiológico, genético, de comportamiento, electrofisiológico, clínico y fenotípico.
- 12.- El uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el nivel de colesterol libre se compara con un valor de referencia en donde una desviación de dicho valor es indicativa de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de la enfermedad de CMT.
- 45 13.- Uso de un kit que comprende al menos un compuesto que se une o reacciona con el colesterol libre, en el diagnóstico, pronóstico y/o para la evaluación de la eficacia de un tratamiento o el seguimiento de la evolución de la enfermedad de CMT1A.