

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 843**

51 Int. Cl.:

A61K 31/225 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2007 E 07847692 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2097064**

54 Título: **Terapia anaplerótica de enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina**

30 Prioridad:

04.12.2006 EP 06291873

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2015

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CEDEX 13, FR**

72 Inventor/es:

**DÜRR, ALEXANDRA y
MOCHEL, FANNY**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 552 843 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

Terapia anaplerótica de enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere al tratamiento y la prevención de enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina.

10 Estado de la técnica

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa heredada devastadora sin tratamiento curativo. La EH es el miembro creador de un gran grupo de enfermedades debidas a la acumulación de poliglutamina y toxicidad. Hay una necesidad crítica de nuevas percepciones en la patofisiología de esta enfermedad, además de la identificación de moléculas relevantes para ensayos clínicos.

Varias observaciones han conducido a la hipótesis de que la disfunción mitocondrial tiene una función en enfermedades de poliglutamina, y en enfermedad de Huntington en particular. Varias líneas de evidencia indican metabolismo de la energía anormal, que incluye un reducido metabolismo de la glucosa, elevados niveles de lactato y alteración de la actividad del complejo mitocondrial (Di Prospero y Fischbeck 2005, Nat Rev Genet 6(10): 756-65). Para explicar este metabolismo de la energía anormal, la mayoría de los estudios favorecieron una alteración secundaria de la cadena respiratoria mitocondrial. Se ha mostrado una importante disminución en los complejos II y III (55 %) en el caudado de pacientes con EH (Gu 1996, Ann Neurol 39: 385-9), además de una deficiencia en el complejo I en músculo (Arenas 1998, Ann Neurol 43: 397-400), soportando, por tanto, la posibilidad de defectos de la cadena respiratoria mitocondrial en la patogénesis de EH (Shapira 1998, Biochem Biophys Acta 1366: 225-33, Grunewald 1999, Ann N Y Acad Sci 893: 203-13). Estos hallazgos se correlacionaron con modelos de EH inducidos por ácido 3-nitropropiónico, un inhibidor irreversible del complejo II (Beal 1993, J Neurosci 13: 4181-92). Sin embargo, estos datos se contradicen por la demostración de complejos de transporte de electrones mitocondriales normales en ratones transgénicos en una etapa temprana (Guidetty 2001, Exp Neurol 169: 340-50), además de en células estriatales en cultivo que expresa huntingtina mutante, a pesar de la reducción significativa en la síntesis de ATP observada en aquellas células (Milakovic 2005, JBC 280: 30773-82). Evidencia indirecta adicional de un defecto de energía en enfermedades de poliglutamina surge de la eficacia parcial de terapias energéticas, tales como dicloroacetato (Andreassen 2001, Ann Neurol 50: 112-9), piruvato (Ryu 2004, Exp Neurol 187: 150-9), creatina (Ferrante 2000, J Neurosci 20: 4389-97) y coenzima Q10 (Schilling 2001, Neurosci Lett 315: 149-53) en modelos de ratón.

Estado de la técnica relevante adicional incluye el documento US 6.835.750 B1. Sin embargo, hasta la fecha, sigue siendo bastante imprecisa la farmacoterapia eficaz para enfermedades neurodegenerativas asociadas a la alteración del metabolismo de la energía como enfermedades de poliglutamina en particular.

40 Objeto de la invención

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un precursor de propionil-CoA para su uso según la reivindicación 1.

La presente invención proporciona un precursor de propionil-CoA para su uso según la reivindicación 1.

También se proporciona el uso de un precursor de propionil-CoA en la fabricación de un medicamento y/o una sustancia alimentaria para tratar y/o prevenir una enfermedad por poliglutamina.

Las enfermedades de poliglutamina constituyen una clase de nueve trastornos genéticamente distintos que se producen por la expansión de la repetición CAG traducida. Éstas incluyen enfermedad de Huntington (EH), atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA) y ataxia espinocerebelosa 1, 2, 3, 6, 7 y 17. Aunque las proteínas causantes de la enfermedad se expresan ampliamente en el sistema nervioso central, poblaciones específicas de neuronas son vulnerables en cada enfermedad, produciendo patrones característicos de neurodegeneración y características clínicas.

En una realización de la presente invención, la enfermedad por poliglutamina está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Huntington (EH), atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), ataxia espinocerebelosa 1, 2, 3, 6, 7 y 17.

En una realización preferida de la presente invención, la enfermedad por poliglutamina es la enfermedad de Huntington.

Por precursor de propionil-CoA se indica una sustancia a partir de la cual puede formarse propionil-CoA por una o más reacciones metabólicas que tienen lugar dentro del cuerpo. Ejemplos de precursores de propionil-CoA se

muestran en la Figura 5. Ejemplos típicos de precursores de propionil-CoA son ácidos grasos de cadena media impar, en particular ácido graso de siete carbonos, triheptanoína (triheptanoil-glicerol), heptanoato, cuerpos de cetona C5 (por ejemplo β -cetopentanoato (3-cetovalerato) y β -hidroxipentanoato (3-hidroxicetopentanoato)) (Kinman 2006, Am J Physiol Endocrinol Metab 291 (4): E860-6, Brunengraber y Roe 2006, J Inherit Metab Dis 29 (2-3): 327-31).

Los ejemplos de precursores de propionil-CoA descritos anteriormente incluyen los propios compuestos, además de sus sales, profármacos, solvatos, si es aplicable. Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres, oligómeros de hidroxialcanoato tales como oligo(3-hidroxicetopentanoato) (Seebach 1999, Int J Biol Macromol 25 (1-3): 217-36) y otros derivados farmacéuticamente aceptables, que, tras la administración a un individuo, son capaces de proporcionar propionil-CoA. Un solvato se refiere a un complejo formado entre un precursor de propionil-CoA descrito anteriormente y un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de disolventes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, etanol, isopropanol, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Una fuente dietética muy práctica de propionil-CoA es la triheptanoína (triheptanoil-glicerol). Después de la hidrólisis intestinal de la triheptanoína, el heptanoato es absorbido en la vena porta. En el hígado, se convierte parcialmente en los cuerpos de cetona C5 β -cetopentanoato (3-cetovalerato) y β -hidroxipentanoato (3-hidroxicetopentanoato). Los cuerpos de cetona C5 también son precursores de propionil-CoA en tejidos periféricos. Así, después de la ingestión de triheptanoína, los tejidos periféricos reciben dos precursores de propionil-CoA, es decir, heptanoato y cuerpos de cetona C5. Bastante interesantemente, los cuerpos de cetona C5, como C4, son sustratos naturales para el cerebro y pueden dirigirse a receptores fisiológicos en la membrana superficial de la barrera hematoencefálica. La demostración del transporte de cuerpos de cetona C5 a través de la barrera hematoencefálica se proporcionó recientemente por el tratamiento de un paciente con deficiencia de piruvato carboxilasa, en el que la anaplerosis cerebral está principalmente alterada (Mochel 2005, Mol Genet Metab 84: 305-12). La disponibilidad de los cuerpos de cetona C5 para la anaplerosis cerebral también se demostró por la normalización de glutamina y GABA en el CSF de este paciente, además de la ausencia de patología cerebral.

El experto en la materia conoce métodos convencionales para la producción de precursores de propionil-CoA.

En una realización preferida de la presente invención, el precursor de propionil-CoA es triheptanoína, ácido heptanoico o heptanoato.

La triheptanoína ya se ha usado en el tratamiento anaplerótico de algunas patologías que tienen en común una disminución en la producción de ATP a pesar del amplio suministro de acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico (CAC), y una cadena respiratoria normal. Tales patologías incluyen lesión por reperfusión cardíaca (Reszko 2003, JBC 278: 34959-65), trastornos por oxidación de ácidos grasos de cadena larga (FOD) (Roe 2002, JCI 110: 259-69 y documento WO 0045649), deficiencia de piruvato carboxilasa (Mochel 2005, Mol Genet Metab 84: 305-12) y enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (Roe y Mochel 2006, J Inherit Metab Dis 29 (2-3): 332-40)

La triheptanoína es un triglicérido preparado por la esterificación de tres moléculas de ácido n-heptanoico y glicerol. Con respecto a la terapia, los términos ácido heptanoico, heptanoato y triheptanoína pueden usarse indistintamente en la siguiente descripción. El ácido heptanoico, heptanoato y triheptanoína son precursores de propionil-CoA a modo de ejemplo de la invención. Puede usarse heptanoato sustituido, insaturado, o ramificado, además de otros ácidos grasos de siete carbonos modificados.

El ácido heptanoico se encuentra en diversos aceites de fusel en cantidades apreciables y puede extraerse mediante cualquier medio conocido en la técnica. También puede sintetizarse por la oxidación de heptaldehído con permanganato de potasio en ácido sulfúrico diluido (Ruhoff, Org Syn Coll. vol II, 315 (1943)). El ácido heptanoico también está comercialmente disponible mediante Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

La triheptanoína puede obtenerse por la esterificación de ácido heptanoico y glicerol mediante cualquier medio conocido en la técnica. La triheptanoína también está comercialmente disponible mediante Condea Chemie GmbH (Witten, Alemania) como Special Oil 107.

El heptanoato insaturado también puede utilizarse en la presente invención. Además, en la presente invención pueden utilizarse ácidos grasos de siete carbonos sustituidos, insaturados y/o ramificados que entran fácilmente en la mitocondria sin enzimas de transporte especial. Por ejemplo, 4-metilhexanoato, 4-metilhexenoato y 3-hidroxi-4-metilhexanoato se descomponen por la β -oxidación normal a ácido 2-metilbutírico con degradación final realizada mediante la vía de isoleucina. Asimismo, 5-metilhexanoato, 5-metilhexenoato y 3-hidroxi-5-metilhexanoato se degradan por la β -oxidación normal a ácido isovalérico con degradación final realizada mediante la vía de leucina.

Pueden administrarse precursores de propionil-CoA de la presente invención por vía oral, parenteralmente o intraperitonealmente. Preferentemente, pueden administrarse mediante la ingestión de una sustancia alimentaria que contiene un precursor de propionil-CoA tal como triheptanoína a una concentración eficaz para lograr niveles terapéuticos. Alternativamente, pueden administrarse como una cápsula o atrapados en liposomas, en disolución o suspensión, solos o en combinación con otros nutrientes, edulcorantes y/o aromatizantes adicionales. Las cápsulas y comprimidos pueden recubrirse con azúcar, Shellac y otros agentes entéricos como es conocido. Normalmente,

los medicamentos según la invención comprenden un precursor de propionil-CoA, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia conocerá vehículos adecuados. Formulaciones adecuadas para administración por cualquier vía deseada pueden prepararse por métodos convencionales, por ejemplo, por referencia a texto muy conocido tal como Remington; The Science and Practice of Pharmacy.

5

A continuación, la invención se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos, además de las figuras.

Descripción de las figuras

Figura 1: Análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS) de espectros de RMN de muestras de plasma de pacientes con EH con ninguno o pocos signos de la enfermedad y controles. Se constituyeron tres grupos de pacientes con EH premanifiesta, temprana y moderadamente afectados basándose en sus puntuaciones UHDRS, como se describe en los métodos. El primer y segundo componentes en el espacio X (espectro de RMN) se indican PC[1] y PC[2], respectivamente. Las representaciones de puntuación de PLS (PC[1]/PC[2]) de grupos comparados por pares muestran la mayor variación dentro del espectro de RMN según una clasificación a priori con UHDRS. Hay una clara separación entre pacientes con EH premanifiesta y temprana (a), además de entre pacientes con EH temprana y moderadamente afectados (b). Por tanto, la espectroscopía por RMN en plasma permite la separación de pacientes con EH en diferentes etapas de la enfermedad. A pesar de algún solapamiento, también se observa la diferenciación entre controles e individuos premanifiestos (c).

Figura 2: Concentraciones relativas en plasma de aminoácidos de cadena ramificada son responsables de la separación entre grupos de EH. La representación de la contribución por PLS permite la comparación entre perfiles metabólicos en plasma de pacientes con EH tempranamente afectados con portadores premanifiestos. Las variables de RMN que tienen el mayor peso (w^*1 : escalada en unidades de desviación estándar), que, por tanto, contribuyen principalmente a la separación entre grupos de EH, son concentraciones reducidas ($>2DE$) de metabolitos localizados entre 0,9 y 1,05 ppm: valina, leucina e isoleucina. Se obtuvo la misma representación de contribución cuando se comparan perfiles metabólicos en plasma de pacientes con EH de levemente a tempranamente afectados (datos no mostrados).

Figura 3: Los niveles de aminoácidos de cadena ramificada son significativamente diferentes en pacientes con EH y controles. Las concentraciones de valina, leucina e isoleucina en plasma se determinaron por cromatografía de intercambio iónico. Se hicieron comparaciones de medias (ANOVA) entre hombres o mujeres con EH y sus controles respectivos. En hombres hay una disminución significativa de valina, leucina e isoleucina en el grupo de EH. En mujeres se observan resultados similares para leucina e isoleucina. Digno de mención, en tanto hombres como mujeres, la comparación de las desviaciones estándar de los valores de valina, leucina e isoleucina casi no muestra solapamiento entre los grupos de control y de EH.

Figura 4: Los aminoácidos de cadena ramificada en plasma se correlacionan negativamente con la progresión de la enfermedad en EH. El diagrama de cargas del análisis de los principales componentes (PCA) muestra la importancia relativa de cada variable del estudio y la correlación entre estas variables. Cuanto más diverja la carga (p) de cada variable de cero, más importante es esta variable en la varianza explicada del componente dado (expresada por R^2x). La varianza explicada de todos los datos alcanza el 44 % en el primer componente y el 22 % en el segundo componente. Hay una fuerte correlación negativa entre marcadores clínicos (el tamaño de la expansión de la repetición CAG anormal, gravedad de la enfermedad medida por UHDRS y puntuaciones de depresión) y parámetros asociados al peso (peso, BMI, LBM y FBM para masa corporal delgada y grasa, respectivamente). BCAA, valina, leucina e isoleucina se correlacionan negativamente con la progresión de la enfermedad y se correlacionan positivamente con la pérdida de peso. Obsérvese que el número de repeticiones CAG se correlaciona negativamente con los valores de BCAA: cuanto mayor sea la repetición, menor serán los valores de BCAA ($p=0,015$ para valina, $0,018$ para leucina y $0,020$ para isoleucina).

Figura 5: Diagrama que representa la vía de triheptanoína metabólica.

Figura 6: Supervivencia celular de Purkinje 12 días y 20 días tras la infección con los vectores lentivirales. 100Q: ATXN7T-100Q-GFP. 10Q: ATXN7T-10Q-GFP. GFP: vector de control que expresa GFP solo. La supervivencia celular de Purkinje se expresa como el porcentaje de células positivas para calbindina en cultivos infectados en comparación con cultivos no infectados. 12 días después de la infección por ATXN7T-100Q-GFP, la supervivencia celular de Purkinje se reduce a ~30 % y adicionalmente disminuye a ~ 15 % después de 20 días, demostrando la alta y progresiva neurotoxicidad de la proteína mutante, que es claramente distinta de la toxicidad del vector viral solo (condición de GFP).

Figura 7: Evolución del peso e ingesta de alimentos de ratones inactivados femeninos ($n=3$) y ratones no mutantes femeninos ($n=3$) de 7 a 11 semanas de vida.

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

5 En la siguiente descripción, todos los experimentos de biología molecular para los que no se facilita protocolo detallado se realizan según el protocolo estándar.

Ejemplo 1: Identificación de un biomarcador de plasma en portadores premanifiestos de enfermedad de Huntington que indica desequilibrio de energía temprano

10 **Abreviaturas:** EH (enfermedad de Huntington), UHDRS (escala de puntuación unificada de la enfermedad de Huntington), ppm (partes por millón), PCA (análisis de componentes principales), PLS (mínimos cuadrados parcial).

Resumen

15 La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo dominante autosómico en el que se cree que una deficiencia de energía desempeña una función. Los pacientes pierden consistentemente peso, aunque el motivo de esto es desconocido. En vista del acceso específico a portadores premanifiestos en EH, los presentes inventores realizaron un estudio multiparamétrico en un grupo de 32 individuos sin signo o poco de la enfermedad en comparación con 21 controles. La pérdida de peso se observó incluso en portadores premanifiestos en el grupo de EH, aunque su aporte calórico fue mayor. Se descartaron procesos inflamatorios, además de disfunción hormonal primaria, que incluye el equilibrio de grelina y leptina. Sin embargo, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones en plasma distinguió pacientes con EH en diferentes etapas de la enfermedad y portadores premanifiestos de controles. Las diferencias entre los grupos fueron atribuibles a bajos niveles de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), valina, leucina e isoleucina. Los presentes inventores confirmaron que los niveles de BCAA se correlacionaron negativamente con la pérdida de peso y, lo que es más importante, con la progresión de la enfermedad. Los niveles de factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF1), que está regulado por BCAA, también fueron menores en el grupo de EH que en controles. Los BCAA son, por tanto, los primeros biomarcadores identificados en EH y ofrecen nuevas perspectivas en una deficiencia de energía temprana subyacente.

Resultados

Evidencia de hipercatabolismo temprano en EH

35 Se definieron tres grupos según sus puntuaciones UHDRS. Hubo 15 portadores de la mutación sin ningún signo motor o cognitivo de EH (UHDRS $0,5 \pm 1,0$), 10 pacientes en una etapa temprana de la enfermedad (UHDRS $11,9 \pm 4,9$) y 7 pacientes levemente afectados (UHDRS $44,4 \pm 14,1$)

40 La pérdida de peso durante los últimos 5 años fue significativamente mayor en el grupo de EH que en controles ($p < 0,0001$). La diferencia siguió siendo significativa cuando los hombres ($p = 0,002$) y mujeres ($p = 0,003$) se analizaron por separado. A pesar de la mayor ingesta de calorías, los individuos con EH y controles no mostraron diferentes MBI. Y, lo que es más importante, en hombres con EH, el MBI fue significativamente menor que en controles, y las calorías totales estuvieron incluso inversamente correlacionadas con el peso ($p = 0,029$) y la masa corporal delgada ($p = 0,004$).

45 Estas observaciones confirman que el equilibrio del peso es temprano anormal en EH. Incluso en portadores premanifiestos, el patrón nutricional de pacientes con EH se diferenció del de controles; tuvieron aporte calórico significativamente mayor (2195 ± 495 , $n = 15$ frente a 1665 ± 305 , $n = 21$, $p < 0,001$) y mayor ingesta de proteínas (85 ± 24 , $n = 15$ frente a 70 ± 14 , $n = 21$, $p = 0,025$). Estas observaciones muestran claramente hipercatabolismo en el grupo de EH, incluso en las fases muy tempranas de la enfermedad. La relación con la enfermedad no se explicó por causas comunes de hipercatabolismo tales como inflamación o disfunciones endocrinas clásicas. De hecho, ERS, CRP, interleucinas del suero 1 β y 6 y cortisol en ayunas del suero, T4L y TSH fueron similares en los grupos de EH y de control. No hubo glicosuria, y glucemia en ayunas, y los niveles de insulina estuvieron en el intervalo normal en el grupo de EH.

Identificación de biomarcadores candidatos por espectroscopía de RMN ¹H en plasma (Figuras 1 y 2)

50 PCA en espectros de RMN en plasma no identificaron valores atípicos de tanto el conjunto de datos de control como de EH. Los análisis de PLS pudieron distinguir individuos con EH en diferentes etapas de la enfermedad, que significa que los metabolitos en plasma subyacentes se comportaron de forma diferente. La diferencia entre portadores premanifiestos y EH temprana fue evidente (Figura 1a), y se prolongó a etapas más avanzadas de la enfermedad (Figura 1b). Además, los controles y portadores premanifiestos no tuvieron el mismo perfil metabólico, a pesar de algún solapamiento (Figura 1c).

65 La región espectral que contribuyó a las diferencias entre los grupos de EH determinadas de los diagramas de contribución de PLS se muestra en la Figura 2. Se comparó el perfil metabólico en plasma de pacientes con EH

afectados tempranos con premanifiestos, además de pacientes con EH levemente afectados a afectados temprano. Hubo una disminución significativa ($>2DE$) junto con la progresión de la enfermedad en las concentraciones plasmáticas de un grupo de variables de los cubos localizados entre 0,9 y 1,05 ppm en el espectro de RMN. Estos picos se corresponden con los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), valina, leucina e isoleucina. No se detectaron otras diferencias significativas entre los grupos en los espectros aún cuando se analizaron cubos muy pequeños (0,02 ppm). Esto indica que una disminución selectiva en las concentraciones de BCAA acompaña a la progresión de la enfermedad, e incluso distingue portadores premanifiestos de tanto controles como pacientes con EH temprana. Los niveles de BCAA en plasma parecen, por tanto, ser biomarcadores relevantes de EH.

10 **Confirmación de que BCAA están afectados en EH (Figuras 3 y 4)**

Para confirmar que los BCAA están afectados en EH, los presentes inventores también midieron sus concentraciones en plasma por cromatografía de intercambio iónico. Los niveles de valina, leucina e isoleucina fueron significativamente menores en el grupo de EH en comparación con controles ($p=0,009$, $p<0,001$ y $p=0,002$, respectivamente). Además, los niveles de cada BCAA se correlacionaron significativamente con la pérdida de peso observada en los pacientes ($p=0,005$, $0,002$ y $0,014$ respectivamente). Y, lo que es más importante, los niveles de BCAA se correlacionaron negativamente con los valores de UHDRS ($p=0,017$, $<0,0001$ y $0,003$ respectivamente) en tanto hombres ($p=0,035$, $0,019$ y $0,036$ respectivamente) como mujeres ($p=0,007$ para leucina y $0,01$ para isoleucina). Aunque los valores de MBI de mujeres con EH fueron similares a los controles, tuvieron niveles de leucina ($p=0,002$) e isoleucina ($p=0,014$) significativamente menores (Figura 3). Esto indica que niveles de BCAA menores no solo están asociados al equilibrio de peso, sino, lo que es más importante, a la propia enfermedad de Huntington. De forma interesante, los niveles en plasma de los tres BCAA fueron significativamente menores en pacientes en una etapa temprana de la enfermedad en comparación con portadores premanifiestos ($p=0,042$, $0,019$ y $0,024$ respectivamente). Los niveles de BCAA están, por tanto, asociados a la aparición de enfermedad, enfatizando que pueden usarse como biomarcadores fiables en EH. Cuando se comparan portadores premanifiestos con controles, los niveles en plasma de valina (228 ± 50 frente a 245 ± 44), leucina (130 ± 24 frente a 144 ± 23) e isoleucina (62 ± 12 frente a 68 ± 15) fueron menores en el primer grupo, aunque no significativamente. Esto es probable debido a la heterogeneidad del grupo premanifiesto en el que se espera que el tiempo estimado hasta la aparición de la enfermedad varíe entre individuos, de manera que el perfil metabólico de algunos portadores premanifiestos puede ser similar a controles.

Un PCA multifactorial confirma que hay una fuerte correlación negativa entre marcadores clínicos (tamaño anormal de la expansión de la repetición CAG, puntuaciones UHDRS, puntuaciones de depresión) y parámetros de peso (Figura 4). Valores de BCAA bajos parecen ser las variables más fuertes que se correlacionan negativamente con EH y se correlacionan positivamente con pérdida de peso. Los números de repeticiones CAG también se correlacionan negativamente con valores de BCAA: cuanto más larga sea la repetición, menores serán los valores ($p=0,015$ para valina, $0,018$ para leucina y $0,020$ para isoleucina).

Los otros marcadores metabólicos (colesterol y triglicéridos en suero, restantes aminoácidos y acilcarnitinas en plasma, ácidos orgánicos en orina) fueron similares en el grupo de EH y en controles. Sin embargo, los niveles de IGF1 fueron significativamente menores en el grupo de EH ($p=0,011$) y se correlacionaron negativamente con puntuaciones UHDRS ($p=0,004$). Los niveles de IGF1 también se correlacionaron con los niveles de leucina ($p=0,04$) e isoleucina ($p=0,02$), que era de esperar ya que el IGF1 está regulado por BCAA. Sin embargo, esto tiene que modularse por el hecho de que se sabe que los niveles de IGF1 se reducen con la edad, como se observa en la cohorte de EH de los presentes inventores ($p=0,002$). La disminución en los niveles de IGF1 no se asoció a cambios significativos en otros parámetros nutricionales (albúmina, prealbúmina, orosomucoide). No hubo correlación tanto entre los niveles de IGF1 como los parámetros asociados al peso (MBI, masa corporal delgada y grasa) o ingesta de alimentos.

50 **Discusión**

Esta es la primera investigación amplia de trastorno del peso en EH. Los presentes inventores han mostrado que la pérdida de peso empieza pronto en la enfermedad, a pesar del mayor aporte calórico, y es evidente incluso en portadores de mutación premanifiestos y aquellos con poca o ninguna enfermedad. Este hipermetabolismo no puede explicarse por mecanismos comunes como inflamación o funciones endocrinas alteradas, ambas de las cuales se han incriminado en la patofisiología de EH (Kremer et al. 1989; Pavese et al. 2006). El hipermetabolismo en EH parece, por tanto, ser parte del proceso patológico inducido por la enfermedad. Los análisis de espectroscopía de RMN 1H de los presentes inventores muestran que los pacientes en diferentes etapas de EH puede distinguirse entre sí, y los portadores de mutación premanifiestos pueden distinguirse de controles, basándose en sus niveles en plasma de aminoácidos de cadena ramificada. La disminución en los niveles de estos aminoácidos se correlacionó con la pérdida de peso en pacientes con EH, pero lo que es más importante, con la gravedad de la alteración clínica, es decir, con la propia enfermedad de Huntington. Este hallazgo está soportado por estudios previos en los que una disminución en BCAA en plasma se documentó en pacientes con EH más gravemente afectados (Perry et al. 1969; Phillipson y Bird 1977; Reilmann et al. 1995). El amplio cribado metabólico que realizaron los presentes inventores en combinación con una técnica independiente confirmó que BCAA en plasma fueron los únicos metabolitos que se diferenciaron entre el grupo de EH y controles. Esta diferencia existió independientemente del sexo y entre pacientes

en una etapa temprana de la enfermedad y portadores premanifiestos. Por consiguiente, los BCAA en plasma pueden considerarse biomarcadores relevantes para enfermedad de Huntington. Deben ayudar a detectar la aparición de la enfermedad y monitorizar su progresión en vista de ensayos terapéuticos. Para conocimiento de los presentes inventores, este es el primer biomarcador accesible identificado en enfermedad de Huntington y, más ampliamente, el primer biomarcador periférico demostrado en un trastorno neurodegenerativo.

Solo algunos estudios metabonómicos han conducido a la identificación de biomarcadores que pueden usarse rutinariamente para el seguimiento de pacientes (Sabatine et al. 2005). Se sabe que la variabilidad inter-individual complica tales análisis en los líquidos del cuerpo humano, limitando así los estudios metabonómicos esencialmente a modelos animales (Wagner et al. 2006). Sesgos experimentales y analíticos comunes en seres humanos incluyen ingesta dietética, tiempo de recogida de muestras, acondicionamiento de muestras y desplazamientos químicos debido a cambios en el pH (Cloarec et al. 2005; Teahan et al. 2006; Walsh et al. 2006). En el presente estudio, cada uno de estos parámetros se controló rigurosamente. Esto explica probablemente la exactitud de los hallazgos de RMN de los presentes inventores.

La implicación de BCAA en el metabolismo intermedio mitocondrial, tanto en el cerebro como en tejidos periféricos, soporta adicionalmente una función importante para el déficit de energía en EH. Se mostró una reducción en la producción de ATP en cerebro de ratones con EH, que incluyen ratones presintomáticos (Gines et al. 2003). Una reducción significativa en los niveles de ATP y respiración mitocondrial también se demostró en células estriatales de ratones con EH, aunque los complejos de la cadena respiratoria no se alteraron (Milakovic y Johnson 2005). En pacientes con EH, hay una fuerte evidencia de hipometabolismo en el cerebro en el que se reduce el consumo de glucosa, especialmente en los ganglios basales, incluso en portadores de mutación presintomáticos (Grafton et al. 1992; Kuwert et al. 1993; Antonini et al. 1996). La causa subyacente de este déficit de energía temprano en cerebro con EH es actualmente desconocida, pero la glicólisis alterada (Browne y Beal 2004), el ciclo del ácido cítrico (Tabrizi et al. 1999) y/o la fosforilación oxidativa (Milakovic y Johnson 2005) pueden participar. Recientemente, se mostró que la huntingtina mutada reducía la expresión de PGC-1 α (co-activador-1 α del receptor gamma activado por proliferadores del peroxisoma) en el estriado de ratones y pacientes con EH, mediante una inhibición transcripcional dependiente de CREB (Cui et al. 2006). PGC-1 α es un co-activador transcripcional que regula vías metabólicas energéticas clave, tanto en el cerebro como tejidos periféricos (Lin et al. 2005). La posible función de PGC-1 α en EH se sospechó inicialmente de la observación de lesiones estriatales selectiva en el ratón inactivado en PGC-1 α (Lin et al. 2004). Entonces se mostró que la regulación por disminución de PGC-1 α en estriado de EH afectaba el metabolismo de la energía mitocondrial, posiblemente alterando la fosforilación oxidativa (Cui et al. 2006). Además, la inhibición de la succinato deshidrogenasa, por ácido 3-nitropropiónico o malonato, imita la neuropatología de la EH en ratones (Klivenyi et al. 2004), que indica que una ausencia de sustratos para el ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria participa en el déficit de energía en cerebro con EH. Y, lo que es más importante, la oxidación mitocondrial de BCAA conduce a la producción de acetil-CoA y succinil-CoA, dos productos intermedios clave del ciclo del ácido cítrico. Se excluyó aporte calórico o de proteínas insuficiente en el estudio de los presentes inventores, además de alteración de la vía de oxidación de BCAA, ya que los niveles de ácido orgánico en orina fueron normales. Por tanto, la disminución en BCAA en plasma observada en el grupo de EH probablemente resultó de la activación de un mecanismo compensatorio para proporcionar sustratos de energía al ciclo del ácido cítrico, como se describe en diversas enfermedades productoras de caquexia (Szpetnar et al. 2004; De Bandt y Cynober 2006). La correlación entre los reducidos niveles de BCAA y la pérdida de peso en el estudio de los presentes inventores sugiere que excesiva movilización y oxidación de BCAA para producir energía en músculo está asociada a pérdida de peso y reducida masa corporal delgada. La observación de pérdida de peso antes de la disminución neurocognitiva sugiere que los síntomas neurológicos se agravan cuando los sustratos de la periferia se vuelven insuficientes para compensar el déficit de energía en el cerebro con EH. La tasa normal de consumo de oxígeno recientemente observada después de la infusión estriatal de succinato (Weydt et al. 2006) soporta la idea de que proporcionar energía mediante un aumento en tanto productos intermedios del ciclo del ácido cítrico sistémico como cerebral puede ser un enfoque terapéutico prometedor en EH.

Al nivel patofisiológico, el estudio de los presentes inventores también mostró que los bajos niveles de BCAA en plasma producen bajos niveles de IGF1 en el grupo de EH en comparación con los controles, aunque tienen un mayor aporte de proteínas y calórico. La estrecha conexión entre IGF1 y aminoácidos esenciales se ha estudiado ampliamente (Straus y Takemoto 1988; Harp et al. 1991; Thissen et al. 1994; Gomez-Merino et al. 2004). La disponibilidad de aminoácidos esenciales parece tener un mayor efecto sobre la expresión génica de IGF1 que estímulos hormonales tales como concentraciones de insulina en suero (Maiter et al. 1989). IGF1 también es un indicador más sensible de la saciedad de nutrientes que la albúmina, prealbúmina u orosomucoide, como se observa en el estudio de los presentes inventores. De forma interesante, la huntingtina es un sustrato de la vía de serina-treonina Akt, que se activa por IGF1 (Humbert et al. 2002). Se ha mostrado que la activación alterada de la vía de Akt reduce la fosforilación de la huntingtina mutada, produciendo una elevada toxicidad neuronal (Rangone et al. 2005). Bajos niveles de IGF 1 en pacientes con EH podrían, por tanto, proporcionar una explicación de la alteración en la activación de Akt observada en modelos celulares de EH. Por consiguiente, aumentando los niveles de BCAA para corregir el déficit en IGF1, debe favorecer la fosforilación de huntingtina mutada, disminuyendo así su toxicidad.

En conclusión, la combinación de una rigurosa evaluación nutricional y herramientas metabonómicas ha proporcionado una nueva perspectiva en EH. Los presentes inventores han demostrado la existencia de una

deficiencia de energía temprana en este trastorno neurodegenerativo, reflejado por la pérdida de peso. Los presentes inventores también han identificado el primer biomarcador fiable en enfermedad de Huntington. La evidencia de la disminución de los niveles de BCAA en plasma en fases muy tempranas de EH resalta la posibilidad de terapias que pretenden suministrar un conjunto suficiente de acetil-CoA para compensar el déficit de energía temprano.

En conjunto, estos datos son de ayuda de una función causante para la deficiencia de energía en enfermedad de Huntington. En vez de un defecto en la cadena respiratoria, bajos niveles de BCAA en plasma indican una alteración energética en el ciclo de Krebs. Por tanto, moléculas seleccionadas para su capacidad para invertir esta deficiencia en la producción de ATP mitocondrial deben rellenar el conjunto de productos intermedios catalíticos del ciclo de Krebs. Compuestos dietéticos tales como triheptanoína se han usado recientemente en ensayos terapéuticos humanos para su capacidad para rellenar los conjuntos de productos intermedios catalíticos del ciclo de Krebs, un proceso energético clave llamado anaplerosis. Debido a la evidencia adicional de los metabolitos de triheptanoína para cruzar la barrera hematoencefálica, las terapias anapleróticas representan moléculas prometedoras para invertir la deficiencia de energía asociada a enfermedades neurodegenerativas y así corregir algunas, si no todas, las manifestaciones clínicas de estas enfermedades.

Material y métodos

Pacientes con EH, portadores premanifiestos y controles

Los presentes inventores incluyeron 32 individuos con expansiones de repeticiones CAG anormales (>36) en el gen HD1 (19 mujeres y 13 hombres) y 21 controles (13 mujeres y 8 hombres). En el grupo de EH, 15 fueron portadores premanifiestos que se habían aplicado anteriormente para la prueba predictiva debido a su riesgo de EH, 10 estuvieron en una etapa muy temprana de la enfermedad y 7 tuvieron signos moderados de la enfermedad. Los controles fueron voluntarios sanos en el mismo intervalo de edad, sin relacionar con individuos con EH. Se examinaron todos los participantes y se tomaron muestras de sangre durante una única visita al centro de referencia para EH en el Hospital Salpêtrière (París). Los pacientes, portadores premanifiestos y controles se enrolaron en un protocolo clínico autorizado por Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (CRC 05129), y autorizado por el comité ético local. Se obtuvo el consentimiento informado para todos los participantes.

Determinación del equilibrio de peso e ingesta de alimentos

Se registraron la altura y peso el día del examen clínico. La pérdida de peso se calculó restando el peso actual del peso del paciente 5 años antes de la inclusión en el estudio. Esta información se obtuvo durante la entrevista y se verificó retrospectivamente de los archivos médicos del paciente. El índice de masa corporal (MBI) se obtuvo dividiendo el peso (en kilogramos) entre la altura (en metros) al cuadrado. Se midió la impedancia bioeléctrica (Tanita®) para evaluar la masa delgada y la masa grasa de todos los participantes (Segal et al. 1988).

Para determinar la ingesta de alimentos, los pacientes con EH en fases tempranas, portadores premanifiestos y controles registraron prospectivamente su ingesta de alimentos normal durante 3 días previos a su examen. La exactitud del registro de 3 días se verificó un mes después con un cuestionario que evaluaba la ingesta de alimentos durante un periodo de 24 horas que se envió a las casas de todos los participantes. Un dietista profesional (CG) usó estos dos documentos para calcular las calorías totales medias, y el consumo de proteínas, lípidos y azúcares para tanto los grupos de EH como de control usando un sistema automatizado (Diaeta software®).

Evaluación multiparamétrica del equilibrio de peso

Se diseñó un protocolo normalizado para evaluar minuciosamente todas las posibles causas de pérdida de peso y para evitar sesgos relacionados con la ingesta de alimentos y cambios circadianos. Incluyó secuencialmente: (i) un ayuno mínimo de 12 horas la noche antes del examen, (ii) y recogida de sangre y orina por la mañana a la misma hora (9 am). Las muestras se almacenaron sobre hielo para análisis inmediatos o se congelaron a -80 °C para análisis adicionales.

Los análisis estándar incluyeron hemograma, glucosa en sangre y orina, electrolitos en suero y parámetros nutricionales básicos, tales como colesterol en suero, triglicéridos, albúmina, prealbúmina y orosomucoide. Para refinar la evaluación de la saciedad de nutrientes, se midieron concentraciones del factor de crecimiento de insulina en suero tipo 1 (IGF1) usando un ensayo inmunoradiométrico específico (RIACT de IGF1, Cis-Bio International, Gif-sur-Yvette, Francia). Se explotaron los tres ejes principales implicados en la regulación del equilibrio del peso: inflamación, función endocrina y metabolismo intermedio. La evaluación de la inflamación incluyó la determinación de la tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR) y la cuantificación de proteína C reactiva (CRP) y las interleucinas del suero IL1 β e IL6 por ELISA (Diacione, Besançon, Francia). Además de IGF1 en suero, la evaluación endocrina básica incluyó mediciones de cortisol en suero en ayunas (a 9 am), tetrayodotironina (T4L), hormona estimulante tiroidea (TSH) e insulina (insulina ultrasensible Elisa Access, Beckman Coulter, Roissy, Francia).

Los presentes inventores exploraron el metabolismo intermedio mediante el análisis de (i) aminoácidos en plasma

usando cromatografía de intercambio iónico después de la coloración por ninhidrina (Aminotag, Geol), (ii) ácidos orgánicos en orina por cromatografía de gases (GS Variant 3400) acoplados a espectrometría de masas (trampa de iones, Saturn 2000, Variant) después de la extracción con acetato de etilo y derivación por silylación, (iii) el perfil de acilcarnitinas en plasma por espectrometría de masas en tándem (Applied Biosystems) con ionización por electropulverización (ESI) y FIA (análisis de inyección de flujo). Las acilcarnitinas se identificaron usando un barrido con ión precursor m/z 85 y se cuantificaron en modo MRM (monitorización de reacciones múltiples). Se usaron los niveles de acetilcarnitina (carnitina C2) para medir el estado en ayunas de tanto individuos con EH como controles (Costa et al. 1999).

10 **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ¹H en plasma**

Se prepararon muestras de plasma para espectroscopia de RMN ¹H con manipulación mínima. Las muestras de plasma se desproteínan usando un filtro de 10 kDa (Nanosep, Omega) para evitar la interferencia de especies de alto peso molecular tales como lipoproteínas. Antes de uso, el filtro se lavó dos veces con agua por centrifugación para eliminar el glicerol. Se añadió una alícuota de 100 µl de ácido [trimetilsilil]-2,2,3,3-tetradeuteropropiónico 3,89 mM en 2H₂O (TSP-²H₂O, Aldrich) a 500 µl de ultrafiltrado, proporcionando una referencia de desplazamiento químico ($\delta = 0,00$ ppm), una referencia de concentración y una señal de bloqueo de deuterio. El pH del ultrafiltrado se ajustó a $2,50 \pm 0,05$ con HCl concentrado. Finalmente, se dispusieron 500 µl de la muestra en un tubo de RMN de 5 mm (Wilmad Royal Imperial). Los espectros de RMN ¹H se determinaron en un espectrómetro Avance-500 SB (Bruker, Francia) equipado con una sonda BBI (inversa de banda ancha) de 5 mm; las muestras no se centrifugaron. Los espectros se recogieron a 25 °C y consistieron en puntos de datos de 32K con una anchura espectral de 6.000 Hz y un tiempo de adquisición total de 27 min. Se usó un pulso de radiofrecuencia a 90°, tras una presaturación de la señal de agua de 10 s, para cada 128 barridos. La compensación de la muestra se realizó automáticamente sobre la señal de deuterio. Las anchuras de las líneas de resonancia para TSP y metabolitos fueron <1 Hz. Antes de una transformación de Fourier en puntos de datos de 64K, se usó un filtro cuadrado de campana sinusoidal (SSB=2) para reducir el ruido. La fase y el nivel inicial se corrigieron manualmente usando el software del espectrómetro (X-Win NMR 3.5, Bruker, Francia). Los espectros de RMN se analizaron primero individualmente con el fin de detectar señales anormales - es decir, tratamiento o alimento especial - que podría interferir adicionalmente con análisis globales. Para análisis estadísticos, los espectros se redujeron a datos en formato numérico integrando las regiones espectrales (cubos) cada 0,02 ppm y se escalaron a la intensidad total del espectro con el software Amix 3.6.8 (Bruker Analytische Messtechnik, Alemania) de 0,8 a 8,6 ppm, excluyéndose el área de pico del agua de cada espectro (4,4 a 5,2 ppm). Por consiguiente, cada cubo del espectro de RMN se correspondió con una única variable.

35 **Análisis estadísticos**

Los estudios metabonómicos consisten en análisis estadísticos multifactoriales, por ejemplo, análisis de componentes principales (PCA) y análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS), con tanto componentes como variables. Los análisis multifactoriales de los datos obtenidos por espectroscopía de RMN se realizaron con el software Simca-P® 11.0 (Umetrics, Suecia). Para PCA y PLS, los datos escalados a la varianza unidad se usaron para garantizar la inclusión de metabolitos presentes en tanto concentraciones altas como bajas. Cada variable se centró en la media y se calculó como $1/SD_j$, desviación estándar de la variable j calculada alrededor de la media. PCA considera cada cubo del espectro de RMN como una variable X y se usó, por tanto, para diferenciar la presencia de similitudes inherentes entre perfiles espectrales y para identificar valores atípicos. PLS es una extensión de regresión de PCA y describe mejor la variación dentro de los datos según una clasificación a priori, correspondientes a una variable Y, que era la puntuación UHDRS en el estudio de los presentes inventores. Se usó PLS para identificar componentes principales que maximizaran la covarianza entre todas las variables X (espectro de RMN) e Y (UHDRS). La mayor dispersión de los perfiles espectrales se observa normalmente mejor en los dos primeros componentes de los análisis. El primer y segundo componentes en el espacio X (espectro de RMN) se indicaron PC[1] y PC[2], respectivamente. Por tanto, la representación de la puntuación PLS (PC[1]/PC[2]) de grupos comparados en parejas mostraron la mayor variación dentro del espectro de RMN según UHDRS. La validez de cada componente se obtuvo por validación cruzada. El diagrama de contribución se analizó entonces con el fin de determinar el peso respectivo de las variables que contribuyen principalmente a la separación entre grupos.

Para la comparación de medias se usaron ANOVA o pruebas no paramétricas cuando convenga (software SPSS®). Como el estudio de los presentes inventores se basó en un enfoque multiparamétrico, los presentes inventores también realizaron PCA para buscar posibles correlaciones entre los diferentes parámetros que se analizaron (software Simca-P®).

60 **Referencias**

Antonini A, Leenders KL, Spiegel R, et al. (1996). "Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease." *Brain* 119 (Pt 6): 2085-95.
 Browne SE and Beal MF (2004). "The energetics of Huntington's disease." *Neurochem Res* 29 (3): 531-46.
 Cloarec O, Dumas ME, Trygg J, et al. (2005). "Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1H NMR spectroscopic metabonomic studies." *Anal Chem* 77 (2): 517-26.

- Costa CC, de Almeida IT, Jakobs C, Poll-The BT and Duran M (1999). "Dynamic changes of plasma acylcarnitine levels induced by fasting and sunflower oil challenge test in children." *Pediatr Res* 46 (4): 440-4.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N and Krainc D (2006). "Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration." *Cell* 127 (1): 59-69.
- 5 De Bandt JP and Cynober L (2006). "Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma, and sepsis." *J Nutr* 136 (1 Suppl): 308S-13S.
- Gines S, Seong IS, Fossale E, et al. (2003). "Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice." *Hum Mol Genet* 12 (5): 497-508.
- 10 Gomez-Merino D, Chennaoui M, Drogou C and Guezennec CY (2004). "Influence of energy deficiency on the insulin-like growth factor I axis in a military training program." *Horm Metab Res* 36 (7): 506-11.
- Grafton ST, Mazziotta JC, Pahl JJ, et al. (1992). "Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease." *Arch Neurol* 49 (11): 1161-7.
- Harp JB, Goldstein S and Phillips LS (1991). "Nutrition and somatomedin. XXIII. Molecular regulation of IGF-I by amino acid availability in cultured hepatocytes." *Diabetes* 40 (1): 95-101.
- 15 Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, et al. (2002). "The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt." *Dev Cell* 2 (6): 831-7.
- Klivenyi P, Starkov AA, Calingasan NY, et al. (2004). "Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity." *J Neurochem* 88 (6): 1352-60.
- 20 Kremer HP, Roos RA, Frolich M, Radder JK, Nieuwenhuijzen Kruseman AC, Van der Velde A and Buruma OJ (1989). "Endocrine functions in Huntington's disease. A two-and-a-half years follow-up study." *J Neurol Sci* 90 (3): 335-44.
- Kuwert T, Lange HW, Boecker H, et al. (1993). "Striatal glucose consumption in chorea-free subjects at risk of Huntington's disease." *J Neurol* 241 (1): 31-6.
- 25 Lin J, Handschin C and Spiegelman BM (2005). "Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators." *Cell Metab* 1 (6): 361-70.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, et al. (2004). "Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 alpha null mice." *Cell* 119 (1): 121-35.
- 30 Maiter D, Fliesen T, Underwood LE, Maes M, Gerard G, Davenport ML and Ketelslegers JM (1989). "Dietary protein restriction decreases insulin-like growth factor I independent of insulin and liver growth hormone binding." *Endocrinology* 124 (5): 2604-11.
- Milakovic T and Johnson GV (2005). "mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin." *J Biol Chem* 280 (35): 30773-82.
- Pavese N, Gerhard A, Tai YF, et al. (2006). "Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study." *Neurology* 66 (11): 1638-43.
- 35 Perry TL, Diamond S, Hansen S and Stedman D (1969). "Plasma-aminoacid levels in Huntington's chorea." *Lancet* 1 (7599): 806-8.
- Phillipson OT and Bird ED (1977). "Plasma glucose, non-esterified fatty acids and amino acids in Huntington's chorea." *Clin Sci Mol Med* 52 (3): 311-8.
- 40 Rangone H, Pardo R, Colin E, Girault JA, Saudou F and Humbert S (2005). "Phosphorylation of arfaptin 2 at Ser260 by Akt Inhibits PolyQ-huntingtin-induced toxicity by rescuing proteasome impairment." *J Biol Chem* 280 (23): 22021-8.
- Reilmann R, Rolf LH and Lange HW (1995). "Decreased plasma alanine and isoleucine in Huntington's disease." *Acta Neurol Scand* 91 (3): 222-4.
- 45 Sabatine MS, Liu E, Morrow DA, et al. (2005). "Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia." *Circulation* 112 (25): 3868-75.
- Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI, Hodgdon JA and Van Itallie TB (1988). "Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study." *Am J Clin Nutr* 47 (1): 7-14.
- Straus DS and Takemoto CD (1988). "Regulation of albumin mRNA in H4 rat hepatoma cells by the availability of essential amino acids." *Biochim Biophys Acta* 972 (1): 33-6.
- 50 Szpetnar M, Pasternak K and Boguszewska A (2004). "Branched chain amino acids (BCAAs) in heart diseases (ischaemic heart disease and myocardial infarction)." *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 59 (2): 91-5.
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM and Schapira AH (1999). "Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain." *Ann Neurol* 45 (1): 25-32.
- 55 Teahan O, Gamble S, Holmes E, Waxman J, Nicholson JK, Bevan C and Keun HC (2006). "Impact of analytical bias in metabolomic studies of human blood serum and plasma." *Anal Chem* 78 (13): 4307-18.
- Thissen JP, Ketelslegers JM and Underwood LE (1994). "Nutritional regulation of the insulin-like growth factors." *Endocr Rev* 15 (1): 80-101.
- 60 Wagner S, Scholz K, Donegan 11, Burton L, Wingate J and Volkel W (2006). "Metabonomics and biomarker discovery: LC-MS metabolic profiling and constant neutral loss scanning combined with multivariate data analysis for mercapturic acid analysis." *Anal Chem* 78 (4): 1296-305.
- Walsh MC, Brennan L, Malthouse JP, Roche HM and Gibney MJ (2006). "Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans." *Am J Clin Nutr* 84 (3): 531-9.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, et al. (2006). "Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration." *Cell Metab* 4 (5): 349-62.
- 65

Ejemplo 2: Terapia con triheptanoína de modelos de ratón con EH**Objetivos del estudio**

5 Se realiza un estudio piloto para probar el efecto de la terapia con triheptanoína dietética frente a la dieta de control en cepas seleccionadas de ratones EH R6/2 (Mangariani 1996, Cell 87: 493-506, Kosinski 1999, Neuroreport 10: 3891-6). El estudio incluye (i) medir tasas de anaplerosis cerebral de heptanoato y ATP en cerebro en ratones R6/2 de diferentes edades y en ratones de control con el fin de demostrar la capacidad de los metabolitos de triheptanoína para cruzar la barrera hematoencefálica de ratones R6/2 y para invertir el déficit de energía central: (ii) evaluar la eficacia terapéutica de la triheptanoína por prueba de comportamiento precisa, microdiálisis cerebral *in vivo* (para ensayar neurotransmisores, metabolitos de triheptanoína y BCAA) y examen neuropatológico; (iii) análisis metabolómicos en plasma y orina de ratón.

Métodos de investigación

15 Ratones R6/2 y de control, con dietas enriquecidas en triheptanoína y de control, se infunden secuencialmente - a 4, 8 y 12 semanas - con diversas dosis de [5,6,7-¹³C₃] heptanoato (por sonda nasogástrica o por infusión intravenosa) durante 1 h antes del muestreo del cerebro, con el fin de seguir la cinética de anaplerosis en el cerebro (usando el ensayo de ésteres de CoA anapleróticos). Las concentraciones de ATP, ADP y AMP se ensayan en todas las muestras de cerebro, además de en músculo de ratones R6/2. Los presentes inventores también están evaluando la concentración y el patrón de marcado de neurotransmisores generados por anaplerosis (GABA, glutamato) para determinar si el cerebro es deficiente en estos compuestos y si la terapia anaplerótica mejora estos parámetros. Se almacenan tejidos cerebrales a -70 °C en vista de posibles análisis adicionales (como medición de estrés oxidativo).

25 Las análisis de comportamiento incluyen (i) monitorización de la actividad en campo abierto usando el sistema TruScan 4, 8 y 12 semanas; (ii) análisis en RotaRod realizados usando el sistema AccuScan equipado con un suelo sacudible a 6 y 12 semanas; (iii) y el laberinto de agua de Morris, la tarea más popular en la neurociencia del comportamiento usada para evaluar el aprendizaje espacial y la memoria a las 12 semanas. Otros criterios primarios de evaluación del estudio son la pérdida de peso y la supervivencia.

30 Como tanto los pacientes con EH como los modelos de ratón genético de EH manifiestan una pérdida presintomática de receptores de DA, puede estar implicada una neurotransmisión dopaminérgica disfuncional en la presentación de EH temprana. Más estudios recientes han mostrado que la liberación de DA está gravemente comprometida en ratones R6/2 (Johnson 2006, J Neurochem 97: 737-46). Por consiguiente, un primer grupo de animales se sacrifica a las 12 semanas por dislocación cervical para análisis de neurotransmisores. Se recoge sangre y el tejido cerebral se extrae rápidamente y se disecciona sobre hielo en las siguientes regiones: estriado, hipocampo, corteza frontal, corteza posterior, cerebelo y mesencéfalo. Estas regiones se diseccionan tanto para el hemisferio izquierdo como para el derecho del cerebro. Todas las regiones laterales derechas se procesan para análisis de DA, 5-hidroxitriptófano (5-HT) y norepinefrina (NE) y metabolitos relacionados (ácido 3-dihidrofenilacético, ácido homovalínico, 3-metoxidramina y ácido 5-hidroxiindolacético) por HPLC con detección electroquímica. También se mide acetilcolina (ACh) en tejido de la corteza posterior frontal por HPLC con detección electroquímica. Se miden aminoácidos de cadena ramificada por HPLC y metabolitos de triheptanoína por espectrometría de masas. Se realiza neuropatología, y especialmente las inclusiones neuronales nucleares, en las regiones laterales izquierdas. A las 12 semanas, se prepara un segundo grupo de animales para microdiálisis *in vivo* para monitorizar la liberación *in vivo* de DA, 5-HT por potasio y la liberación de ACh por escopolamina en el estriado. Se comparan cambios en las concentraciones extracelulares de DA, 5-HT y ACh por tres formas ANOVA (tiempo x genotipo x dieta) con medidas repetidas. También se realizan análisis secuenciales de muestras de plasma y de orina de ratones R6/2 y de control a las 4, 8 y 12 semanas con tanto espectrometría de RMN como espectrometría de masas. Esto tiene como objetivo la detección de metabolitos de triheptanoína (derivados de propionilo y pentanoil-CoA) en líquidos corporales de ratones tratados. La comparación del perfil metabólico de ratones R6/2 y de control con dieta de control, por análisis estadísticos de datos multifactoriales, puede posiblemente confirmar la implicación de BCAA en la patofisiología de ratones R6/2, como se demuestra en portadores premanifiestos y pacientes de EH, y parcialmente se sugirió en el estudio metabolómico previo en ratones R6/2 (Underwood 2006, Brain 129: 877-8). Y, lo que es más importante, la comparación del perfil metabólico de ratones R6/2 tratados frente a no tratados puede evaluar si la triheptanoína puede conducir a la corrección de tales perfiles hipercatabólicos.

Ejemplo 3: Terapia de ataxia espinocerebelosa 7 (SCA7)**1/ Ensayo *in vitro***

60 Para crear un modelo simplificado de SCA7 *in vitro*, los presentes inventores usaron cultivos primarios de células cerebelosas disociadas debido a que la lesión del cerebelo, particularmente la capa de células de Purkinje (PC), explica el fenotipo de la ataxia en pacientes con SCA7. Los cultivos celulares cerebelosos de los presentes inventores estuvieron compuestos de células de la glía y neuronas, 5 al 10 % de las cuales expresaron calbindina (CaBP) que las identifica como PC. Para examinar los efectos de ATXNT7 mutante sobre la supervivencia de PC, las células se infectaron en DIV1 (1º día *in vitro*) con vectores lentivirales que llevan formas truncadas de ataxina 7

normal y mutante (ATXN7T: aminoácidos 1-232) fusionadas con GFP (ATXN7T-10Q-GFP, ATXN7T-100Q-GFP). Estos vectores lentivirales permitieron la eficaz expresión de estas proteínas en aproximadamente el 90 % de las neuronas, que incluyen células de Purkinje. La infección por ATXN7T-100Q-GFP condujo a pérdida neuronal masiva, casi exclusivamente en neuronas de Purkinje (~85 % de muerte de células de Purkinje frente a ~20 % de pérdida de otras neuronas), produciendo así una de las principales características de la enfermedad humana (Figura 6).

Este modelo se usa para evaluar la capacidad de moléculas anaploréticas para rescatar células de Purkinje infectadas por ATXN7T-100Q-GFP. Se prueban dos compuestos: el 3-cetovalerato y el 3-hidroxivalerato, ambos de los cuales van a incorporarse directamente por las células en el cultivo. Estas moléculas se añaden al medio de cultivo el mismo día cuando las células se infectan y la mitad del medio se sustituye cada 4 días. Los cultivos se mantienen durante 20 días y el posible rescate de las células de Purkinje se cuantifica como se ha descrito anteriormente.

2/ Experimentos *in vivo*

Los presentes inventores eligieron usar el modelo de ratón inactivado en SCA7 desarrollado en el grupo de H.Y. Zoghbi (Yoo 2003 Neuron, 37: 383-401), que expresa ATXN7 con 266 glutaminas a niveles endógenos en el patrón espacio-temporal apropiado. El ratón Sca7 es altamente homólogo a SCA7 humano, con el 88,7 % de identidad al nivel de proteína. Ratones Sca7^{266Q/5Q} reproducen características de SCA7 infantil, que se caracteriza por una progresión más rápida y un espectro más amplio de fenotipos que la enfermedad de aparición en la adultez. A partir de 5 semanas de vida, estos ratones desarrollan pérdida de peso progresiva, ptosis, alteración visual, temblor, ataxia, atrofia muscular progresiva, cifosis y finalmente mueren a aproximadamente las 14-19 semanas de vida. Los ratones Sca7^{266Q/5Q} manifestaron alteración de la coordinación en la prueba en RotaRod a las 5 semanas. A las 8-9 semanas, la ataxia de la marcha es evidente y la coordinación motora se deteriora adicionalmente. Como en los pacientes, los estudios neuropatológicos revelaron formación de NI progresiva en muchas regiones del cerebro. Aunque no se observa pérdida neuronal en el cerebro, las células de Purkinje, que son una de las células más comúnmente afectadas en SCA7, tienen un tamaño de células corporales reducido.

a- Estudio metabólico de ratones inactivados en SCA7

Similarmente a los pacientes con EH o SCA7, los ratones inactivados en SCA7 muestran una grave pérdida de peso progresiva ya significativa en la aparición del fenotipo motor. El protocolo se ha establecido para medir el consumo de comida y bebida en correlación con la evolución del peso de estos ratones mutantes en comparación con los no mutantes. Este protocolo se prueba en un grupo de 3 hembras inactivadas y 3 hembras no mutantes de las mismas camadas. Los animales se mantienen uno por jaula y se les administra una cantidad definida de comida y bebida. Entonces, se miden su consumo y su peso cuatro veces a la semana. Resultados preliminares muestran que este procedimiento es eficaz en evidenciar la progresiva pérdida de peso y evolución de la ingesta de alimentos (Figura 7). Poco después de la aparición (7-8 semanas), pero antes del grave deterioro motor (8-9 semanas), la ingesta de alimentos de los animales mutantes es mayor que en los no mutantes, aunque ya hay más ligeros. Estos datos son a favor de la hipótesis de un estado hipermetabólico durante las fases tempranas del fenotipo. Después de 8-9 semanas, la alteración locomotora ya es tan incapacitante que los ratones mutantes probablemente no pueden llegar a la comida tan fácilmente como los no mutantes.

b- Análisis de micromatrices de modificaciones transcripcionales tempranas

Se ha propuesto que la alteración metabólica en EH y otras enfermedades relacionadas resulta de la desregulación de las principales vías metabólicas al nivel transcripcional (Mochel 2007 PLoS ONE, 2(7): e647; Cui 2006 Cell 127: 59-69). Considerando la función de la proteína ATXN7 y las anomalías transcripcionales tempranas previamente evidenciadas en SCA7 y otra enfermedad por poliglutamina., el transcriptoma del cerebelo de 4-5 ratones inactivados frente a 4-5 ratones no mutantes se analiza en dos fases tempranas antes de la aparición (día 10 post-natal y día 22 post-natal) y una etapa sintomática tardía (11 semanas de vida).

Ejemplo 4: Evaluación del posible beneficio y seguridad de la terapia anaplerótica en enfermedad de Huntington (EH)

Se realiza un ensayo preclínico de 5 días con triheptanoína en 6 pacientes afectados por EH. Este protocolo a corto plazo es del siguiente modo:

1. **Día 1:** (i) un amplio examen neurológico y clínico general; (ii) un acondicionamiento metabólico global (muestras de sangre y de orina) para tener una visión general del perfil metabólico de pacientes con EH en el nivel inicial; (iii) una biopsia de la piel para probar *in vitro* la capacidad de la triheptanoína para generar energía a partir del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria; (iv) la medición de la actividad de la proteína cinasa activada por 5'AMP (5'AMPK) en fibroblastos de pacientes, como una reflexión de los niveles del metabolismo de energía intracelular; y (v) una espectroscopia de RMN ³¹P en el musculo de pacientes con el fin de evaluar su producción de ATP por músculo esquelético.

2. **Día 2:** una prueba de carga oral de una comida enriquecida con triheptanoína, junto con muestras de orina y de sangre antes y después de la comida para determinar:

- mediciones de metabolitos de triheptanoína, mediante el perfil de acilcarnitinas en plasma y ácidos orgánicos en orina (Roe et al. 2002), para garantizar que la triheptanoína sea apropiadamente metabolizada en pacientes con EH;
- análisis del estado redox mitocondrial, mediante la relación de lactato con respecto a piruvato y 3-hidroxiacetato con respecto a acetoacetato (Mochel et al. 2005), para evaluar *in vivo* la capacidad de la triheptanoína para generar energía a partir del ciclo de Krebs sin sobrecargar la cadena respiratoria.

3. **En los días 3, 4 y 5:** la búsqueda de una dieta enriquecida con triheptanoína para determinar si se produce un efecto de ahorro de proteína, es decir, la normalización de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en plasma y niveles de IGF1 en suero, y/o la elevación de urea urinaria. El examen intenta identificar efectos agudos sobre la deficiencia de energía sistémica (fuerza muscular, función motora) asociada a EH. Además, los pacientes se someten a una segunda espectroscopia de RMN ³¹P de músculo con el fin de evidenciar un posible efecto a corto plazo de triheptanoína en el metabolismo de energía periférica del paciente.

Diseño del estudio

En el primer día del ingreso se examinan los pacientes con EH. Se evalúa la disfunción motora con la escala de clasificación unificada de enfermedad de Huntington UHDRS (Siesling et al. 1998), y una puntuación de capacidad funcional total, TFC (Marder et al. 2000). También se registra la condición de salud general, en particular la historia de disfunción del tubo digestivo. Antes de la comida se recogen muestras de sangre y de orina. Se realizan análisis estándar (hemograma, factores de coagulación de la sangre, glucosa en sangre y orina, electrolitos en suero), además de un acondicionamiento metabólico global que incluye estado redox en plasma (lactato, piruvato, acetoacetato, 3-hidroxiacetato), aminoácidos y acilcarnitinas en plasma, y ácidos orgánicos en la orina como se ha descrito (Mochel et al. 2005). En ausencia de disfunción de coagulación de la sangre se realiza una biopsia de la piel. Se realiza adicionalmente una simple prueba funcional usando propionato marcado con C¹⁴ en fibroblastos cultivados (Benoist et al. 2001). El propionato es uno de los principales productos anapleróticos de la triheptanoína, y se incorpora en la proteína siempre que se produzca suficiente ATP del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. Por tanto, la tasa normal de síntesis de proteínas, después de la incorporación de C¹⁴-propionato, en células de EH refleja la integridad de la cadena respiratoria en EH, además de la posibilidad de generar energía del ciclo de Krebs mediante la vía anaplerótica. La actividad de 5'-AMPK, que detecta cambios en el estado de energía celular, también se determina en fibroblastos de pacientes (Chou et al. 2005), con el fin de evidenciar un déficit periférico en el metabolismo de energía intracelular. Además, el metabolismo mitocondrial oxidativo se evalúa específicamente por espectroscopia de RMN ³¹P de músculo usando datos recogidos al final de un ejercicio dado y durante la posterior recuperación (Lodi et al. 2000).

En el segundo día, los pacientes con EH ingieren una dosis de carga de triheptanoína (1 g/Kg). Por comodidad, y mejor tolerancia digestiva, la triheptanoína se administra normalmente junto con un producto lácteo. Se recogen muestras de sangre repetidas antes y, secuencialmente, después de la comida (30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la ingestión de triheptanoína) para la evaluación del estado redox y el perfil de acilcarnitinas. También se recoge orina antes y después de la carga de triheptanoína (90 y 180 minutos) para análisis de ácidos orgánicos.

En los 3 días siguientes, los pacientes con EH buscan una dieta isocalórica enriquecida con triheptanoína (1 g/kg/día dividida en 3 a 4 comidas). Se analizan BCAA en plasma en ayunas, IGF1 en suero y urea urinaria diariamente y el examen neurológico se repite con puntuación UHDRS y TFC. En el día 5 se repite la espectroscopia de RMN ³¹P de músculo con el fin de determinar las concentraciones relativas de fosfato inorgánico, fosfocreatina y niveles de ATP después de la administración de triheptanoína.

Criterios de selección de pacientes

Este estudio implica 6 pacientes con expansiones de las repeticiones CAG anormales (>36) en el gen HDI, con seguimiento médico y psicológico regular. La selección de pacientes se basa en:

- puntuación UHDRS que oscila de 15 a 50, correspondiente a pacientes en una etapa de temprana a moderada de la enfermedad, con el fin de facilitar el cumplimiento de pacientes con el tratamiento dietético;
- bajos niveles de BCAA en plasma, con el fin de buscar un aumento en estos aminoácidos bajo tratamiento con triheptanoína.

Se obtiene el consentimiento informado para todos los participantes.

Referencias

- Benoist JF, Acquaviva C, Callebaut I, et al. (2001). "Molecular and structural analysis of two novel mutations in a patient with mut(-) methylmalonyl-CoA deficiency." *Mol Genet Metab* 72 (2): 181-4.

- Chou SY, Lee YC, Chen HM, et al. (2005). "CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model." *J Neurochem* 93 (2): 310-20.
- Lodi R, Schapira AH, Manners D, Styles P, Wood NW, Taylor DJ and Warner TT (2000). "Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy." *Ann Neurol* 48 (1): 72-6.
- 5 - Marder K, Zhao H, Myers RH, et al. (2000). "Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group." *Neurology* 54 (2): 452-8.
- Mochel F, DeLonlay P, Touati G, et al. (2005). "Pyruvate carboxylase deficiency: clinical and biochemical response to anaplerotic diet therapy." *Mol Genet Metab* 84 (4): 305-12.
- 10 - Roe CR, Sweetman L, Roe DS, David F and Brunengraber H (2002). "Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride." *J Clin Invest* 110 (2): 259-69.
- Siesling S, van Vugt JP, Zwinderman KA, Kiebertz K and Roos RA (1998). "Unified Huntington's disease rating scale: a follow up." *Mov Disord* 13 (6): 915-9.
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Precursor de propionil-CoA seleccionado del grupo que consiste en ácido graso de siete carbonos, triheptanoína, heptanoato, 3-cetovalerato y 3-hidroxivalerato para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad por poliglutamina.
2. Precursor de propionil-CoA para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad por poliglutamina es la enfermedad de Huntington.
- 10 3. Precursor de propionil-CoA para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el precursor de propionil-CoA es triheptanoína, ácido heptanoico o heptanoato.
- 15 4. Precursor de propionil-CoA para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el precursor de propionil-CoA es triheptanoína.
5. Sustancia alimentaria para su uso en un método para tratar y/o prevenir una enfermedad por poliglutamina, en la que dicha sustancia alimentaria contiene un precursor de propionil-CoA como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 20 6. Sustancia alimentaria para su uso según la reivindicación 5, en la que la enfermedad por poliglutamina es enfermedad de Huntington.

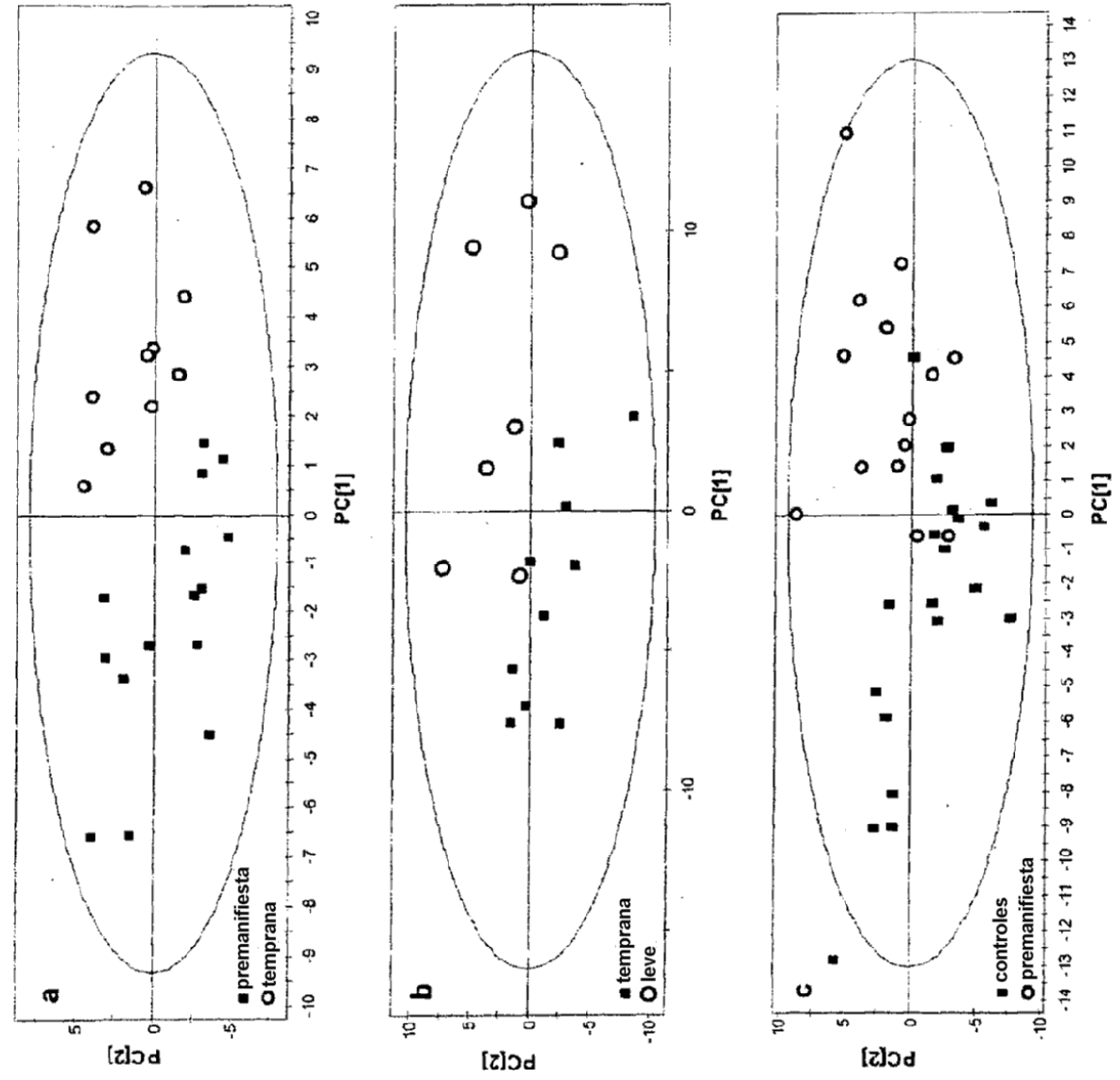


Figura 1

Figura 2

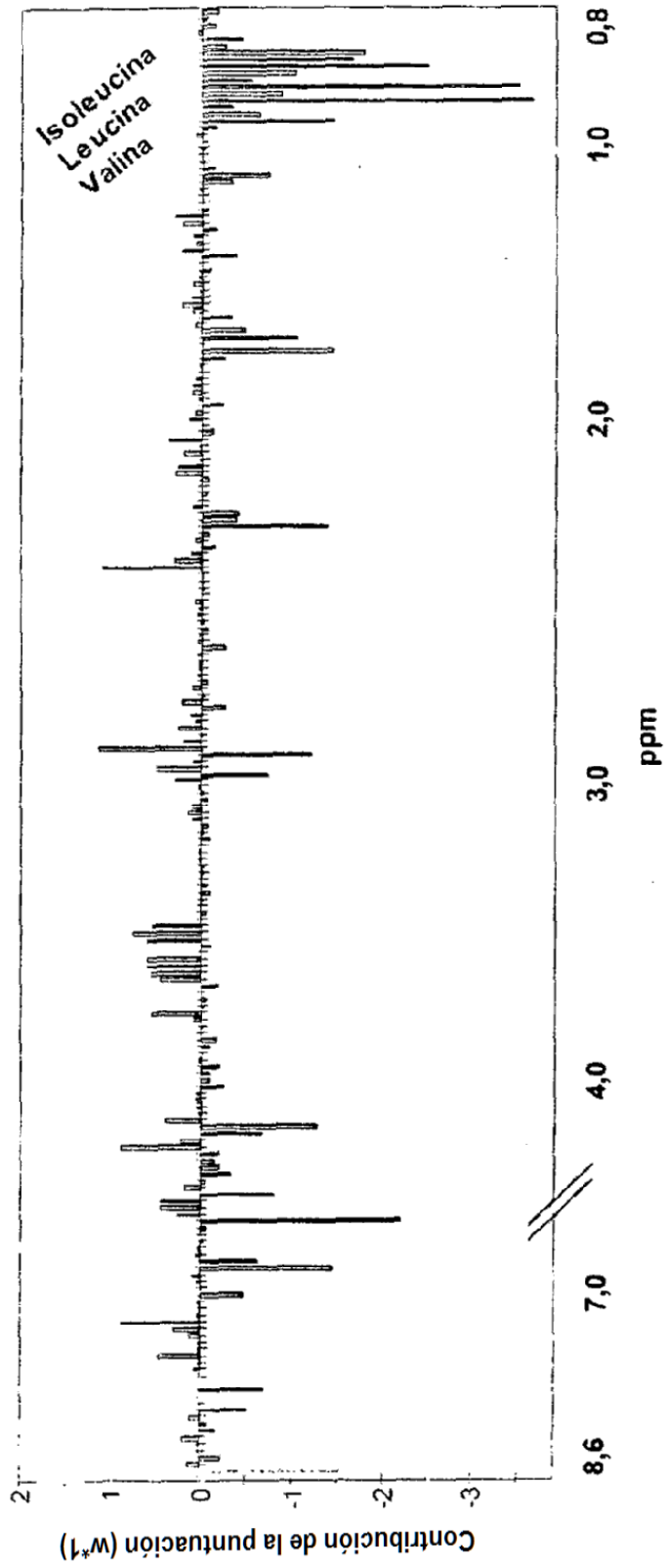


Figura 3

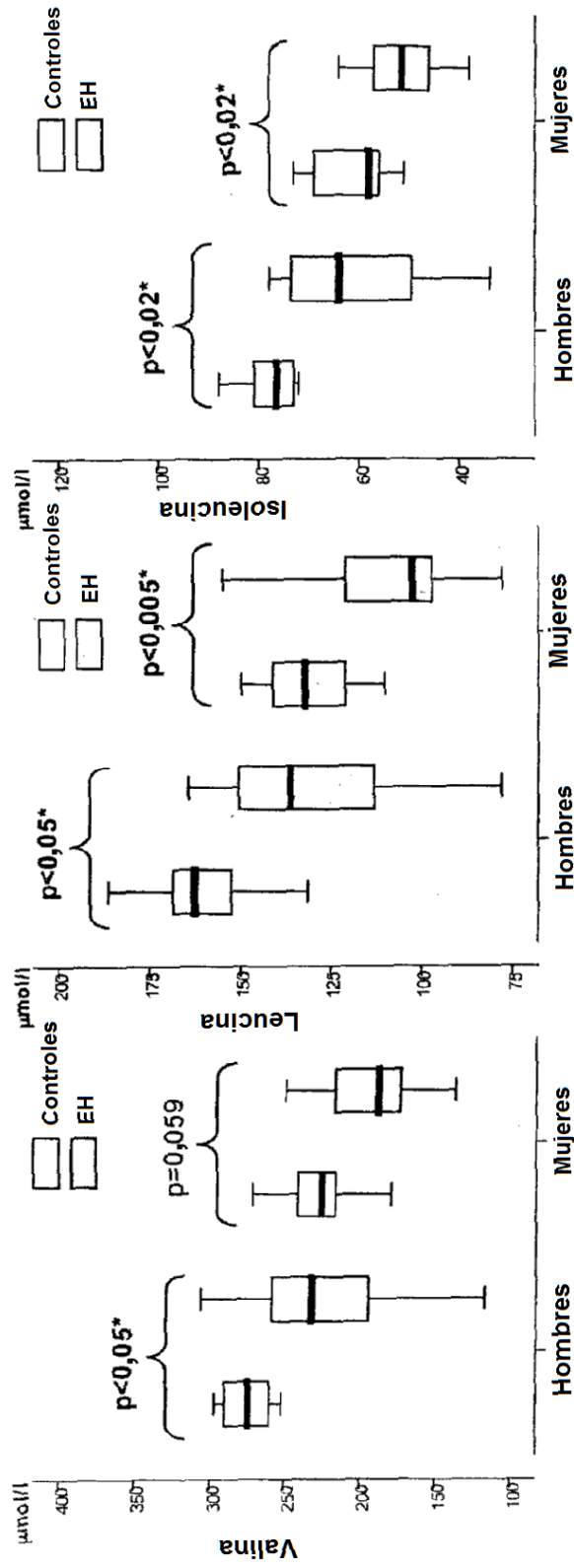


Figura 4

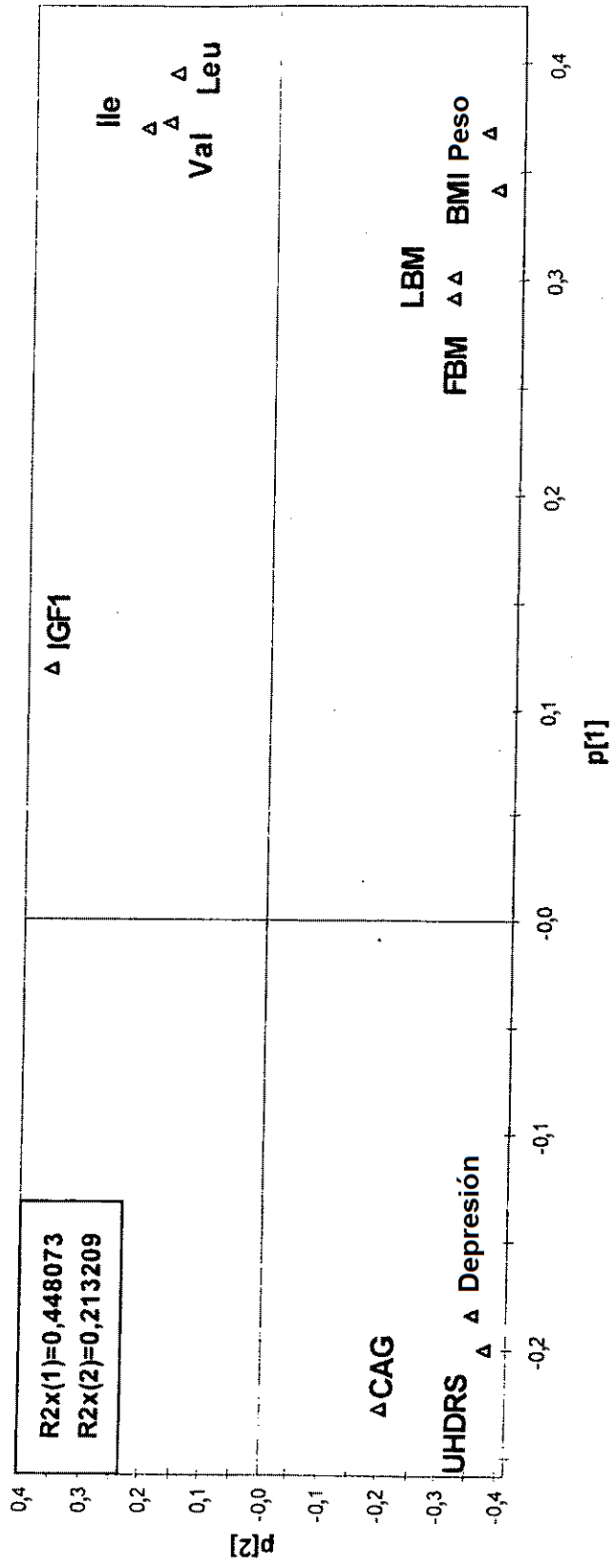


Figura 5

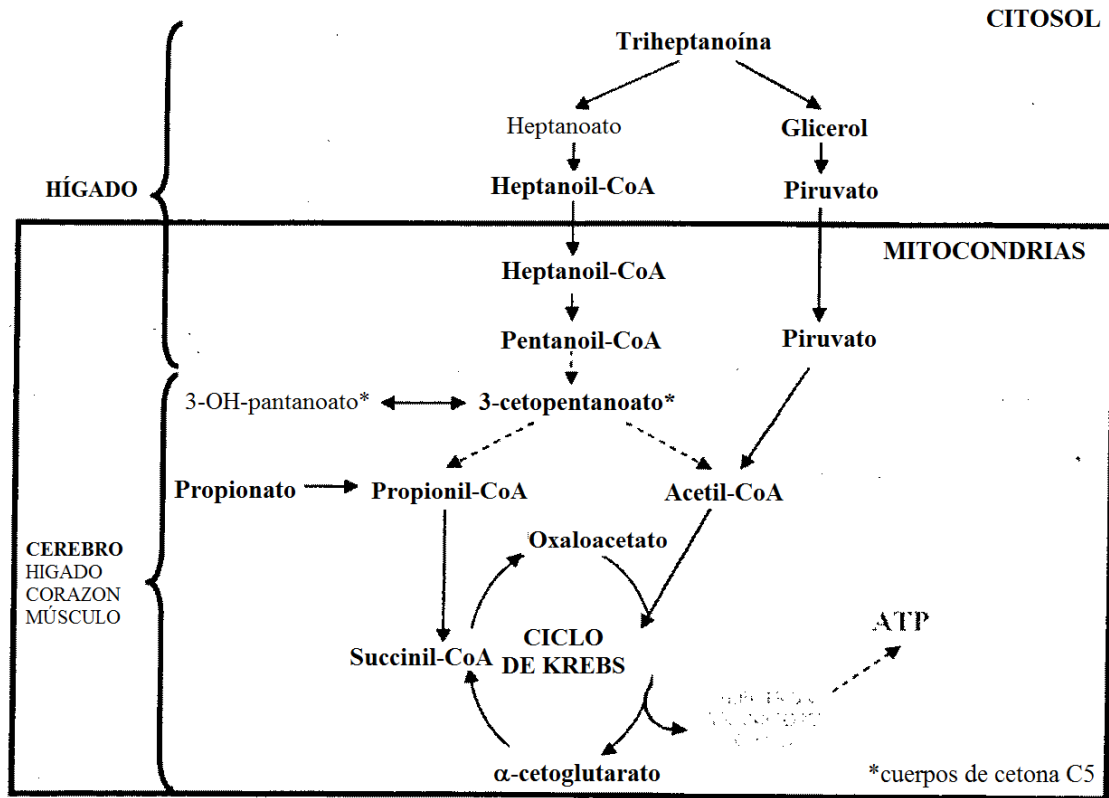


Figura 6

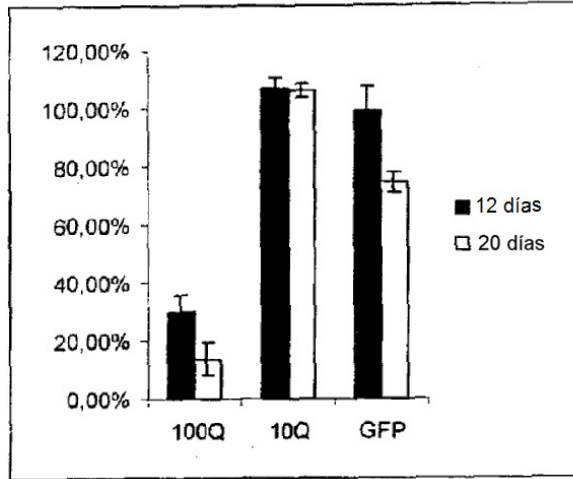


Figura 7

