

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 774 321**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/225 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2014 PCT/US2014/065670**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15073803**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2014 E 14861265 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3068492**

(54) Título: **Trastornos neurodegenerativos y métodos de tratamiento y diagnóstico de los mismos**

(30) Prioridad:

14.11.2013 US 201361904365 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2020

(73) Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND (100.0%)
St.Lucia, Queensland 4072, AU**

(72) Inventor/es:

**BORGES, KARIN y
NGO, SHYUAN T.**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 774 321 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

Trastornos neurodegenerativos y métodos de tratamiento y diagnóstico de los mismos.

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. USSN 61/904,365, presentada 5 el 14 de noviembre de 2013.

Descripción del archivo de texto enviado electrónicamente

El siguiente archivo de texto se ha enviado electrónicamente: una copia en formato legible por computadora del listado de secuencias (nombre de archivo: ULPI_018_01WO_SeqList_ST25.txt, fecha registrada el 12 de noviembre de 2014, tamaño de archivo 4 kilobytes).

10 Campo técnico

Esta invención se refiere en general a composiciones y métodos para la terapia y diagnóstico de trastornos neurodegenerativos y/o neuromusculares. Más particularmente, esta invención se refiere al uso de agentes anapleróticos para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de un trastorno neurodegenerativo y/o neuromuscular.

Antecedentes

15 La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de neuronas motoras y el desgaste muscular concomitante. Esto da como resultado un aumento de la parálisis y la muerte dentro de los 2 a 5 años posteriores al diagnóstico (Wijesekera and Leigh, 2009). La causa de la muerte de las neuronas motoras no está clara, pero se cree que las mitocondrias anormales, las inclusiones ubiquitinadas y los agregados de neurofilamentos contribuyen.

20 Las mitocondrias son responsables de la beta-oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la cadena de transporte de electrones, produciendo la mayor parte del trifosfato de adenosina (ATP), la principal fuente de energía celular que es necesaria para la función y supervivencia celular. De este modo, la función mitocondrial deteriorada en las neuronas motoras y los músculos daría como resultado un metabolismo energético defectuoso y una capacidad reducida para producir ATP.

25 La triheptanoína, el triglicérido del heptanoato (ácido graso C7), es una novedosa terapia metabólica que se está usando en los EE. UU. Para tratar pacientes con trastornos metabólicos genéticos raros de oxidación de ácidos grasos (Brunengraber and Roe, 2006, Roe and Mochel, 2006). La triheptanoína proporciona al cuerpo con heptanoato, que como ácido graso de cadena media se difunde en las mitocondrias para ser metabolizado a propionil-CoA por beta-oxidación. Alternativamente, el heptanoato se metaboliza en el hígado a las cetonas C5, el β -hidropentanoato y el β -cetopentanoato, los cuales son absorbidos por las células mediante transportadores de monocarboxilato. La carboxilación de propionil-CoA produce metil-malonil-CoA, que se puede metabolizar a succinil-CoA, lo que resulta en anaplerosis, el llenado de intermedios deficientes de C4 (que contienen cuatro carbonos) del ciclo TCA (Figura 1). Las enzimas anapleróticas incluyen piruvato carboxilasa (*Pcx*) que produce oxaloacetato en neuronas y músculos, y lo más importante en las transaminasas glutámicas pirútámicas 1 y 2 (*Gpt1* y *2*), que catalizan la reacción piruvato + glutamato \leftrightarrow α -cetoglutarato + alanina y propionil-CoA carboxilasa subunidad A (*Pcca*) y B (*Pccb*) y metilmalonil-CoA mutasa (*Mut*, Figura 1).

30 Se han encontrado mutaciones de la proteína superóxido dismutasa 1 (SOD1) en aproximadamente el 20% de los pacientes con ALS familiar y en un subconjunto de pacientes con ALS esporádico. Aunque generalmente se encuentra en el citosol, la SOD1 mutante se acumula dentro de las mitocondrias y parece contribuir a muchas de las perturbaciones mitocondriales que se encuentran en la ALS (Turner and Talbot, 2008, Vucic and Kiernan, 2009, Shi et al., 2010, Milani et al., 2011, Cozzolino and Carri, 2012). Los ratones que sobreexpresan mutaciones en SOD1 son actualmente uno de los mejores modelos animales para la ALS.

35 El documento EP2599482A1 informa el uso de tri-(4-fenilbutirato) de glicerilo en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, tales como la enfermedad de Alzheimer, cáncer, depresión o fibrosis quística.

40 El documento WO2008/068230A1 informa un método para tratar y/o prevenir la enfermedad de Huntington y otras enfermedades de poliglutamina, que comprende la etapa de administración de una cantidad eficaz de un precursor de propionil-CoA a un individuo que lo necesita.

WEI ZHAO et al: "Caprylic Triglyceride as a Novel Therapeutic Approach to Effectively Improve the Performance and Attenuate the Symptoms Due to the Motor Neurone Loss in ALS Disease", PLOS ONE, vol. 7, no. 11, 7 November 2012 (2012-11-07), página e49191, XP055374823, DOI: 10.1371/journal.pone.0049191 informa el uso de triglicéridos de caprílico en el tratamiento de la enfermedad de ALS.

Resumen

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el ciclo TCA desempeña un papel en la patogénesis del trastorno neurodegenerativo ALS, en el que los agentes anapleróticos pueden influir en el inicio y/o progresión de la enfermedad.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

- 5 La invención proporciona triheptanoína para su uso en el tratamiento, prevención y/o retraso del inicio de una enfermedad de la neurona motora (MND) en un animal, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de triheptanoína es para administrar a dicho animal, para tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la enfermedad de la neurona motora (MND) en dicho animal

10 En una realización, la MND es esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis lateral primaria (PLS), atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis bulbar progresiva (PBP), parálisis pseudobulbar o atrofia muscular espinal (SMA).

En otra realización más, la MND es la esclerosis lateral amiotrófica.

En otras realizaciones, la triheptanoína se proporciona al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente 5% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

15 En una realización, la triheptanoína se proporciona al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 20% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

En otra realización, la triheptanoína se proporciona al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 30% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

En otra realización más, la triheptanoína se proporciona al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 35% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

20 En una realización, el animal es un mamífero.

En otra realización, el mamífero es un humano.

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprender", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un entero o grupo de enteros establecido, pero no la exclusión de ningún otro entero o grupo de números enteros.

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa el ciclo simplificado de TCA y la anaplerosis en el CNS y los músculos. Los números encerrados en recuadros ("1", "2" y "3") indican vías anapleróticas que pueden llenar los intermedios C4 del ciclo: 1. piruvato carboxilasa (principalmente en el CNS); 2. propionil-CoA carboxilasa; y 3. transaminasas pirúvicas glutámicas (muy importantes en el músculo). Cetonas C5, isoleucina (Ile), valina (Val) y heptanoato, se metabolizan a propionil-CoA y, por lo tanto, pueden ser anapleróticos a través de la vía de carboxilación de propionil-CoA, OAA - oxaloacetato, 2-OG-2-oxoglutarato.

30 La figura 2 representa alteraciones en el metabolismo en *m. gastrocnemius* de ratones hSOD1^{G93A} en la fase media y final de la enfermedad. El panel A representa los niveles de metabolitos de lactato o glucosa en ratones de tipo salvaje (WT) o hSOD1^{G93A} (SOD). Los niveles de lactato se disminuyen en la etapa media (110-130 días) en los ratones SOD en comparación con los ratones WT, lo que indica una glucólisis reducida, mientras que hay un aumento de glucosa en la fase final (150-175 días) en los ratones SOD en comparación a los ratones WT, lo que indica una disminución del metabolismo de la glucosa. El panel B representa los niveles de actividad enzimática de varias enzimas en ratones de tipo salvaje (WT) o hSOD1^{G93A} (SOD) en la mitad de la enfermedad (110-130 días). Los datos muestran reducción en las actividades enzimáticas máximas en el *m. gastrocnemius* en los ratones SOD en comparación con los ratones WT. PGI-fosfoglucosa isomerasa - disminución del 28.5%, PFK- fosfofructoquinasa - disminución del 53%, OGDH - oxoglutarato deshidrogenasa - disminución del 25%. * p <0.05 pruebas t. N = 5-8 ratones/grupo.

35 Las figuras 3A-3E representan que el tratamiento con triheptanoína retrasa la pérdida de la fuerza de agarre de la extremidad posterior en ratones hSOD1^{G93A}. Las figuras 3A y 3B representan la fuerza de agarre de la extremidad posterior de ratones de tipo salvaje (Figura 3A) o hSOD1^{G93A} (Figura 3B) alimentados con dieta de control (CON) o dieta triheptanoína (TRIH). Los datos en la figura 3A muestran que no se evidenciaron diferencias en la fuerza de agarre entre triheptanoína (triángulos verdes abiertos, n = 15) y ratones alimentados de control de tipo salvaje (cuadrados llenos de negro, n = 12). Los datos en la figura 3B muestran que la fuerza de agarre a lo largo del tiempo difirió en ratones de alto número de copias transgénicas hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína (cruces rojas; n = 8) versus dieta de control (círculos vacíos azules, n = 5) (p = 0.04, ANOVA de dos vías), con una fuerza de agarre significativamente mayor a las 40 18 y 19.5 semanas (p <0.05 prueba post-hoc de Bonferroni). La figura 3C muestra la fuerza promedio de agarre de la extremidad trasera de ratones hSOD1G93A alimentados con dieta de control (CON) o dieta de triheptanoína (TRIH). Los datos en la figura 3C muestran que se observó una mayor fuerza de agarre de la extremidad posterior en el área bajo la curva con el tiempo en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína (n = 8) en comparación con ratones

5 hSOD1^{G93A} alimentados con control (n = 5, p <0.05; prueba-t). La figura 3D representa el inicio de la pérdida de fuerza de agarre de la extremidad posterior (en semanas) en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con dieta de control (CON) o dieta de triheptanoína (TRIH). Los datos en la figura 3D muestran que el inicio de la pérdida de fuerza de agarre de las extremidades posteriores se retrasó 2.8 semanas en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína (n = 8) en comparación con ratones hSOD1^{G93A} alimentados con control (n = 5, p = 0.002; prueba t). La figura 3E muestra las edades de los ratones hSOD1^{G93A} al comienzo de la pérdida de fuerza de agarre de la extremidad posterior (en semanas) representada en comparación con los números de copias del transgén hSOD1^{G93A} en esos ratones. Los datos en la figura 3E muestran que las regresiones lineales entre la edad de pérdida de fuerza que comienza con los números de copias transgénicas son significativamente diferentes entre los grupos alimentados con dieta de control ($R^2 = 0.89$) versus triheptanoína ($R^2 = 0.91$). Específicamente, las intersecciones x e y son diferentes entre las dos líneas de regresión (p <0.001), pero no las pendientes (p = 0.90).

10 15 La figura 3F representa el inicio de la pérdida de equilibrio en la barra giratoria (en semanas) en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con dieta de control (CON) o dieta de triheptanoína (TRIH). Los datos en la figura 3F muestran que el inicio de pérdida de equilibrio en ratones alimentados con triheptanoína versus alimentados con control SOD1^{G93A} se retrasó significativamente en 13 días (p = 0.0016).

20 25 La figura 3G representa los pesos corporales de ratones de tipo salvaje (WT) o hSOD1^{G93A} (SOD) alimentados con dieta de control (CON) o dieta de triheptanoína (TRIH) representados frente a las edades de los ratones. Los datos en la figura 3G muestran que los pesos corporales a lo largo del tiempo fueron significativamente diferentes entre los ratones de tipo salvaje alimentados con triheptanoína frente a la dieta de control y los ratones de tipo salvaje con dieta de control frente a los ratones hSOD1^{G93A} en cualquiera de las dietas. La figura 3H muestra el inicio de pérdida de peso de ratones hSOD1^{G93A} alimentados con dieta de control (CON) o dieta de triheptanoína (TRIH). Los datos en la figura 3H muestran que el inicio de la pérdida de peso corporal en los ratones alimentados con triheptanoína (n = 8) en comparación con los ratones hSOD1^{G93A} alimentados con control (n = 5) se retrasó 11 días (p = 0.0076, prueba t). * p <0.05, ** p <0.01

30 La figura 4 representa el resultado del ensayo de conteo de neuronas motoras de ratones de tipo salvaje (WT) o hSOD1^{G93A} (SOD) de 10 semanas de edad alimentados con dieta de control (CON) o dieta de triheptanoína (TRIH). Los datos en las figuras 4 muestran que la triheptanoína alivió la muerte de la neurona motora en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína (TRIH). La pérdida estadísticamente significativa del 37% de las neuronas motoras entre la región L2 y L5 en ratones alimentados con dieta de control (CON, n = 3) es estadísticamente insignificante en ratones alimentados con triheptanoína, mostrando una pérdida del 21% (n = 4). Recuentos estereológicos analizados por ANOVA de una vía seguidos por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

35 La figura 5 representa el resultado de un análisis cuantitativo de PCR en tiempo real de Gapdh, Pdh alfa, Ogdh y Sdh subunidad A ARNm del músculo gastrocnemius de ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A} de 10 semanas alimentados con dieta de control (CON) o triheptanoína (TRIH) en relación con genes constitutivos. Los niveles de transcripciones de Pdhalphal, OGDH y SDH subunidad A se redujeron en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con dieta de control (CON). Estas reducciones en los niveles de transcripción Pdhalpha1 y SDHalpha fueron atenuadas por la alimentación de triheptanoína. ANOVA de una vía para cada gen y punto de tiempo, seguido de pruebas posteriores de Bonferroni (* p <0.05, ** p <0.01) si es significativo.

40 45 La figura 6 representa los niveles de expresión relativos de genes implicados en la anaplerosis, específicamente la piruvato carboxilasa *Pcx*, las transferasas pirúvicas glutámicas *Gpt1* y 2, la subunidad alfa (*Pcca*) y beta (*Pccb*) de la propionil-CoA carboxilasa y la metil-malonil mutasa (*Mut*). La expresión se compara en el músculo gastrocnemíneo de ratones de 10 meses de tipo salvaje y hSOD1^{G93A} alimentados con dieta de control (CON) o triheptanoína (TRIH) en relación con los genes constitutivos. ANOVA de una vía para cada gen y punto de tiempo, seguido de pruebas posteriores de Bonferroni (* p <0.05) si es significativo.

50 55 La figura 7 ilustra las alteraciones metabólicas encontradas en pacientes con ALS y modelos experimentales de ratones y mecanismos de acción de triheptanoína. En pacientes con MND y modelos de MND de ratón, actividades de glucólisis, citrato sintasa (CS), oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH) (Russell et al., 2012) y actividad del complejo I (Allen et al., 2014); así como también disminuyen los niveles (Niessen et al., 2007) de oxaloacetato (OAA) y 2-oxoglutarato (2-OG) (indicado con flechas punteadas al lado de estas enzimas o metabolitos). Además, nuestros hallazgos de actividad enzimática máxima disminuida de PGI, PFK y OGDH en ratones hSOD1^{G93A} a mediados de la enfermedad (110-130 días) se indican con flechas sólidas junto a estas enzimas. La triheptanoína se metaboliza a propionil-CoA y luego a succinil-CoA. Esto debería aumentar 1) los niveles de metabolitos del ciclo TCA, 2) la oxidación de acetil-CoA y todos los combustibles que proporcionan acetil-CoA, 3) la cantidad de electrones para los complejos de cadena de transporte de electrones I y II, y 4) la producción de ATP, lo que resulta en una mejor supervivencia de neuronas y músculos.

Descripción detallada

55 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el ciclo TCA desempeña un papel en la patogénesis del trastorno neurodegenerativo ALS, en el que los agentes anapleróticos pueden influir en el inicio y/o progresión de la enfermedad.

En aspectos generales, la divulgación se refiere a métodos de no solo tratar una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular, sino también prevenir y/o retrasar el inicio de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes anapleróticos a dicho animal.

- 5 La presente invención proporciona triheptanoína para su uso en el tratamiento preventivo, profiláctico y/o terapéutico de una enfermedad, trastorno o afección de la neurona motora como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en este documento, "que trata" (o "tratar" o "tratamiento") se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular después de que ha comenzado a desarrollarse. El término "mejorar", con referencia a una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El tratamiento no necesita ser absoluto para ser beneficioso para el sujeto. El efecto beneficioso se puede determinar usando cualquier método o estándar conocido para el experto en el arte.

Como se usa en este documento, "que previene" (o "prevenir" o "prevención" o "preventivo") y "retrasar el inicio" se refieren a un curso de acción (tal como administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más precursores de propionil-CoA) iniciados antes del inicio de un síntoma, aspecto o característica de la enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular para prevenir o retrasar el inicio de dicho síntoma, aspecto o característica, respectivamente. Se debe entender que tal prevención no necesita ser absoluta para ser beneficiosa para un sujeto. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular, o exhibe solo signos tempranos, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar un síntoma, aspecto, o característico de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular. Un tratamiento "terapéutico" es uno administrado a un sujeto que exhibe al menos un síntoma, aspecto o característica de la enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular para curar, remediar o revertir, al menos en parte, y/o detener o retrasar la progresión de dicho síntoma, aspecto o característica.

25 En el contexto de la presente divulgación, por "enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa" se entiende cualquier enfermedad, trastorno y/o afección que comprende un deterioro y/o deterioro progresivo en la estructura, función, señalización y/o población de neuronas o tejido neural en un animal. Como se usa en este documento, "una enfermedad, trastorno o afección neuromuscular" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno y/o afección que comprende una disminución y/o deterioro progresivo en la estructura, función, señalización y/o población de las neuronas o tejido neural que inervan y/o comunican, ya sea directa o indirectamente, con los músculos de un animal.

30 La etiología de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular puede implicar, pero no se limita a, mutaciones genéticas, plegamiento y/o agregación de proteínas, trastornos autoinmunes, disfunción mitocondrial, transporte axonal defectuoso, apoptosis aberrante y/o autofagia y producción elevada de estrés oxidativo y/o especies reactivas de oxígeno (ROS).

35 Sin limitación, los trastornos neurodegenerativos incluyen la enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencia, ataxia espinocerebelosa, ataxia de Friedreich, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad del cuerpo de Lewy, enfermedades priónicas (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), Esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Pick, síndrome de Shy-Drager, hipoplasia pontocerebelosa, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Gaucher, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, ataxia/paraplejia espástica, parálisis supranuclear, demencia mesolimbocortical, degeneración talámica, degeneración cortical-estriatal-estriatal, degeneración ganglionar cortical-basal, degeneración cerebrocerebelosa, síndrome de Leigh, síndrome pospolio, atrofia muscular hereditaria, encefalitis, neuritis, hidrocefalia y enfermedades de las neuronas motoras.

40 Además, el experto en el arte entendería que los trastornos neuromusculares pueden incluir la enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados, la enfermedad de Huntington, la ataxia espinocerebelosa, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Tay Sachs, la enfermedad del cuerpo de Lewy, la neuropatía periférica, la miastenia grave, la MS, el síndrome de Leigh, síndrome pospolio, atrofia muscular hereditaria, ataxia/paraplejia espástica y enfermedades de las neuronas motoras, sin limitación a estas.

45 En el contexto de la presente divulgación, el animal con una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular sujeto a tratamiento, preventivo y/o terapéutico, por el método de la divulgación se ha determinado que tiene ya sea una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular o esta predisposto a dicha enfermedad, trastorno o afección.

50 En las realizaciones de la invención, la enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular de este aspecto amplio es una enfermedad de la neurona motora.

55 En términos generales, las enfermedades de las neuronas motoras son una forma de trastorno neurodegenerativo y/o neuromuscular que por lo general implican a las neuronas motoras de un animal afectado. Como entendería fácilmente un experto en el arte, las neuronas motoras son células nerviosas que controlan los músculos voluntarios del tronco, las

extremidades y las falanges, así como aquellos músculos que influyen en el habla, la deglución y la respiración. De acuerdo con lo anterior, los síntomas clínicos de una MND pueden incluir debilidad y/o desgaste muscular, calambres musculares, disfagia, dificultad para hablar, temblores/fasciculaciones musculares, cognición reducida, disnea, insuficiencia respiratoria, fatiga y pérdida de peso sin limitación a estas. Las enfermedades de las neuronas motoras incluyen, entre otras, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; también conocida como enfermedad de Lou Gehrig), esclerosis lateral primaria (PLS), atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis bulbar progresiva (PBP), parálisis seudobulbar y espinal atrofia muscular (SMA).

A la luz de lo anterior, la enfermedad de la neurona motora puede ser ALS, PLS, PMA, PBP, parálisis pseudobulbar o SMA.

10 En una realización, la enfermedad de la neurona motora es la ALS.

Por "agente anaplerótico" se entiende una sustancia que cuando se incorpora al ciclo TCA repone ya sea uno o más intermedios de C4 agotados (que contienen cuatro carbonos) del ciclo TCA o mantiene o aumenta el nivel de uno o más intermedios del ciclo TCA, o ambos.

15 Como apreciaría el experto en el arte, los niveles de los intermedios del ciclo TCA son cruciales para el funcionamiento normal y la regulación del ciclo TCA. Sin embargo, la mayoría de los intermedios del ciclo TCA también están implicados en otras rutas metabólicas en la célula y, en consecuencia, después de su flujo de salida de las mitocondrias, se puede encontrar que sus niveles respectivos se reducen en el ciclo TCA. Tales reducciones en los niveles de los intermedios del ciclo TCA pueden inhibir posteriormente el funcionamiento óptimo del ciclo. La entrada de agentes anapleróticos en el ciclo TCA puede superar este flujo de salida y, de este modo, mantener niveles apropiados de intermedios del ciclo TCA para un funcionamiento óptimo del ciclo.

20 En una realización de la divulgación, el uno o más agentes anapleróticos son citrato, alfa-ceto-glutarato (2-oxoglutarato), glutamato, glutamina, succinato, fumarato, malato, piruvato y/o uno o más precursores de propionilo-CoA.

25 Cualquier sal relevante (tal como sales de calcio, sodio, magnesio o potasio), profármacos, análogos, derivados, formas sustituidas y/o ramificadas, precursores y derivados de estos agentes anapleróticos también se contemplan dentro del alcance de la divulgación. Por ejemplo, las sales de la presente descripción pueden incluir glutamato monosódico, piruvato de calcio (y monohidrato de piruvato de calcio), piruvato de creatina, piruvato de magnesio, piruvato de potasio y piruvato de sodio.

30 Una realización de un agente anaplerótico es un precursor de propionil-CoA. Por "precursor de propionil-CoA" se entiende una sustancia a partir de la cual se puede formar propionil-CoA por una o más reacciones metabólicas que tienen lugar dentro de una célula o tejido de un cuerpo animal.

35 Esto puede incluir dentro de su alcance sales, profármacos, análogos, derivados, formas ramificadas, insaturadas sustituidas u otros ácidos grasos de cadena desigual y derivados de los mismos, si corresponde.

Los ejemplos típicos de precursores de propionil-CoA son ácidos grasos de cadena desigual, en particular ácidos grasos de siete carbonos, aunque sin limitación, heptanoato, triglicéridos que incluyen triglicéridos de un ácido graso de cadena desigual, un compuesto de fórmula 1, un fosfolípido que comprende uno o dos ácidos grasos de cadena desigual, cuerpos cetónicos C5 (por ejemplo, cetopentanoato 3 (3-cetovalerato) y β-hidroxipentanoato (3-hidroxivalerato) pero sin limitación a estos) (Kinman 2006, Am J Physiol Endocrinol Metab 291 (4): E860-6, Brunengraber and Roe 2006, J Inherit Metabol Dis 29 (2-3): 327-31). Los ejemplos de precursores de propionil-CoA descritos anteriormente incluyen los propios compuestos, así como sus sales, profármacos, solvatos y derivados, si corresponde.

40 En algunas realizaciones de la divulgación, el al menos un precursor de propionil-CoA se selecciona del grupo que consiste en un ácido graso de cadena desigual, un triglicérido, un fosfolípido y combinaciones de los mismos.

45 El al menos un precursor de propionil-CoA puede ser un ácido graso de cadena desigual, tal como un ácido graso de siete carbonos. En otras realizaciones de la divulgación, el al menos un precursor de propionil-CoA es un triglicérido, tal como un triglicérido de un ácido graso de cadena desigual. En realizaciones adicionales de la divulgación, el al menos un precursor de propionil-CoA es un fosfolípido que comprende uno o dos ácidos grasos de cadena desigual. En algunas realizaciones de la divulgación, el al menos un precursor de propionil-CoA es un cuerpo de cetona C5.

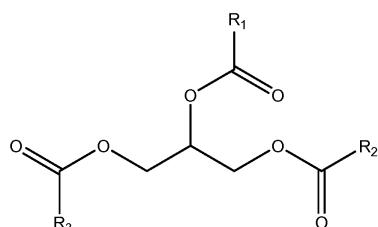
50 Los ejemplos de profármacos incluyen ésteres, oligómeros de hidroxialcanoato tales como oligo (3-hidroxivalerato) (Véase, 1999, Int J Biol Macromol 25 (1-3): 217-36) y otros derivados farmacéuticamente aceptables, que, tras la administración a un individuo, son capaces de proporcionar propionil-CoA. Un solvato se refiere a un complejo formado entre un precursor de propionil-CoA descrito anteriormente y un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de solventes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, etanol, isopropanol, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina. Como se usa en este documento, los compuestos "derivados" se han alterado, por ejemplo, por conjugación o formación de complejos con otros restos químicos.

55 En ciertas realizaciones de la divulgación, el precursor de propionil-CoA es un ácido graso de cadena desigual. La divulgación también incluye dentro de su alcance ésteres de ácidos grasos de cadena desigual. Un experto en el arte

apreciará que un ácido graso de cadena desigual también puede denominarse ácido graso con un número impar de carbono. El ácido graso de cadena desigual se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido propiónico, ácido pentanoico, ácido heptanoico, ácido nonanoico y ácido undecanoico.

- 5 Se pueden usar ácidos grasos de cadena desigual sustituidos, insaturados y/o ramificados, así como otros ácidos grasos de cadena desigual modificados sin apartarse del alcance de la divulgación.

En otras realizaciones de la divulgación, el al menos un precursor de propionil-CoA puede ser uno o más compuestos de fórmula I:



Fórmula I

en la que

- 10 R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo.

En una realización de la divulgación, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo C₁ a C₂₀.

En una realización adicional de la divulgación, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo C₃ a C₁₅.

- 15 En otra realización adicional de la divulgación, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo C₅ a C₁₂.

En aún otra realización adicional de la divulgación, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de alquilo, alquenilo o alquinilo C₅ a C₉.

- 20 En ciertas realizaciones de la divulgación, R₁, R₂ y R₃ son iguales y se seleccionan del grupo que consiste en alquilo C₅, C₆, C₇, C₈ y C₉, y en realizaciones particulares de la divulgación, se seleccionan de alquilo C₅, C₇ y C₉ y en realizaciones de la invención, alquilo C₇.

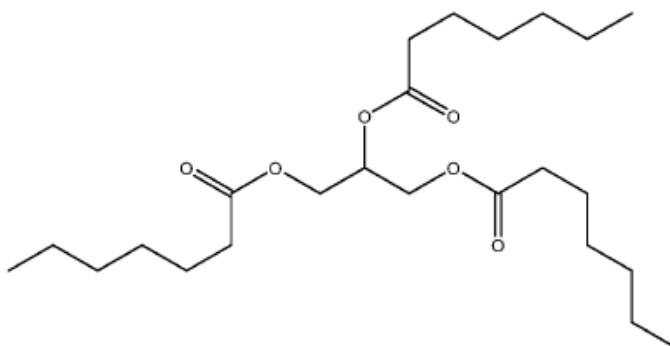
En algunas realizaciones de la divulgación, R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo y pentadecilo, inclusive de todos los isómeros

- 25 R₁, R₂ y R₃ también se pueden seleccionar independientemente de hexilo, heptilo, octilo y nonilo, incluidos todos los isómeros.

En realizaciones particulares de la divulgación, el compuesto de fórmula I es un triglicérido de número impar. En ciertas realizaciones de la divulgación, el triglicérido de número impar se selecciona de tripentanoína, triheptanoína y trinonanoína.

- 30 En una realización de la divulgación, el compuesto de fórmula I es un triglicérido C₇ en el que puede contener una, dos o tres cadenas C₇.

En las realizaciones de la invención, el compuesto de fórmula I es triheptanoína, que se muestra a continuación. Este compuesto puede ser conocido por un número de nombres alternativos que incluyen 1,3-di(heptanoiloxi)propan-2-il heptanoato, 1,2,3-propanetriil triheptanoato y glicerol triheptanoato.



En otras realizaciones de la divulgación, el compuesto de fórmula I es trinonanoína. Este compuesto puede ser conocido por un número de nombres alternativos que incluyen gliceroltrinonanoato y gliceriltripelargonato.

El término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo lineales y ramificados opcionalmente sustituidos que tienen de 1 a 20 átomos de carbono. Cuando sea apropiado, el grupo alquilo puede tener un número especificado de átomos de carbono, por ejemplo, alquilo C₁-C₆ que incluye grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono en disposiciones lineales o ramificadas. Ejemplos no limitativos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, s- y t-butilo, pentilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, hexilo, heptilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2-ethylbutilo, 3-ethylbutilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo.

El término "alquieno" se refiere a una cadena alifática saturada sustituida en cualquier extremo, también conocida como un alcanodiilo. Los ejemplos no limitantes pueden incluir -CH₂-, -CH₂CH₂- y -CH₂CH₂CH₂-.

El término "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarburo lineales o ramificados insaturados opcionalmente sustituidos, que tienen de 2 a 20 átomos de carbono y que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono. Cuando sea apropiado, el grupo alquenilo puede tener un número especificado de átomos de carbono, por ejemplo, alquenilo C₂-C₆ que incluye grupos alquenilo que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono en disposiciones lineales o ramificadas. Ejemplos no limitativos de grupos alquenilo incluyen, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, s- y t-butenilo, pentenilo, hexenilo, hept-1,3-dieno, hex-1,3-dieno, no-1,3, 5-triene y similares.

El término "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarburo lineales o ramificados insaturados opcionalmente sustituidos, que tienen de 2 a 20 átomos de carbono y que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono. Cuando sea apropiado, el grupo alquinilo puede tener un número especificado de átomos de carbono, por ejemplo, los grupos alquinilo C₂-C₆ tienen 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono en disposiciones lineales o ramificadas. Ejemplos no limitativos de grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo, butinilo, peninilo, hexinilo y similares.

En otras realizaciones, la divulgación contempla la administración de un fosfolípido que comprende uno o dos ácidos grasos de cadena desigual. El fosfolípido se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido fosfatídico (fosfatidato), fosfatidiletanamina (cefalina), fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilserina y fosfoinositidas.

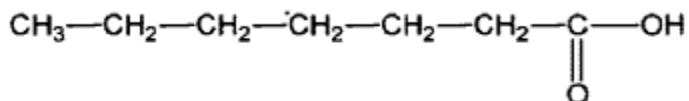
El experto en el arte conoce los métodos estándar para la producción de precursores de propionil-CoA. Un experto en el arte puede determinar las condiciones apropiadas para obtener los compuestos como se describe en este documento, por ejemplo, haciendo referencia a textos relacionados con metodología de síntesis, cuyos ejemplos no limitantes son Smith M.B. and March J., March's Advanced Organic Chemistry, Fifth Edition, John Wiley & Sons Inc., 2001 and Larock R.C., Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Ltd., 1989. Adicionalmente, las manipulaciones selectivas de grupos funcionales pueden requerir la protección de otros grupos funcionales. Los grupos protectores apropiados para prevenir reacciones secundarias no deseadas se proporcionan en Green and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons Inc., 3rd Edition, 1999.

En algunas realizaciones de la divulgación, el precursor de propionil-CoA es una fuente de ácido graso de siete carbonos (C7) o un derivado del mismo. Los ejemplos de tal fuente de ácido graso de siete carbonos o derivados de la misma incluyen, pero no se limitan a, triheptanoína, ácido n-heptanoico, n-heptanoato, un triglicérido que comprende ácido n-heptanoico o que comprende ácido n-heptanoico y un ácido graso diferente tal como ácido n-pentanoico, ácido n-nonanoico o ambos. Los ejemplos de derivados de fuente de ácido graso de siete carbonos también incluyen, pero no se limitan a, 4-metilhexanoato, 4-metilhexenoato, 3-hidroxi-4-metilhexanoato, 5-metilhexanoato, 5-metilhexenoato y 3-hidroxi-5-metilhexanoato.

Por ejemplo, una realización de una fuente de ácido graso de siete carbonos es la triheptanoína, que es un triglicérido que se puede preparar mediante la esterificación de tres moléculas de ácido n-heptanoico y glicerol por cualquier medio

conocido en la técnica. La triheptanoína también está disponible comercialmente a través de Ultragenyx Pharmaceutical, aunque sin limitación a esta.

Otro ejemplo de ácido graso de siete carbonos es el ácido n-heptanoico. El ácido n-heptanoico es un ácido graso saturado de siete carbonos de cadena lineal con la siguiente estructura:



5

El ácido heptanoico se encuentra en diversos aceites de fusel en cantidades apreciables y se puede extraer por cualquier medio conocido en la técnica. También se puede sintetizar por oxidación de heptaldehído con permanganato de potasio en ácido sulfúrico diluido (Ruhoff, Org Syn Coll. volII, 315 (1943)). El ácido heptanoico también está disponible comercialmente a través de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

- 10 Según la presente divulgación, se puede usar cualquier fuente de ácido graso de siete carbonos o derivados de la misma para los métodos de tratamiento proporcionados en este documento. Los términos, ácido heptanoico, heptanoato y triheptanoína se pueden usarse indistintamente en la presente divulgación. Los expertos en el arte entenderán que el ácido heptanoico, el heptanoato y la triheptanoína se usan a lo largo de la presente descripción como una fuente de ejemplo de ácido graso de siete carbonos. Se puede usar heptanoato sustituido, insaturado o ramificado, así como otra fuente modificada de ácido graso de siete carbonos sin apartarse del alcance de la divulgación.
- 15

En algunas realizaciones, la fuente de ácido graso C7 se proporciona en una formulación que tiene una impureza mínima, por ejemplo, la formulación contiene al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de triheptanoína. En algunas otras realizaciones, la fuente de ácido graso C7 tiene un valor ácido tiene un valor ácido de 0.1 o menos mg de KOH/gr, un valor hidroxilo de 2.8 o menos mg de KOH/gr.

- 20 Según la presente invención, los precursores de propionil-CoA se pueden usar como agentes únicos o en asociación con otros agentes o tratamientos terapéuticos. En algunas realizaciones, se usan en combinación con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, un precursor de propionil-CoA se puede usar en combinación con un suplemento de carnitina, biotina, vitamina B12 o combinaciones de los mismos. Un ejemplo de suplemento de carnitina es la L-carnitina. Un ejemplo de vitamina B12 es la cianocobalamina.
- 25 Por "administración" o "que administra" se entiende la introducción de una composición (por ejemplo, una composición que comprende uno o más agentes anapleróticos) en un sujeto por una ruta elegida.

- 30 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" describe una cantidad de un agente especificado suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado con ese agente. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad de una composición que comprende uno o más agentes anapleróticos necesarios para reducir, aliviar, prevenir y/o retrasar el inicio de uno o una pluralidad de síntomas de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular. En algunas realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es suficiente para reducir o eliminar un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular. En otras realizaciones, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para lograr un efecto biológico deseado, por ejemplo, una cantidad que es eficaz para revertir, al menos en parte, la función mitocondrial deteriorada asociada con una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular.
- 35

Idealmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anaplerótico es una cantidad suficiente para inducir el resultado deseado sin causar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad eficaz de un agente anaplerótico útil para reducir, aliviar, prevenir y/o retrasar el inicio de uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular dependerá del sujeto a tratar, el tipo y la gravedad de cualquier enfermedad, trastorno y/o afección asociada, y la forma de administración de la composición terapéutica.

- 40 La presente invención incluye dentro de su alcance una cantidad terapéutica de uno o más agentes anapleróticos que son menos del 100% de la ingesta calórica de la dieta y pueden estar dentro de un intervalo de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 90%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 60%, entre aproximadamente 25% y 50% entre aproximadamente 30% y aproximadamente 40%.

- 45 En realizaciones particulares, se proporcionan uno o más agentes anapleróticos al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 20.5%, al menos aproximadamente 21%, al menos aproximadamente 21.5%, al menos aproximadamente 22%, al menos aproximadamente 22.5%, al menos aproximadamente 23%, al menos aproximadamente 23.5%, al menos aproximadamente 24%, al menos aproximadamente 24.5% al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 25.5%, al menos aproximadamente 26%, al menos aproximadamente 26.5%, al menos aproximadamente 27%, al menos aproximadamente 27.5%, al menos aproximadamente 28%, al menos aproximadamente 28.5%, al menos aproximadamente 29%, al menos aproximadamente 29.5%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 30.5%, al menos aproximadamente 31%, al menos aproximadamente 31.5%, al menos
- 50

aproximadamente 32%, al menos aproximadamente 32.5%, al menos aproximadamente 33%, al menos aproximadamente 33.5%, al menos aproximadamente 34%, al menos aproximadamente 34.5%, al menos 5 aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 35.5%, al menos aproximadamente 36%, al menos aproximadamente 36.5%, al menos aproximadamente 37%, al menos aproximadamente 37.5%, al menos 10 aproximadamente 38%, al menos aproximadamente 38.5%, al menos aproximadamente 39%, al menos aproximadamente 39.5%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 40.5%, al menos 15 aproximadamente 41%, al menos aproximadamente 41.5%, al menos aproximadamente 42%, al menos aproximadamente 42.5%, al menos aproximadamente 43%, al menos aproximadamente 43.5%, al menos aproximadamente 44%, al menos aproximadamente 44.5%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 45.5%, al menos aproximadamente 46%, al menos aproximadamente 46.5%, al menos 20 aproximadamente 47%, al menos aproximadamente 47.5%, al menos aproximadamente 48%, al menos aproximadamente 48.5%, al menos aproximadamente 49%, al menos aproximadamente 49.5%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos 25 aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o más de la ingesta calórica de la dieta.

En una realización, el uno o más agentes anapleróticos se proporcionan al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 5% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

En una realización adicional, el uno o más agentes anapleróticos se proporcionan al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 20% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

20 En otra realización adicional, el uno o más agentes anapleróticos se proporcionan al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 30% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

En aún otra realización adicional, el uno o más agentes anapleróticos se proporcionan al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 35% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.

25 Un destinatario experto apreciará que el "% de ingesta calórica de la dieta" se puede relacionar con % de kJoules o % de kcal.

Se puede emplear cualquier ruta de administración segura para proporcionar a un paciente uno o más agentes anapleróticos. Por ejemplo, se puede emplear enteral, oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intraduodenal, intragástrico, intravenoso, intraarticular, intramuscular, intradérmico, subcutáneo, inhalatorio, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmico y similares. Se puede administrar por ingestión de una sustancia alimenticia que contiene triheptanoína a una concentración eficaz para alcanzar niveles terapéuticos. Alternativamente, se puede administrar como una cápsula o atrapado en liposomas, en solución o suspensión, solo o en combinación con otros nutrientes, agentes edulcorantes y/o saborizantes adicionales. Las cápsulas y comprimidos se pueden recubrir con goma laca y otros agentes entéricos como se conoce.

35 Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, trozos de aceites, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este propósito u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico se puede efectuar recubriendo el mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico y ciertos derivados de celulosa tales 40 como hidroxipropilmetylcelulosa. Además, la liberación controlada puede efectuarse usando otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas

45 Los agentes anapleróticos para administración enteral, intraperitoneal, oral o parenteral se pueden presentar en unidades discretas tales como cápsulas, bolsitas o comprimidos que contienen cada una cantidad predeterminada del agente terapéutico de la invención, como un polvo o gránulos o como una solución o suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. En ciertas realizaciones, la administración del uno o más agentes anapleróticos es mediante administración oral. Tales cantidades terapéuticamente efectivas del uno o más agentes anapleróticos se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar uno o más agentes como se describió anteriormente con el portador que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, tales composiciones se pueden preparar mezclando uniforme e íntimamente los agentes de la invención con portadores líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto en la presentación deseada.

50 Los agentes anapleróticos se pueden administrar de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea farmacéuticamente eficaz. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en un paciente durante un período de tiempo apropiado. La cantidad de agente(s) que se van a administrar puede depender del sujeto que se va a tratar, incluyendo la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud del mismo, factores que dependerán del juicio del profesional.

También se apreciará que los métodos de tratamiento pueden ser aplicables al tratamiento profiláctico o terapéutico de mamíferos, incluidos humanos y mamíferos no humanos, tales como ganado (por ejemplo, caballos, ganado vacuno y ovino), animales de compañía (por ejemplo, perros y gatos), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas y cobayas) y animales de rendimiento (por ejemplo, caballos de carreras, galgos y camellos), aunque sin limitación a estos.

5

En aspecto adicional, la divulgación proporciona un kit para el tratamiento de un animal con una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular que comprende: (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes anapleróticos descritos en este documento; y (ii) instrucciones de uso.

El uno o más agentes anapleróticos se pueden seleccionar de tripentanoína, triheptanoína y trinonanoína.

10 En una realización particular de este aspecto, el uno o más agentes anapleróticos es la triheptanoína.

El uno o más agentes anapleróticos de este aspecto pueden comprender además un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable puede incluir una sustancia de relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia encapsulante que se puede usar de manera segura en la administración sistémica. Una referencia útil que describe portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991).

15

Se apreciaría que ciertas realizaciones de este aspecto pueden comprender además una o más terapias adicionales para una enfermedad, trastorno y/o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular. Estos pueden incluir, por ejemplo, antioxidantes, antiinflamatorios, compuestos antiapoptóticos, inhibidores de la colinesterasa, agonistas y/o antagonistas de los receptores de acetilcolina, agonistas y/o antagonistas de los α -adrenorreceptores, inhibidores de la monoaminooxidasa, inhibidores de la catecol-Ometil transferasa, donantes de óxido nítrico, analgésicos, riluzol (Rilutek®), relajantes musculares y/o anticonvulsivos, aunque sin limitación a estos.

20

El uno o más agentes anapleróticos de este aspecto pueden comprender una forma de dosificación como se describe en este documento anteriormente. Además, un experto en el arte reconocería fácilmente que ciertas realizaciones del presente aspecto pueden incluir dispositivos apropiados para dispensar la/s forma/s de dosificación y/o composición/es de dicho kit. Tales dispositivos de dispensación pueden incluir, por ejemplo, una o más de una jeringa y/o aguja, blíster, aplicador, vaso o recipiente de forma adecuada, dispositivo inhalante, cuchara, gotero, nebulizador, parche transdérmico, gasa y/o vendaje, aunque sin limitación a estos.

25

En otro aspecto adicional, la divulgación proporciona un método de determinación de si un animal tiene o está predisposto a una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular, en el que el método incluye la etapa de medir (i) el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican respectivamente enzimas asociadas con el metabolismo energético (ii) el nivel de expresión y/o actividad de dichas enzimas y/o (iii) el nivel de uno o más metabolitos asociados con el metabolismo energético.

30

En otro aspecto adicional más, la divulgación proporciona un método de control de la respuesta de un animal al tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular mediante la administración de uno o más agentes anapleróticos, en el que el método incluye la etapa de medir (i) el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican respectivamente enzimas asociadas con el metabolismo energético (ii) el nivel de expresión y/o actividad de dichas enzimas y/o (iii) el nivel de uno o más metabolitos asociados con el metabolismo energético.

35

40 La enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular es como se describe anteriormente en este documento.

Por "metabolismo energético" se entiende la suma total de todas las reacciones químicas y/o procedimientos implicados en el mantenimiento del suministro de energía de una célula y, de este modo, de un organismo. Estas reacciones y/o procedimientos son catalizados en gran medida por enzimas, y por lo general implican la descomposición de moléculas más grandes, tales como los carbohidratos como la glucosa, en moléculas más pequeñas para extraer energía. Para la presente invención, aquellas sustancias implicadas o producidas como resultado de estas reacciones y/o procedimientos se denominan metabolitos. En términos generales, el metabolismo energético incluye, entre otros, la glucólisis, el ciclo TCA, la fosforilación oxidativa, la anaplerosis y la respiración anaeróbica.

45

En algunas realizaciones de los métodos de la divulgación, las enzimas o metabolitos se pueden seleccionar del grupo que consiste en enzimas o metabolitos glucolíticos, enzimas o metabolitos del ciclo TCA y enzimas o metabolitos anapleróticos.

50

Los ejemplos no limitantes de enzimas glucolíticas incluyen la hexoquinasa, la fosfogluco isomerasa, fosfofructoquinasa, aldolasa fructosa-bifosfato, triosa-fosfato isomerasa, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato quinasa, fosfoglicerato mutasa, enolasa, piruvato quinasa, piruvato deshidrogenasa, dihidrolipoil transacetilasa y dihidrolipoil deshidrogenasa.

En realizaciones específicas de la divulgación, la enzima glucolítica es piruvato deshidrogenasa alfa 1, fosfoglucosa isomerasa (PGI) o fosfofructoquinasa (PFK).

Los ejemplos no limitantes de metabolitos glucolíticos incluyen glucosa, glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, fructosa 1,6-bifosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bifosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y lactato.

Ejemplos no limitantes de enzimas del ciclo TCA incluyen citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, oxoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, complejo succinato deshidrogenasa, fumarasa, complejo I (también conocida como NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidoreductasa) y malato deshidrogenasa.

Las enzimas del ciclo TCA se pueden seleccionar del grupo que consiste en la subunidad A del complejo oxoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa.

Los ejemplos no limitantes de metabolitos del ciclo TCA incluyen acetil CoA, citrato, cis-aconitato, isocitrato, oxalosuccinato, oxoglutarato, succinil CoA, succinato, fumarato, malato y oxaloacetato.

Los ejemplos no limitantes de enzimas anapleróticas incluyen piruvato carboxilasa, aspartato transaminasa, glutamato deshidrogenasa, metilmalonil-CoA mutasa, adenilosuccinato liasa, glutamato piruvato transaminasa 1, glutamato piruvato transaminasa 2 y subunidades A y B de propionil-CoA carboxilasa.

Las enzimas anapleróticas se pueden seleccionar del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa 1, glutamato-piruvato transaminasa 2, subunidad A y B de propionil-CoA carboxilasa y metilmalonil-CoA mutasa.

Los ejemplos no limitantes de metabolitos anapleróticos incluyen aspartato, alanina, GABA, citrato, succinato, malato, fumarato, alfa-cetoglutarato (2-oxo-glutarato), glutamato, glutamina, prolina, histidina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, isoleucina, valina, propionil CoA, metilmalonil CoA y adenilosuccinato.

Un experto en el arte relevante reconocería fácilmente que si los niveles de metabolitos asociados con el ciclo TCA y/o la anaplerosis, tales como lactato, alanina, piruvato, aspartato, glutamato, glutamina y aspartato, se reducen, esto indica que puede haber menos intermedios del ciclo TCA y/o menos anaplerosis.

Como apreciaría bien el experto en el arte, la referencia en este documento a un nivel de expresión aumentado o disminuido (por ejemplo, un nivel de expresión de ácido nucleico o proteína, o el nivel de un metabolito) o actividad (por ejemplo, actividad enzimática) incluye y abarca niveles de expresión relativos y absolutos. A modo de ejemplo, se puede determinar un nivel relativo de expresión o actividad en relación con un nivel de expresión o actividad de referencia o estándar, tal como en una muestra obtenida de un individuo o población de individuos normales o sin sufrimiento.

Un cambio o alteración en el nivel de un metabolito o el nivel de expresión de proteína enzimática, expresión génica y/o actividad enzimática en un animal que tiene o está predisposto a una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular se puede determinar comparando dichos niveles de una muestra biológica obtenida de dicho animal con aquellos niveles de otro animal que se sabe que no tienen, o que no están predisuestos a, una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular o esos niveles de la población general o una población de referencia.

En una realización de la divulgación, una disminución o reducción en el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican respectivamente enzimas asociadas con el metabolismo energético y/o una disminución o reducción en el nivel de expresión y/o actividad de dicha (s) enzima (s) y/o una disminución o reducción en el nivel de uno o más metabolitos asociados con el metabolismo energético indican que dicho animal tiene o está predisposto a la enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa y/o neuromuscular.

En otra realización más de la divulgación, un aumento en el nivel de expresión de uno o más ácidos nucleicos que codifican respectivamente enzimas asociadas con el metabolismo energético y/o un aumento en el nivel de expresión y/o actividad de dicha (s) enzima (s) y/o un aumento en el nivel de uno o más metabolitos asociados con el metabolismo energético indica que dicho animal está respondiendo a la administración de uno o más agentes anapleróticos.

Por lo general, el uno o más ácidos nucleicos que codifican respectivamente enzimas asociadas con el metabolismo energético y/o dicha (s) enzima (s) y/o el uno o más metabolitos asociados con el metabolismo energético se detectan o miden en una muestra biológica. La muestra puede ser una muestra de fluido, célula o tejido obtenida del animal.

En este contexto, un "ácido nucleico" puede ser ADN monocatenario o bicatenario que incluye ADN genómico y ADNc aunque sin limitación al mismo o puede ser ARN monocatenario o bicatenario que incluye ARNm y miARN, aunque sin limitación a esto. Un ejemplo particular de un ácido nucleico es un "producto de amplificación" resultante de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico. Los ejemplos no limitantes de cebadores apropiados para la amplificación de ácidos nucleicos de ácidos nucleicos que codifican estas enzimas comprenden las secuencias de nucleótidos respectivas expuestas en la tabla 1.

Tabla 1. Nombres de genes, números de acceso de GenBank, símbolos, secuencias de cebador directo e inverso (SEQ ID NOS: 1-20) usados para los estudios de expresión génica de genes metabólicos.

Gen	Símbolo	Secuencia 5' a 3'
Propionil-CoA Carboxilasa (Subunidad A) NM_144844.2	<i>Pcca</i>	F AGAATTGCAAGGGAAATTGG (SEQ ID NO: 1) R CTAAAGCCATCCCTGGTCTC (SEQ ID NO: 2)
Propionil-CoA Carboxilasa (Subunidad B) NM_025835.2	<i>Pccb</i>	F AGCCTACAAACATGCTGGACA (SEQ ID NO: 3) R GGTCCCTCCCATTCTATTCTTG (SEQ ID NO: 4)
Metilmalonil-CoA mutasa NM_008650.3	<i>Mut</i>	F CCAAACACTGACCGTTCTCA (SEQ ID NO: 5) R GGAATGTTAGCTGCTTCAGG (SEQ ID NO: 6)
Piruvato carboxilasa NM_008797.3	<i>Pcx</i>	F GAGCTTATCCCGAACATCCC (SEQ ID NO: 7) R TCCATACCATTCTCTTGGCC (SEQ ID NO: 8)
Piruvato deshidrogenasa E1 alfa 1 NM_008810.2	<i>Pdha1</i>	F AACTTCTATGGAGGCAACGG (SEQ ID NO: 9) R CTGACCCCTGATTAGCAGCAC (SEQ ID NO: 10)
Gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa NM_008084.2	<i>Gapdh</i>	F ATACGGCTACAGCAACAGGG (SEQ ID NO: 11) R TCTGCTCAGTGTCCCTTGCT (SEQ ID NO: 12)
Oxoglutarato deshidrogenasa NM_010956.4	<i>Ogdh</i>	F TGAGATGTGCAATGATGAC (SEQID NO: 13) R GCAGCACATGGAAGAAGTTG(SEQ ID NO: 14)
Complejo de deshidrogenasa de succinato (Subunidad A) NM_023281.1	<i>Sdha</i>	F GGAACACTCCAAAAACAGACCT (SEQ ID NO: 15) R CCACCACTGGTATTGAGTAGAA (SEQ ID NO: 16)
Glutamato-piruvato transaminasa 1 NM_182805.2	<i>Gpt1</i>	F TGAGGTTATCCGTGCCAATA (SEQ ID NO: 17) R GTCCGGACTGCTCAGAAGAT (SEQ ID NO: 18)
Glutamato-piruvato transaminasa 2 (alanina aminotransferasa) NM_173866.3	<i>Gpt2</i>	F GCGACGGTATTCTACAATCC (SEQ ID NO: 19) R CGCGGAGTACAAGGGATACT (SEQ ID NO: 20)

Como es bien conocido en la técnica, los métodos de medición de la expresión génica pueden incluir, pero no se limitan a, transferencia de Northern, técnicas de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, qPCR, PCR en tiempo real y PCR competitiva), perfil de expresión de alto rendimiento (por ejemplo, micromatrizes), análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y RNA-seq.

5 Las técnicas apropiadas para medir el nivel de expresión de enzimas asociadas con el metabolismo energético son igualmente conocidas. Tales técnicas pueden incluir, pero no se limitan a, inmunoensayos (por ejemplo, transferencias Western), radioinmunoensayos, ensayos de inmunosorción enzimática (ELISA), técnicas de micromatrizes de proteínas (por ejemplo, micromatrizes de proteínas de fase inversa (RPPA), métodos histológicos (por ejemplo, inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHC)), ensayos colorimétricos/fluorométricos/de luminiscencia y enfoques proteómicos tales como la espectrometría de masas (MS) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

10 Las técnicas apropiadas para medir el nivel de metabolitos asociados con el metabolismo energético también son bien conocidas en la técnica. Tales técnicas pueden incluir, pero no se limitan a, ensayos enzimáticos colorimétricos/fluorométricos/de luminiscencia, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masas (MS) junto con cromatografía de gases o líquidos (GC-MS o LC-MS) y métodos histológicos. (por ejemplo, inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IHC) para GABA).

15 El experto en el arte conocería los métodos estándar para medir la actividad enzimática, tales como los descritos en Enzyme Assays: A Practical Approach (The Practical Approach Series) de Eisenthal R and Danson M (2nd edition, Oxford University Press, 2002).

20 15 Para que la invención se pueda entender fácilmente y ponerse en práctica, se proporciona el siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efectos de la triheptanoína sobre la ALS en un modelo animal

Materiales y métodos

25 20 Animales

Todos los experimentos fueron aprobados por the University of Queensland's Animal Ethics Committee and followed the guidelines of the Queensland Animal Care and Protection Act 2001. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales usados. Se generaron ratones de tipo salvaje y hSOD1^{G93A} (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J, stock no. 004435, Jackson laboratory, Maine, EE. UU.) al aparear machos hSOD1^{G93A} con hembras de tipo salvaje C57B/L6 (Universidad de Queensland). Los ratones se alojaron en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y tuvieron libre acceso a alimentos y agua. Los experimentadores fueron cegados al genotipo animal (hasta que los ratones comenzaron a expresar el fenotipo ALS) y las intervenciones dietéticas.

Intervención dietética

30 30 Inmediatamente después del destete, los ratones se colocaron en una dieta estándar (SF11-027, Specialty Feeds, WA, AUS) o una dieta combinada (SF11-028, Specialty Feeds) en la que el 35% de las calorías provenían del aceite de triheptanoína. (Sasol, Alemania). Todas las dietas se combinaron en contenido de proteínas, minerales, antioxidantes y vitaminas en relación con sus densidades calóricas (Thomas et al., 2012). La triheptanoína reemplazó a la sacarosa, algunos de los carbohidratos complejos y las grasas de cadena larga en la dieta.

Ensayos de enzimas

35 40 Las fracciones citosólicas y mitocondriales se aislaron del músculo gastrocnemio mediante homogeneización (triturador de tejido Potter-Elvehjem) en solución reguladora de aislamiento fría (EDTA 10 mM, D-manitol 215 mM, sacarosa 75 mM, BSA al 0.1% y HEPES 20 mM, pH 7.4). Las muestras se centrifugaron a 700 g durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 10.500 g durante 10 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se resuspendieron las pellas en 1 mL de solución reguladora de aislamiento. Se repitió el procedimiento de centrifugación y el sobrenadante colectivo (fracción citosólica) y las pellas resuspendidas (fracción mitocondrial) se almacenaron a -80 °C.

45 45 Las actividades de todas las enzimas se midieron mediante ensayos espectrofotométricos continuos a 25 °C en el lector de microplacas Sunrise Tecan (Tecan, Mannedorf, Suiza). La reducción de NAD y NADP (actividad de OGDH y PGI, respectivamente) o la oxidación de NADH (actividad de PFK) se midió por el cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo a una longitud de onda de 340 nm. Todas las tasas de actividad se corrigieron a miligramos de proteína en muestras, usando el kit de análisis de proteínas BCA (Thermo Scientific, Illinois, EE. UU.).

Ensayo de OGDH

50 50 El ensayo se adaptó de Lai & Cooper, 1986. La mezcla de ensayo contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), CoA de sodio 0.2 mM, dinucleótido de nicotinamida y adenina 2 mM, pirofosfato de tiamina 0.5 mM, cloruro de magnesio 0.5 mM, ditiotreitol 10 mM y 10 µL de mitocondrias aisladas de la muestra. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de oxoglutarato 10 mM para medir la reducción de NAD.

Ensayo de PGI

La actividad de la fosfoglucosa isomerasa (PGI) se midió acoplando la reacción a la reducción de NADP a través de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla de ensayo contenía Tris-HCl 100 mM (pH 7.4), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 0.6 mM, cloruro de magnesio 17.5 mM, glucosa deshidrogenasa 6-fosfato 5U/mL (G8404, Sigma Aldrich) y 5 µL de la fracción citosólica de las muestras. La reacción se inició mediante la adición de fructosa 6-fosfato 10 mM.

5

Ensayo PFK

La actividad de la fosfofructoquinasa se midió acoplando la producción de fructosa 1,6-bisfosfato de la reacción a las enzimas aldolasa, α-glicerofosfato deshidrogenasa y triosefósфato isomerasa para medir la oxidación de NADH. La mezcla de ensayo contenía Tris-HCl 80 mM (pH 7.4), ditiotreitol 2 mM, trifosfato de adenosina 3,6 mM, dinucleótido de nicotinamida adenina 0.6 mM reducido, cloruro de magnesio 20 mM, aldolasa 6U/mL (A8811, Sigma Aldrich), 1U/mL de α-glicerofosfato deshidrogenasa y 5U/mL de triosefósфato isomerasa (G1881, Sigma Aldrich) y 5 µL de la fracción citosólica de las muestras. La reacción se inició mediante la adición de fructosa 6-fosfato 15 mM.

10

Pruebas de comportamiento y observación

15

Los animales se sometieron a pruebas de comportamiento aproximadamente 3-4 horas en el ciclo de luz. Todas las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo en un entorno con estímulos mínimos para minimizar los posibles efectos causados por cambios en los estímulos externos. Se pesaron los animales antes de cada sesión de prueba. Se observaron ratones y se rastreó y calificó la progresión de la enfermedad según una hoja de puntaje neurológico para garantizar que las muertes no relacionadas con ALS fueran excluidas del estudio. La puntuación neurológica se adaptó de los criterios desarrollados en el instituto de desarrollo de terapia ALS (Gill et al., 2009). De acuerdo con los requisitos éticos, los ratones hSOD1^{G93A} que se volvieron demasiado débiles para alcanzar las tolvas de comida recibieron comida húmeda en el piso de las jaulas. El punto final del estudio se definió como que el ratón no puede enderezarse dentro de los 15 segundos posteriores a su colocación. Al llegar a la fase final o a las 25 semanas de edad, los ratones transgénicos y sus respectivas camadas salvajes fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (120 mg/kg, i.p., Provet, Australia). Tejidos, incluido el m. gastrocnemio y cola, fueron recogidos para su posterior análisis. Para medir el momento en que comenzó la pérdida de peso corporal, definimos el día en que se observó una pérdida de más del 10% del peso corporal medio combinado de la semana 12 a la 17 y todas las tres mediciones posteriores fueron ≤ 90% de la media original peso.

20

Prueba de fuerza de agarre de las extremidades posteriores

25

Las pruebas de fuerza de agarre de las extremidades posteriores se realizaron dos veces por semana usando un transductor de fuerza de barra en T (Ugo Basile, Italia). El animal fue sujetado por la cola, asegurándose de que sus extremidades posteriores agarraran la barra en T antes de ser empujados hacia abajo en un ángulo de 60°. La lectura en el transductor de fuerza se tomó solo si ambas extremidades posteriores liberaron la barra al mismo tiempo. El promedio de 10 ensayos por ratón se registró en cada sesión de entrenamiento. Para comparar los puntos de tiempo de pérdida de fuerza de agarre, el punto de tiempo en el que se registró una pérdida de más del 30% de la fuerza de agarre media combinada de la semana 9 a la 13, si las 3 mediciones posteriores fueron ≤ 70% de la fuerza promedio original.

30

Prueba de Rotarod

35

Las pruebas de rotarod se realizaron con 10 repeticiones una vez por semana usando un rotarod diseñado para ratones (Ugo Basile, Italia). Los animales se colocaron en la barra y luego la barra se hizo girar durante 3 minutos a 25 revoluciones por minuto. Se registró el momento en que el animal se cayó. Definimos la edad de pérdida de equilibrio en el Rotarod cuando este tiempo era cero.

40

Genotipado cuantitativo

45

Todos los ratones fueron genotipados post-mortem por PCR cuantitativa en tiempo real según un procedimiento descrito previamente para evaluar el número relativo de copias del transgén hSOD1^{G93A} (Alexander et al., 2004). Los cebadores usados fueron documentados por el laboratorio de Jackson para genotipar con PCR convencional (<http://jaxmice.jax.org>). La concentración final de cebadores directos e inversos en cada reacción fue de 0.4 µM para hSOD y 0.5 µM para interleucina 2 de ratón (ml12) mezclada con ADN genómico de 5 ng y 5 µL de SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, CA, EE. UU.). El perfil térmico para el ensayo fue un arranque en caliente inicial de 95 °C, durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C, durante 30 segundos, 60 °C, durante 1 minuto y 72 °C, durante 30 segundos (sistema de PCR en tiempo real ABI 7900HT, Applied Biosystems). Finalmente, la curva de fusión se generó calentando a 95 °C, durante 2 minutos, enfriando a 60 °C, durante 15 segundos y una rampa de calentamiento final del 2% a 95 °C, durante 15 segundos. Se añadió agua para reemplazar el ADN en los controles negativos. Los valores de CT se calcularon mediante el software de detección de secuencia 2.4 a partir de los datos sin procesar. El número de copias se calculó luego usando la ecuación que se documenta a continuación.

50

$$\text{Número de copia} = (2^{(\text{CT}_{\text{hSOD1}} \log_2 1.82) - (\text{CT}_{\text{ml12}} \log_2 2.01)}) 2$$

Extracción de ARN, síntesis de ADNc, ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real.

Después de la eutanasia, el músculo gastrocnemio se eliminó rápidamente y se congeló en nitrógeno líquido. Para extraer ARN, las muestras musculares se pulverizaron en nitrógeno líquido con un mortero frío y una mano de mortero, se disolvieron con reactivo TRI (Life Technologies, CA, EE. UU.) Y se extrajeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN contaminante se eliminó mediante el tratamiento con DNase I y el ADNc se sintetizó usando el kit de síntesis de ADNc Tetro (Bioline, Londres, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se analizó la expresión de varios genes metabólicos (Gapdh, Pdha1, Ogdh, Sdha, Pcx, Gpt1, Gpt2, Pcca, Pccb y Mut) por PCR cuantitativa en tiempo real. Se evaluó la eficacia de todos los pares de cebadores (Tabla 1) usando una serie de diluciones en serie de 4 veces de ADNc muscular. La pendiente derivada de cada par de cebadores se usó para calcular la eficiencia aplicando la fórmula 4 [$(-1/\text{pendiente}) - 1$] * 100. Las reacciones consistieron en ADNc diluido, 5 µL de SYBR Green Mastermix y 8 µM de cebadores directos e inversos cada uno, y se amplificaron después de un arranque en caliente inicial. Las condiciones para el ciclo y la curva de fusión fueron idénticas a las descritas para el genotipado cuantitativo. Las muestras sin tratamiento de transcriptasa inversa se analizaron para garantizar que las muestras estuvieran libres de contaminación de ADN. La expresión de pliegue (ΔCT) del gen de interés (goi) en relación con la media geométrica de los genes constitutivos (Tbp, B2m y Hmbs) se calculó con una fórmula adaptada de (Vandesompele et al., 2002) teniendo en cuenta al individuo eficiencias (E) de cada par de cebadores.

$$\Delta CT_{\text{goi}} = 2^{\frac{-}{(-3\sqrt{(CT_{\text{TBP}} \log_2 2.03)(CT_{\text{B2m}} \log_2 2.03)(CT_{\text{HMBS}} \log_2 1.86)})}}[(CT_{\text{goi}} \log_2 E_{\text{goi}})]$$

Recuento de neuronas motoras

Los ratones se alimentaron con dieta de control o triheptanoína desde los 35 días hasta los 70 días de edad, cuando los ratones se anestesiaron con pentobarbital (100 mg/kg i.p.), perfundidos con solución salina al 0.9% seguido de paraformaldehído al 4%. Se retiraron las médulas espinales y se fijaron adicionalmente en paraformaldehído al 4% y posteriormente se incrustaron en compuesto OCT y se cortaron secciones en serie de 16 µm de las vértebras lumbares. Las secciones se lavaron en PBS frío y se tiñeron con tiamina al 0.1% en solución reguladora de acetato (pH 3.4). Las neuronas motoras se contaron usando el método estereológico como se describió anteriormente (Banks et al., 2001; 2003; Forgarty et al., 2013). Brevemente, se contaron las neuronas motoras en la columna motora lateral (LMC) de un lado de la médula espinal y solo se contaron las neuronas de gran tamaño con citoplasma teñido de color oscuro, núcleo pálido y nucléolos teñidos de color oscuro (Clarke and Oppenheim, 1995). Cada décima sección de las regiones lumbar 2 a lumbar 5 se contó para obtener el recuento total de neuronas motoras, que luego se dividió entre el número de secciones contadas y se multiplicó por el número total de secciones que contenían el LMC.

Análisis de los datos

Las estadísticas se realizaron con Graphpad Prism (versión 5.03) usando ANOVA de una o dos vías seguido de pruebas post-hoc Bonferroni de comparaciones múltiples para el análisis de varios grupos. Para la comparación del inicio de la pérdida de peso corporal y el área bajo la curva (AUC) para la fuerza de agarre de la extremidad posterior, se emplearon pruebas t sin emparejar de dos colas. El análisis de regresión lineal con comparación de pendiente e intercepción se usó para comparar la edad de pérdida de fuerza de agarre de la extremidad posterior y la pérdida de peso corporal versus el número de copia del transgén. Los datos se representan como media ± SEM.

El análisis de potencia usando las desviaciones estándar promedio para los comienzos de pérdida de fuerza de agarre y equilibrio en rotarod mostró que n=5 fue suficiente para observar cambios entre medias en 2.3 y 1.5 semanas, respectivamente con 80% de potencia al nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Alteraciones metabólicas en el músculo de ratones hSOD1^{G93A}. Primero nos propusimos confirmar que el metabolismo energético se ve afectado en ratones hSOD1^{G93A} en la fase media y final de la enfermedad. Específicamente, encontramos que en el *m. gatrogemicus*, los niveles de lactato se reducen en la fase media (110-130 días) en un 29%, lo que indica una glucólisis reducida (Figura 2, panel A). Esto se puede explicar por la reducción observada en la actividad máxima de la fosfoglucosa isomerasa en un 28.5% y la fosfofructoquinasa en un 53% de disminución, mientras que la actividad máxima de la enzima oxo-glutarato deshidrogenasa del ciclo TCA sensible al estrés oxidativo se redujo en un 25% (* p <0.05 Pruebas t. N = 5-8 ratones/grupo, Figura 2, panel B). En contraste, en la fase final, los niveles de glucosa muscular se elevaron 1.9 veces, lo que sugiere la pérdida de glucólisis.

La triheptanoína retraza el inicio de la pérdida de la fuerza de agarre de las extremidades posteriores y el equilibrio en ratones hSOD1G93A. Una de las características de ALS en ratones hSOD1^{G93A} es la pérdida progresiva de masa muscular y fuerza. De este modo, las pruebas de fuerza de agarre de las extremidades posteriores se usaron para

evaluar el curso de la progresión de la enfermedad en ratones con una dieta de control o triheptanoína. No hubo diferencias observables entre la media de la fuerza de agarre de la extremidad posterior de los ratones de tipo salvaje en la dieta de control ($n = 12$) en comparación con los de la dieta de triheptanoína ($n = 15$; todos los ratones hSOD1^{G93A} incluyendo un número de copias transgénicas más bajo). La fuerza media de agarre de la extremidad posterior para ratones alimentados con control y alimentados con triheptanoína disminuyó consistentemente entre 300 y 600 mN (Figura 3A).

Durante el transcurso de los experimentos, se observó que algunos ratones hSOD1^{G93A} desarrollaron una pérdida de la fuerza de agarre de la extremidad posterior después de las 22 semanas de edad. El análisis del número de copias del transgén hSOD1^{G93A} reveló que una subpoblación de ratones hSOD1^{G93A} tenía solo 12-17 copias del transgén SOD1. Al evaluar a todos los ratones (Figura 3E), las regresiones lineales entre la edad de pérdida de fuerza que comienza con los números de copias transgénicas son significativamente diferentes entre los grupos alimentados con dieta de control ($R^2=0.89$) frente a triheptanoína ($R^2=0.91$). Específicamente, las intersecciones x e y son diferentes entre las dos líneas de regresión ($p <0.001$) (lo que indica que la triheptanoína retrasa efectivamente el inicio de la pérdida de fuerza de agarre), pero no las pendientes ($p = 0.90$).

Para los siguientes análisis, los ratones con solo 12-17 copias del transgén SOD1 se excluyeron del análisis de la fuerza de agarre y la expresión génica. Los ratones con 19-24 copias del transgén se combinaron como un grupo con un alto número de copias del transgén. La fuerza de agarre de los ratones hSOD1^{G93A} en ambas dietas nunca excedió los 400 mN (Figura 3B). El curso temporal de la fuerza de agarre de la extremidad posterior reducida fue significativamente diferente entre los ratones con alto número de copias hSOD1^{G93A} en la dieta de control ($n = 5$) en comparación con aquellos en la dieta de triheptanoína (Figura 3B, $n = 8$; $p = 0.04$, ANOVA de dos vías) Las pruebas de comparación múltiple de Bonferroni indicaron que a la edad de 18 y 19.5 semanas, los ratones hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína tenían una mayor fuerza de agarre de las extremidades posteriores en comparación con los ratones hSOD1^{G93A} alimentados con dieta de control (Figura 3B, $p <0.05$). El área bajo la curva para la fuerza de agarre con el tiempo para cada ratón con triheptanoína se incrementó en un 38% en relación con la dieta de control ($p = 0.024$, prueba t, Figura 3C). Los ratones hSOD1^{G93A} en la dieta de control comenzaron a perder la fuerza de agarre de las extremidades posteriores a las 16.5 semanas de edad. El tiempo de inicio de la pérdida de la fuerza de agarre de las extremidades posteriores se retrasó 2.8 semanas en ratones hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína (figura 3D). En la prueba de rotarod, el comportamiento de los ratones hSOD1^{G93A} varió ampliamente, muchos ratones parecían no estar "motivados" para aprender a equilibrarse en la barra y no se alcanzó una línea de base presintomática satisfactoria. Por lo tanto, solo pudimos evaluar el momento en que los ratones no pudieron permanecer en la barra. La triheptanoína retrasó el tiempo de inicio de la pérdida de equilibrio en 1.6 semanas ($p = 0.0016$; Figura 3F).

Pérdida de peso corporal y supervivencia en ratones hSOD1^{G93A} con y sin triheptanoína. El peso corporal es otro indicador de la progresión de la enfermedad en ratones transgénicos hSOD1^{G93A}. En comparación con los ratones de tipo salvaje en la dieta de control ($n=12$), los ratones de tipo salvaje en la dieta de triheptanoína ($n=15$) aumentaron de peso a un ritmo más lento y fueron más ligeros cuando se sacrificaron ($p <0.0001$, Figura 3G). A las 14 semanas de edad, los ratones de tipo salvaje alimentados con triheptanoína eran aproximadamente 3 g más ligeros que los ratones de tipo salvaje alimentados con control ($p <0.05$). Esta diferencia de peso aumentó a aproximadamente 4 g a las 22 semanas de edad.

Los ratones que llevaban 19-24 copias del transgén hSOD1 en la dieta de control ($n = 5$) y la dieta de triheptanoína ($n = 8$) eran más ligeros en comparación con los ratones de tipo salvaje en la dieta de control ($p <0.0001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los ratones transgénicos hSOD1^{G93A} en diferentes dietas durante el período de tiempo completo. Sin embargo, en comparación con la dieta de control, los ratones hSOD1^{G93A} alimentados con triheptanoína mostraron una tendencia a un aumento de peso corporal reducido de 7-16 semanas. Durante el procedimiento de la enfermedad después de las 20 semanas de edad, el peso corporal de los ratones hSOD1^{G93A} en la dieta de control y triheptanoína se volvió similar (Figura 3G). El inicio de la pérdida de peso corporal en ratones hSOD1^{G93A} se retrasó por la alimentación de triheptanoína por 1.6 semanas (Figura 3F, $p = 0.007$, prueba t de dos colas no apareada).

Solo un pequeño número de ratones hSOD1^{G93A} alcanzó la etapa final de la enfermedad, por lo tanto, nuestro análisis de supervivencia es de potencia limitada. No se observaron diferencias en el número de días que se tarda en alcanzar la fase final al comparar triheptanoína ($n=7$) con ratones hSOD1^{G93A} alimentados con control ($n=5$) (174.9 ± 3.5 frente a 172.4 ± 3.9 , $p = 0.653$), lo que indica que, en este pequeño estudio, el tratamiento con triheptanoína no alteró la supervivencia.

Recuentos de neuronas motoras. Evaluamos el número de neuronas motoras mediante recuento estereológico entre L2 y L5 en ratones a los 70 días, que corresponde al inicio de la enfermedad. La pérdida estadísticamente significativa del 37% de las neuronas motoras en hSOD1^{G93A} frente a ratones de tipo salvaje alimentados con dieta de control (CON, $n = 3-4$) se alivió con la alimentación de triheptanoína, ya que el número de neuronas no era significativamente diferente de los ratones de tipo salvaje ($n=4$, figura 4).

Estudios de expresión génica. Para evaluar el grado en que el metabolismo del ciclo TCA o la anaplerosis pueden verse afectados en el músculo gastrocnemio de ratones hSOD1^{G93A} con número medio de copias a las 10 semanas al inicio de los síntomas, se usó PCR cuantitativa en tiempo real para comparar la expresión de genes implicados en estas vías.

- 5 Los ratones hSOD1^{G93A} en los dos grupos de dieta tuvieron números de copias de hSOD1^{G93A} similares, con 12-17 (promedio 14.4 copias) en el grupo alimentado con la dieta de con y 12-20 (promedio 15.75) copias en el grupo alimentado con triheptanoína ($p = 0.51$ prueba t no apareada). se elige estudiar la expresión de enzimas implicadas en la glucólisis (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa - Gapdh), el ciclo TCA (2-oxoglutarato y succinato deshidrogenasas, Figura 5) y las vías anapleróticas del músculo. Estos últimos incluyen piruvato carboxilasa (Pcx) que produce oxaloacetato, glutámico pirúvico transaminasa 1 y 2 (Gpt1 y 2, Figura 5) y las enzimas de la vía de propionil-CoA carboxilación (Figura 6), es decir, la subunidad alfa y beta de propionil-carboxilasa (Pcca y Pccb) y metilmalonil mutasa (Mut), que juntas metabolizan propionil-CoA a succinil-CoA. Se incluyeron ratones alimentados con triheptanoína en este análisis para investigar si la triheptanoína pudiera aliviar cualquier alteración observada.
- 10 10 En ratones hSOD1^{G93A} presintomáticos de 10 semanas de edad, la PCR cuantitativa en tiempo real mostró que, en comparación con los ratones de tipo salvaje, se redujo la expresión de varias deshidrogenasas y metil-malonil mutasa. A saber, encontramos reducciones estadísticamente significativas para los niveles de ARNm de la subunidad A1 de piruvato deshidrogenasa (Pdha1) en un 24%, 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Ogdh) en un 30%, la subunidad A de succinato deshidrogenasa (Sdha) en un 23% y metilmalonil mutasa (Mut) en un 27.5% en ratones hSOD1^{G93A} (Figs. 3, 15 5; todas $p < 0.05$ en la prueba posterior). La alimentación con triheptanoína protegió a los ratones hSOD1^{G93A} de los cambios en la expresión de piruvato y succinato deshidrogenasas, pero no de 2-oxo-glutarato deshidrogenasa y metilmalonil mutasa. No se encontraron alteraciones de los niveles de ARNm en los otros genes investigados, incluidos Gapdh glucolítico y los genes implicados en la anaplerosis, Gpt1 y 2, Pcca y Pccb (Figuras 5 y 6). Nuevamente, la alimentación con triheptanoína evitó algunas de las reducciones del nivel de ARNm, lo que indica que está preservando efectivamente el músculo y su metabolismo.
- 20 20 Discusión
- Efectos de la triheptanoína e importancia clínica.
- 25 Uno de los hallazgos de este estudio es que los ratones hSOD1^{G93A} muestran alteraciones metabólicas (resumidas en la figura 7) en la glucólisis y la actividad enzimática del ciclo TCA. Estas deficiencias metabólicas pueden abordarse mecánicamente alimentando triheptanoína, ya que proporciona un combustible alternativo a la glucosa y mejorará el ciclo TCA y, por lo tanto, la oxidación de cualquier combustible, incluida la glucosa.
- 30 De hecho, la triheptanoína atenuó las reducciones en la expresión génica de las enzimas implicadas en el ciclo TCA y retrasó los síntomas de inicio y progresión de la enfermedad en ratones hSOD1^{G93A}. Esto se observó como un retraso en la muerte de las neuronas motoras, en el inicio de la pérdida de fuerza de prensión y pérdida de equilibrio en el rotarod, un retraso en la pérdida de peso corporal y la reversión de la expresión reducida de los genes del metabolismo. Nuestros datos muestran una clara mejora en la condición de los ratones hSOD1^{G93A} en los que se inició la alimentación con triheptanoína antes del inicio de los síntomas de la enfermedad. Por otro lado, los ratones presintomáticos hSOD1^{G93A} ya muestran pérdida de neuronas flexoras crurales (Ngo et al., 2012).
- 35 Como un triglicérido de cadena media, la triheptanoína proporciona rápidamente ácido heptanoico a la sangre, que puede ingresar a todos los tejidos y mitocondrias por difusión sin la participación de los sistemas portadores. Además, las cetonas C5 son producidas rápidamente por el hígado y pueden ingresar a la mayoría de los tejidos a través de transportadores de monocarboxilato. Por lo tanto, se espera que la anaplerosis por esta vía comience rápidamente después del inicio del tratamiento.
- 40 Nuestros análisis de potencia con respecto a la pérdida de fuerza de agarre y equilibrio muestran que nuestro estudio usó cantidades apropiadas de ratones con respecto a estos análisis de síntomas motores. A partir de esto, nuestros datos muestran una clara preservación de la función muscular (modificación de la enfermedad) a pesar de los posibles efectos de confusión sobre el peso corporal. Estos datos son muy prometedores y justifican la evaluación clínica de seguridad de fase I en pacientes con ALS.
- Cambios metabólicos en el músculo del ratón hSOD1^{G93A}
- 45 45 La disminución en los niveles de lactato en el músculo se interpretó como una disminución en la glucólisis, porque el nivel de lactato se correlaciona fuertemente con los de piruvato. Se asume que los niveles de piruvato se reducen debido a la disminución de la actividad de las enzimas glucolíticas PGI y PFK y, además, la disminución de la actividad de OGDH, lo que indica una disminución del ciclo TCA. Además, nuestros datos cuantitativos de PCR en tiempo real muestran que, en comparación con los ratones sanos de tipo salvaje, la expresión de varias enzimas implicadas en la glucólisis, el ciclo TCA y la anaplerosis se redujeron significativamente en el músculo gastrocnemio de los ratones hSOD1^{G93A} a las 10 semanas de edad (Figuras 5, 6) un momento en que la fuerza de agarre de las extremidades posteriores sigue siendo normal (Figura 3B). En conjunto, la regulación negativa específica de estas enzimas sugiere que el ciclo TCA se ralentiza en el músculo temprano antes del inicio de los síntomas y que se produce ATP insuficiente para la supervivencia del tejido. Además, encontramos niveles reducidos de ARNm de las principales enzimas anapleróticas del músculo, las dos transaminasas pirúvicas glutámicas (gpt1 y 2), a las 25 semanas, lo que sugiere niveles disminuidos de intermedios del ciclo TCA (datos no mostrados).
- 50 50
- 55 55

Además de ralentizar el procedimiento de la enfermedad, la triheptanoína evitó la regulación negativa de varias enzimas que se redujeron en los músculos gastrocnemius de hSOD1^{G93A} en comparación con los ratones de tipo salvaje. Este hallazgo implica que la normalización del metabolismo energético por la triheptanoína puede prevenir la regulación negativa de ciertos genes del metabolismo, lo que a su vez ayudará a mantener un metabolismo saludable para optimizar el suministro de energía y la supervivencia del tejido.

5

Conclusión

Este estudio revela que la triheptanoína es un nuevo enfoque de tratamiento prometedor para la ALS. Nuestros datos respaldan los ensayos iniciales de seguridad clínica y tolerabilidad de triheptanoína en pacientes con ALS.

Referencias

- 10 Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP, Heiman-Patterson TD. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 130: 7-15.
- Allen SP, Rajan S, Duffy L, Mortiboys H, Higginbottom A, Grierson AJ, Shaw PJ. Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Neurobiology of Aging* 2014, 35:1499-1509.
- 15 Banks GB, Chau TN, Bartlett SE, Noakes PG. Promotion of motoneuron survival and branching in rapsyn-deficient mice. *J Comp Neurol* 2001, 429: 156-165.
- Banks GB, Choy PT, Lavidis NA, Noakes PG. Neuromuscular synapses mediate motor axon branching and motoneuron survival during the embryonic period of programmed cell death. *Dev Biol* 2003, 257: 71-84.
- Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: Current and future. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 327-331.
- 20 Clarke PGH, Oppenheim RW. Neuron death in vertebrate development: in vivo methods. *Methods Cell Biol*. 1995, 46: 277-321. Cozzolino M, Carri MT. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progr Neurobiol* 2012; 97: 54-66.
- Forgarty MJ, Smallcombe, KL, Yanagawa, Y, Obata K, Bellingham MC, Noakes PG. Genetic deficiency of GABA differentially regulates respiratory and non-respiratory motor neuron development. *Plos ONE* 2013, 8: e56257
- 25 Gill A, Kidd J, Vieira F, Thompson K, Perrin S. No benefit from chronic lithium dosing in a sibling-matched, gender balanced, investigator-blinded trial using a standard mouse model of familial ALS. *PLoS One* 2009; 4: e6489.
- Lai JCK and Cooper AJL. Brain α-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex: Kinetic Properties, Regional Distribution, and Effects of Inhibitors. *J. Neurochem* 1986, 47, 1376-1386.
- Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurology Res Int* 2011; 2011: 458427.
- 30 Niessen HG, Debska-Vielhaber G, Sander K, Angenstein F, Ludolph AC, Hilfert L, Willker W, Leibfritz D, Heinze HJ, Kunz WS, Vielhaber S. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience* 2007, 25:1669-1677.
- Ngo ST, Baumann F, Ridall PG, Pettitt AN, Henderson RD, Bellingham MC, McCombe PA. The relationship between Bayesian motor unit number estimation and histological measurements of motor neurons in wild-type and SOD1G93A mice. *Clin Neurophysiol* 2012; 123: 2080-2091.
- 35 Roe CR, Mochel F. Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: Therapeutic potential. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 332-340.
- Russell AP, Wada S, Vergani L, Hock MB, Lamont S, Leger B, Ushida T, Cartoni R, Wadley GD, Hespel P, Kralli A, Soraru G, Angelini C, Akimoto T. Disruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 2012, 49C:107-117.
- 40 Shi P, Wei Y, Zhang J, Gal J, Zhu H. Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J Alz Dis* 2010; 20 Suppl 2: S311-324.
- Steyn FJ, Ngo ST, Lee JD, Leong JW, Buckley AJ, Veldhuis JD, McCombe PA, Chen C, Bellingham MC. Impairments to the GH-IGF-I Axis in hSOD1G93A Mice Give Insight into Possible Mechanisms of GH Dysregulation in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Endocrinol* 2012; 153: 3735-3746.
- Thomas NK, Willis S, Sweetman L, Borges K. Triheptanoin in acute mouse seizure models. *Epilepsy Res* 2012; 99: 312-317.

Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. Progr Neurobiol 2008; 85: 94-134.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002; 3: RESEARCH0034.

Vucic S, Kiernan MC. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. Current molecular medicine 2009; 9: 255-272.

Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet J Rare Dis 2009; 4: 3.

Listado de secuencias

- 10 <110> The University of Queensland
 <120> Trastornos neurodegenerativos y métodos de tratamiento y diagnóstico de los mismos
 <130> ULPI-018/01EP 315613-2319
 <140> EP14861265.8
 <141> 2014-11-14
- 15 <150> US 61/904,365
 <151> 2013-11-14
 <160> 20
 <170> Patenting version 3.5
 <210> 1
- 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 1
 agaattgcaa gggaaatgg 20
- 25 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 2
- 30 ctaaagccat ccctggtctc 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
- 35 <400> 3
 agcctacaac atgctggaca 20
 <210> 4
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 4
 ggtcctccca ttcatcttg 20
 5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 5
 10 ccaaacactg accgttctca 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 15 <400> 6
 ggaatttta gctgcttcag g 21
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Mus sp.
 <400> 7
 gagcttatcc cgaacatccc 20
 <210> 8
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 8
 tccataccat tctcttgcc c 21
 <210> 9
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 9
 aacttctatg gaggcaacgg 20
 35 <210> 10
 <211> 20

<212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 10
ctgaccctga ttagcagcac 20
5 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 11
10 atacggctac agcaacaggg 20
<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus sp.
15 <400> 12
tc ttgctc tag tgtcc ttgct 20
<210> 13
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Mus sp.
<400> 13
tgc agatgtg caatgatgac 20
<210> 14
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 14
gc agcacatg gaagaagt tg 20
<210> 15
30 <211> 22
<212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 15
gg aaacactcc aaaaacagac ct 22
35 <210> 16
<211> 23

<212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 16
ccaccactgg gtattgagta gaa 23
5 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 17
10 tgaggttatc cgtgccata 20
<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus sp.
15 <400> 18
gtccggactg ctcagaagat 20
<210> 19
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Mus sp.
<400> 19
gcgacggtat ttctacaatc c 21
<210> 20
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Mus sp.
<400> 20
cgccggagtac aagggatact 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Triheptanoína para su uso en el tratamiento, prevención y/o retraso del inicio de una enfermedad de la neurona motora (MND) en un animal, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de triheptanoína es para la administración a dicho animal, para así tratar, prevenir y/o retrasar el inicio de la enfermedad de la neurona motora (MND) en dicho animal.
2. Triheptanoína para uso según la reivindicación 1, en el que la MND es esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis lateral primaria (PLS), atrofia muscular progresiva (PMA), parálisis bulbar progresiva (PBP), parálisis pseudobulbar o atrofia muscular espinal (SMA).
3. Triheptanoína para uso según la reivindicación 1, en el que la MND es ALS.
- 10 4. Triheptanoína para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la triheptanoína se proporciona al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 5% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.
5. Triheptanoína para uso según la reivindicación 4, en el que la triheptanoína se proporciona al animal en una cantidad que comprende al menos aproximadamente el 30% de la ingesta calórica de la dieta para el animal.
- 15 6. Triheptanoína para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el animal es un mamífero.
7. Triheptanoína para uso según la reivindicación 6, en el que el mamífero es un humano.
8. Triheptanoína para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de triheptanoína es la administración oral.

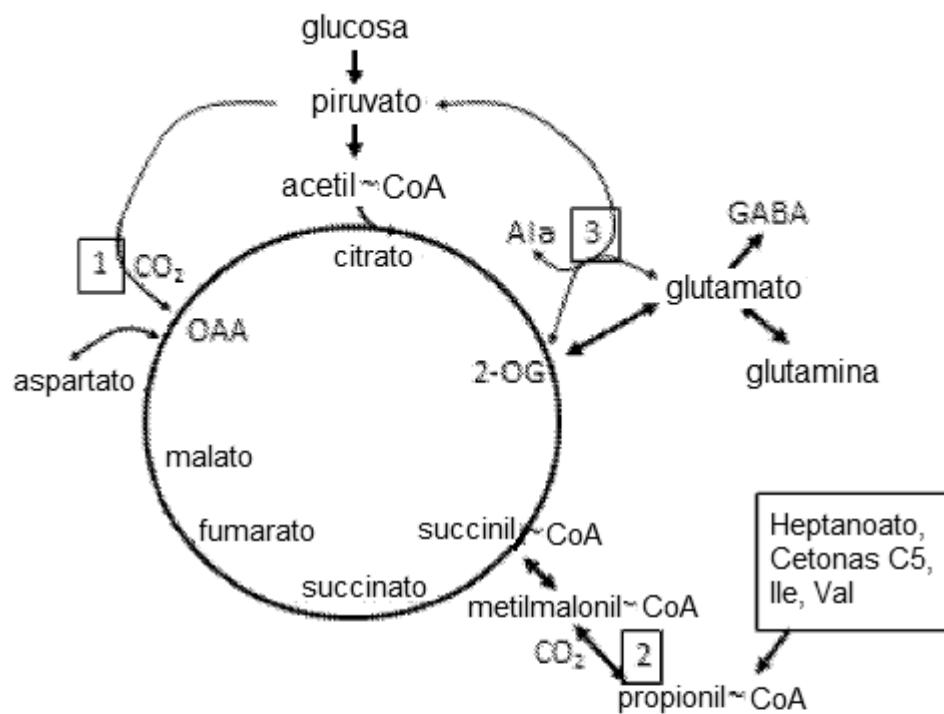
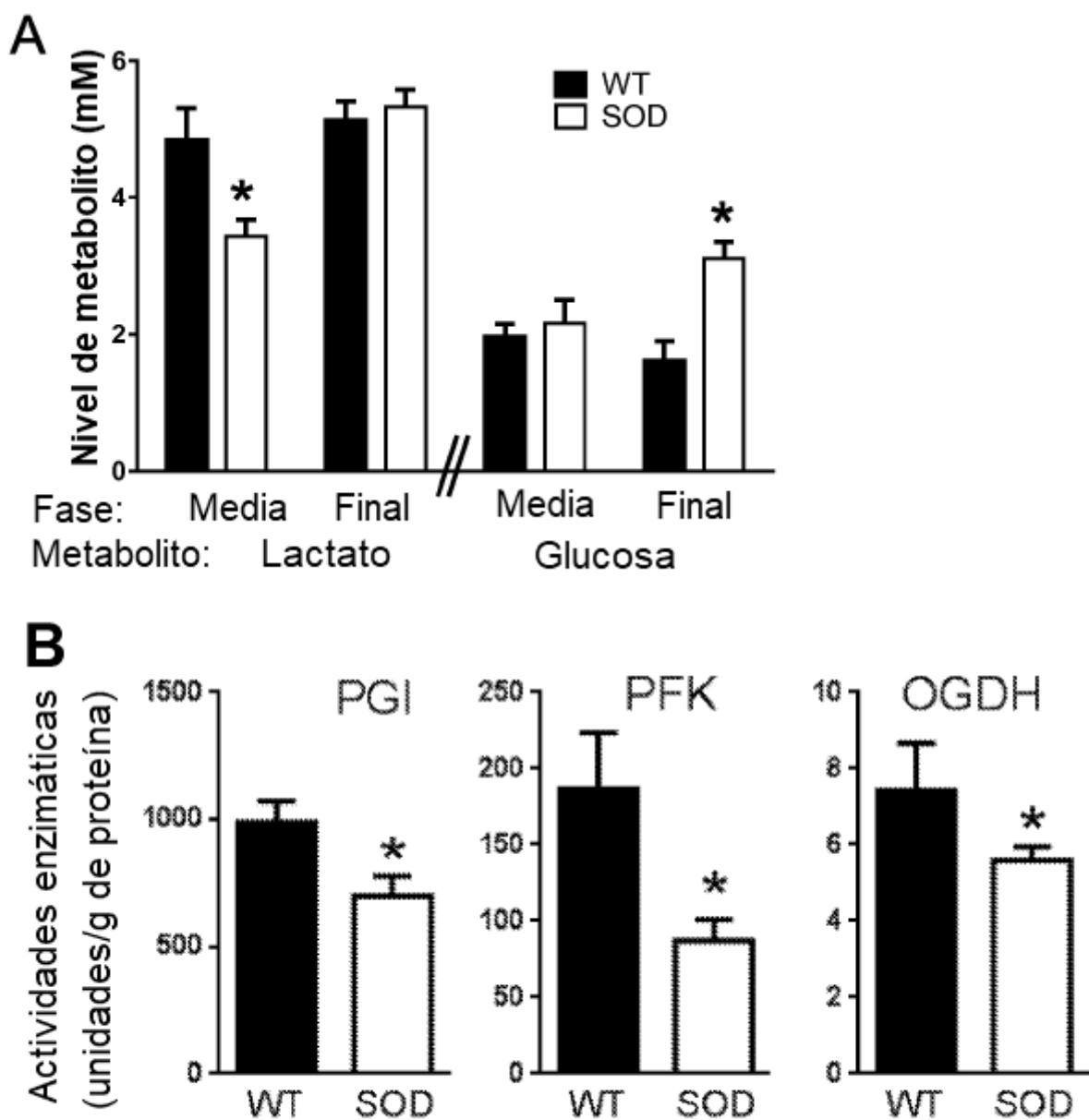
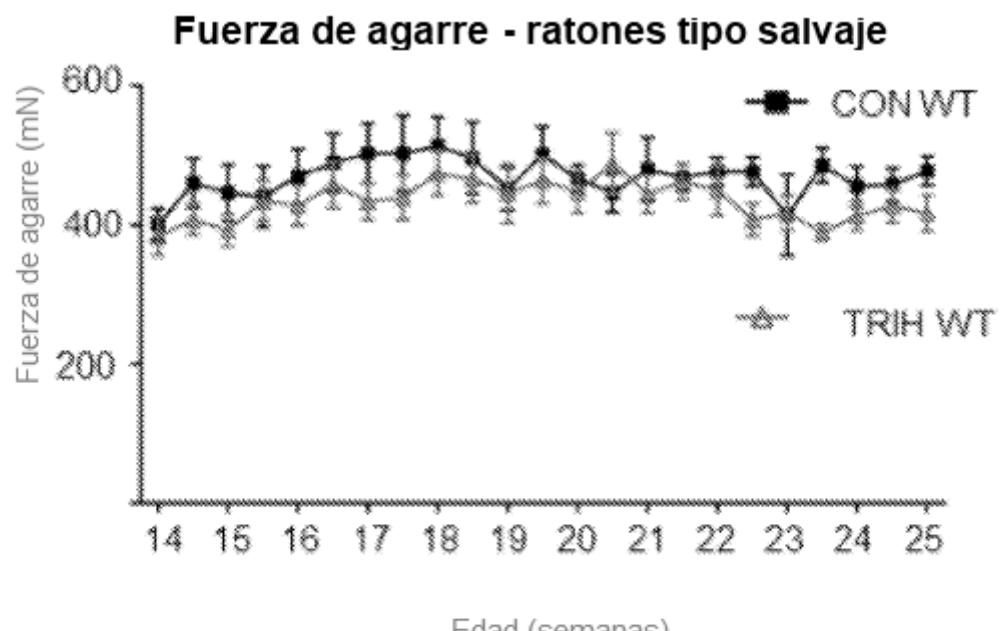
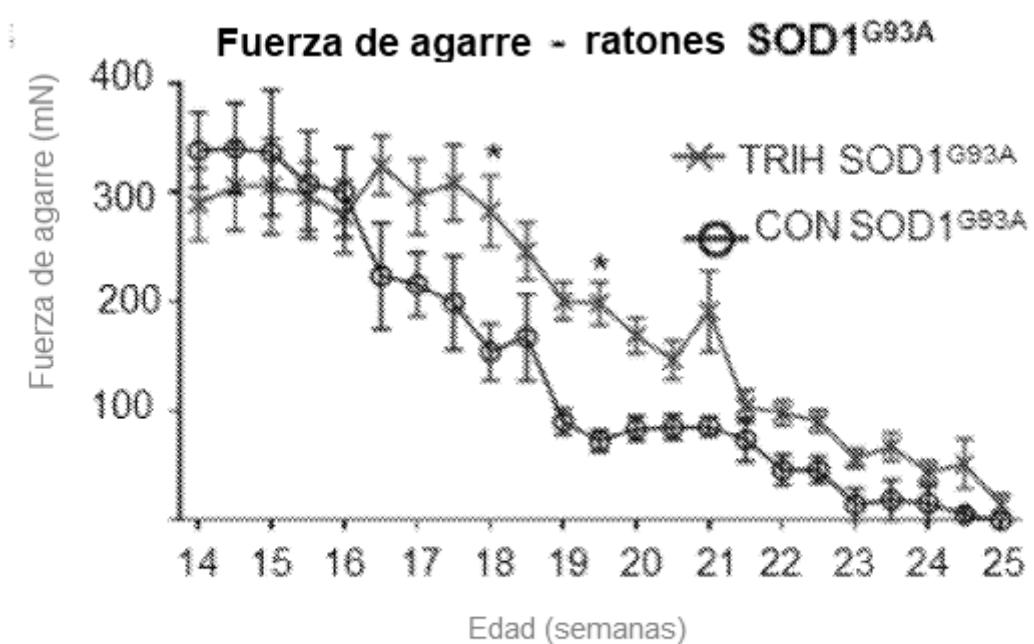
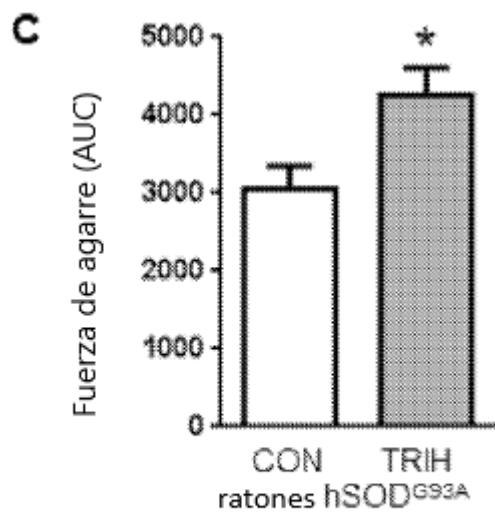
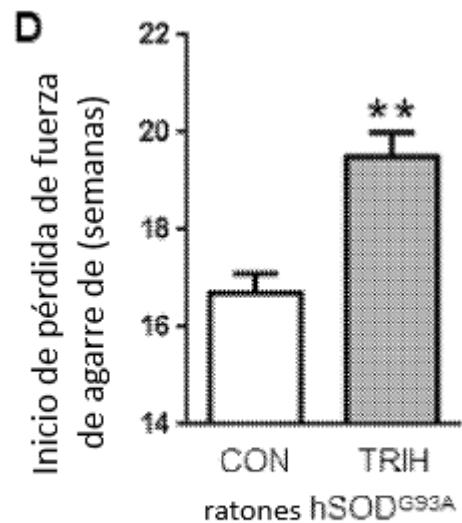
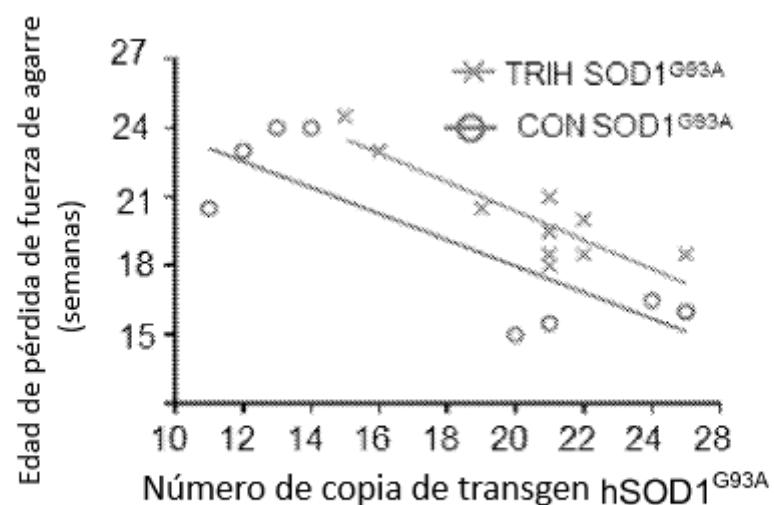


Figura 1

**Figura 2**

**Figura 3A****Figura 3B**

**Figura 3C****Figura 3D****Figura 3E**

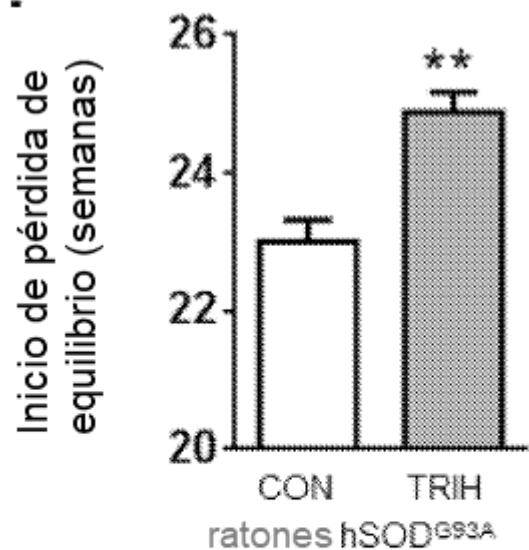
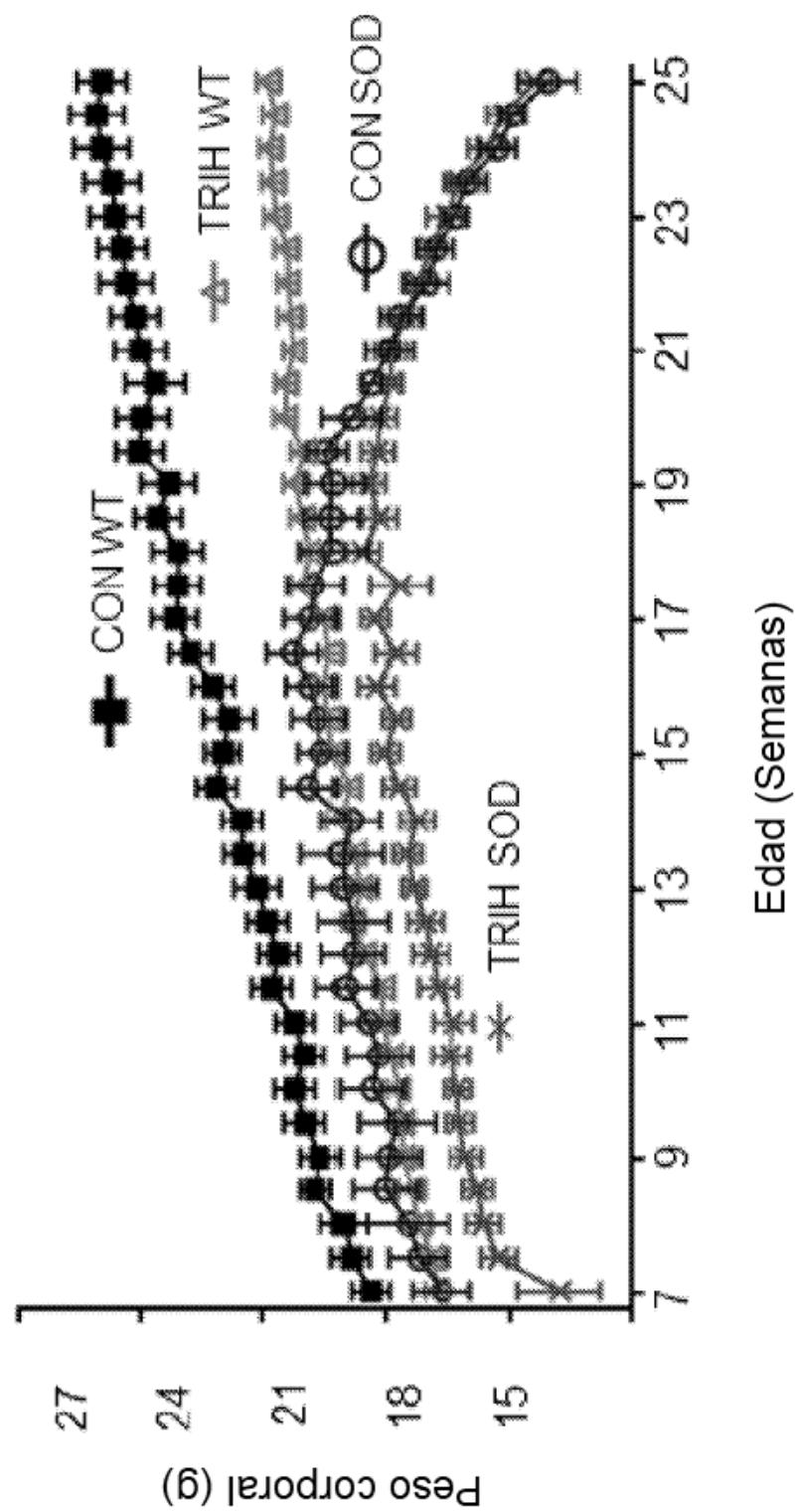


Figura 3F

**Figura 3G**

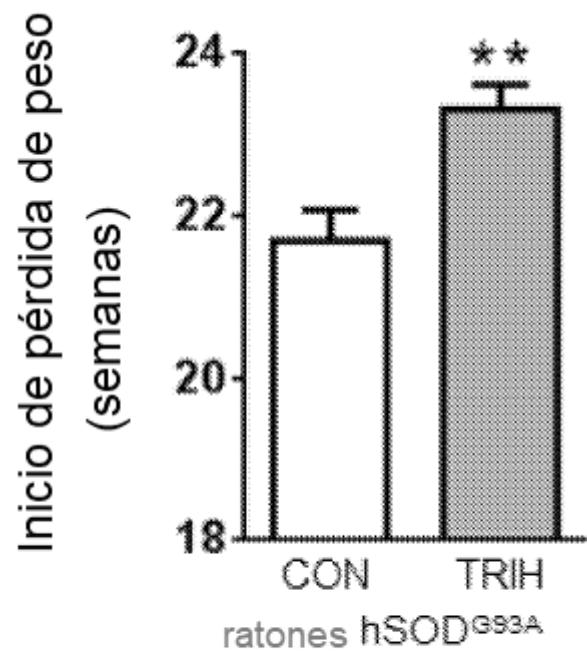


Figura 3H

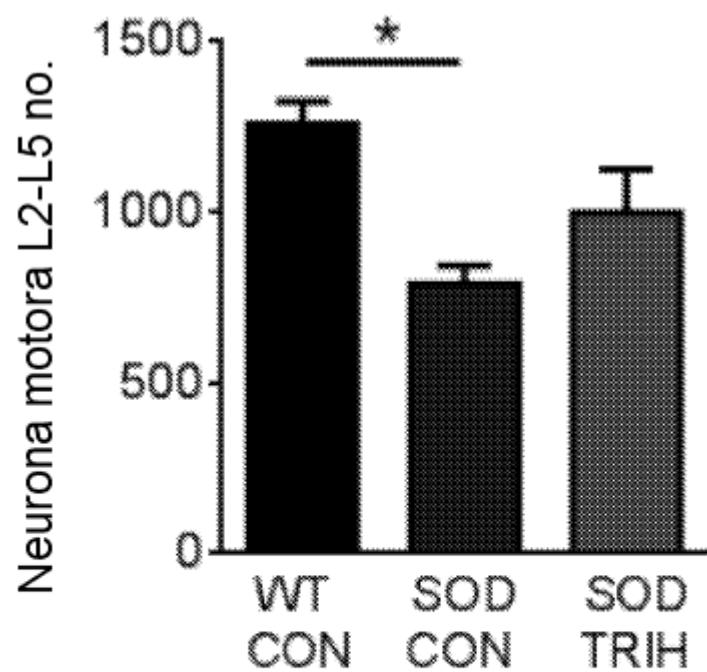
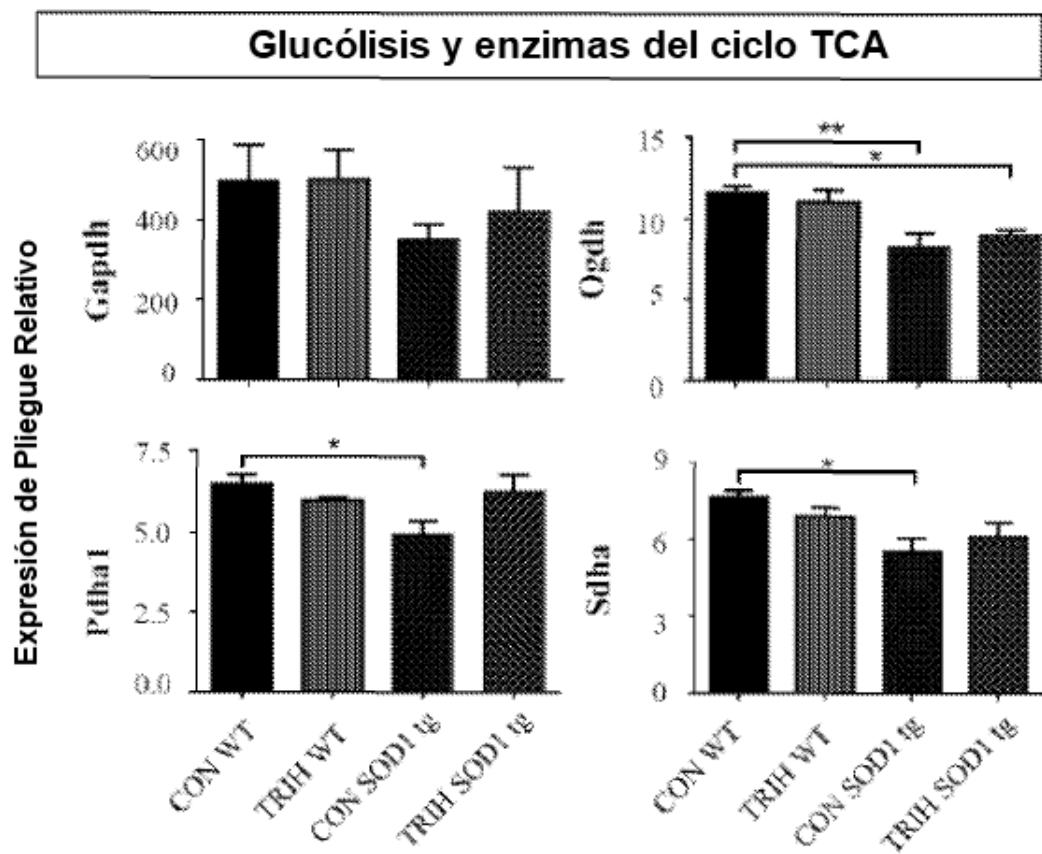
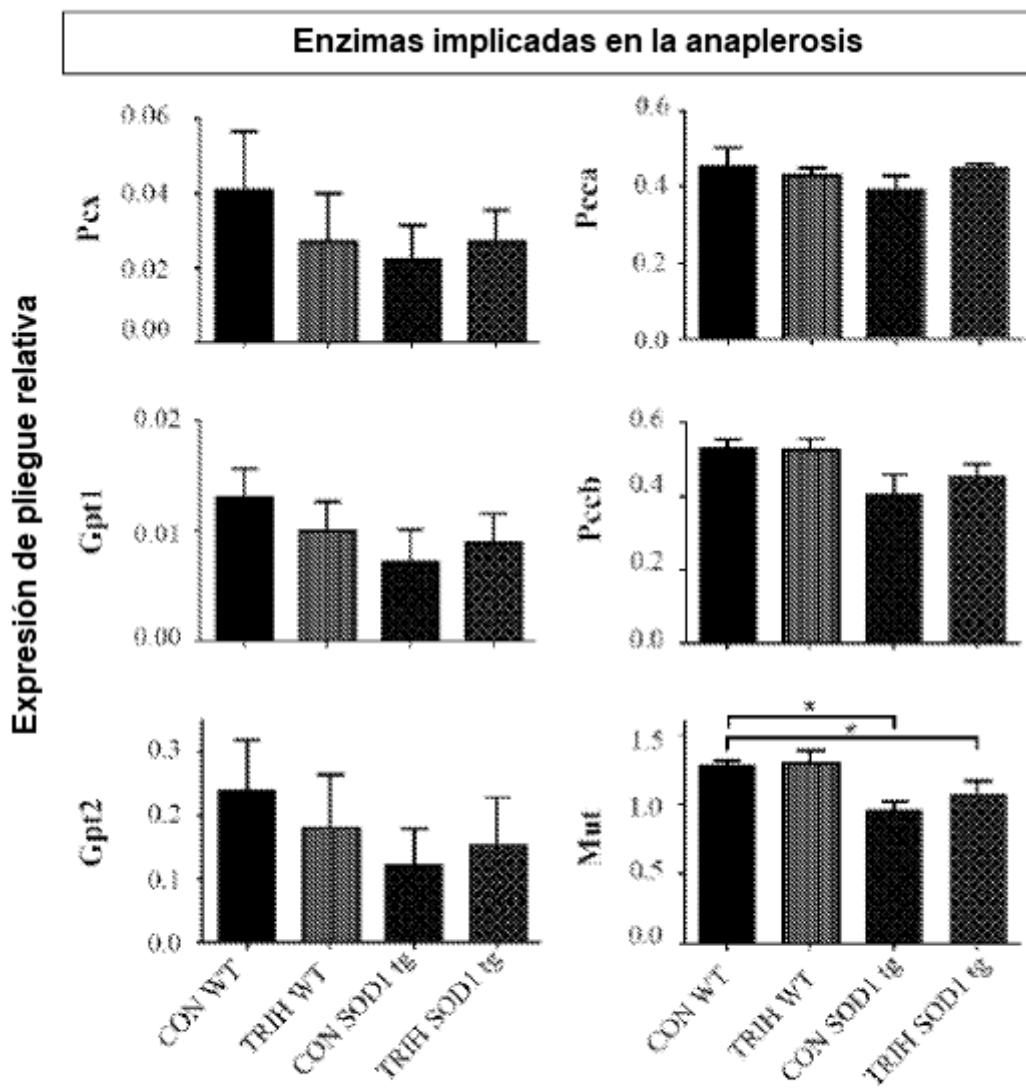


Figura 4

**Figura 5**

**Figura 6**

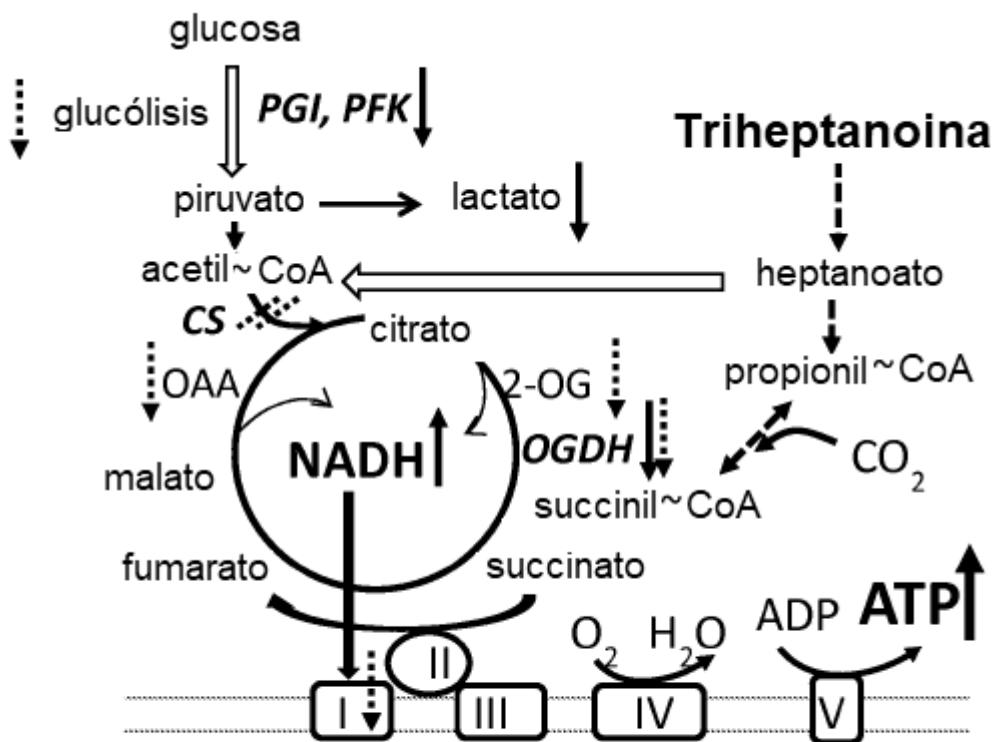


Figura 7