

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 107**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2021 PCT/EP2021/064694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2021 WO21245092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2021 E 21729553 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 4158356**

54 Título: **Métodos *in vitro* para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

01.06.2020 EP 20382463

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

21.10.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO-EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (33.3%)
Barrio de Sarriena s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES;
ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI (33.3%) y
FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ DE MUNAIN ARREGUI, ADOLFO;
RUIZ-SANZ, JOSÉ IGNACIO;
RUIZ LARREA, BEGOÑA;
FERNÁNDEZ GARCÍA DE EULATE, GORKA;
GEREÑU LOPETEGUI, GORKA;
GIL BEA, FRANCISCO;
POVEDANO PANADÉS, MÓNICA y
DOMÍNGUEZ RUBIO, RAÚL**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 107 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

Métodos *in vitro* para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* y a kits para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

10 **Estado de la técnica**

ALS es una enfermedad degenerativa de las motoneuronas de rápida progresión para la que el diagnóstico sigue basándose en hallazgos clínicos y electrofisiológicos y la exclusión de otras entidades que posiblemente se confunden fácilmente con la misma. Aunque se han investigado varios biomarcadores bioquímicos, oftalmológicos, neurofisiológicos y de obtención de imágenes, ninguno de ellos se ha introducido ampliamente en la práctica clínica. Por tanto, existe una necesidad urgente para la identificación de biomarcadores sencillos, accesibles y fiables para el diagnóstico y la estratificación de pacientes con ALS tanto en la práctica médica de rutina como en ensayos clínicos.

Además, la tasa de éxito en ensayos clínicos en pacientes con ALS ha sido bastante mala y algunos agentes prometedores en ensayos preclínicos no han podido validarse en seres humanos. En línea con esto, recientes ensayos clínicos para rasagilina o nutrición con alto contenido calórico no han logrado encontrar beneficios significativos sobre la supervivencia de ALS, pero un análisis de comparaciones múltiples a posteriori demostró efectos positivos en pacientes con ALS con rápida progresión. Por tanto, pueden emplearse biomarcadores de pronóstico para reducir la heterogeneidad de sujetos de estudio o dirigir productos terapéuticos a subpoblaciones específicas; aumentando la potencia estadística y las probabilidades de hallar futuras terapias. Una herramienta predictiva, el modelo de supervivencia de ENCALS, basándose en varias variables clínicas y paraclínicas, ha demostrado tener un rendimiento razonable. Sin embargo, existe una necesidad no cubierta de una variable biológica individual robusta que pueda ayudar a establecer el pronóstico y la supervivencia de un paciente en la primera consulta. En línea con esto, aunque se ha mostrado que las cadenas ligeras de neurofilamentos están significativamente elevadas en pacientes con ALS en comparación con controles, no se ha establecido ninguna correlación robusta con el pronóstico y la progresión de la enfermedad.

La presente invención se centra en resolver este problema y en el presente documento se proporciona un método *in vitro* para el pronóstico de ALS basándose en la determinación de un biomarcador específico.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

Tal como se explicó anteriormente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* y a kits para el pronóstico de ALS. Particularmente, la presente invención se centra en construir modelos de predicción de múltiples variables del pronóstico de ALS usando variables de ácido graso (FA).

Se desarrolló un modelo de predicción de la supervivencia como desenlace principal mediante el método de CoxBoost modelando a partir de datos de nivel inicial que consistían en 55 variables de FA en suero y 6 variables clínicas anteriormente asociadas con la supervivencia (edad, sexo, retraso en el diagnóstico, tipo de aparición, porcentaje de capacidad vital forzada teórica o % de CVF, índice de masa corporal) en una cohorte de ALS longitudinal de Barcelona (n=37). Después se validó el modelo en un conjunto de datos de una cohorte de ALS longitudinal de tres hospitales diferentes en España (n=38). Los desenlaces secundarios fueron la indicación de gastrostomía endoscópica percutánea (PEG) y/o ventilación no invasiva (NIV). Se evaluó el rendimiento de pronóstico de modelos mediante ponderación de probabilidad inversa de censura (IPC) con datos estadístico de C de Uno, área bajo la curva de ROC y valor de p de rangos logarítmicos, y se evaluó la calibración de modelos comparando la supervivencia observada y prevista.

Se seleccionaron dos variables clínicas (edad y % de CVF) así como la actividad de ELOVL6 total como modelo para la supervivencia de ALS, que presentó un rendimiento de pronóstico adecuado (C de Uno de 0,69, IC del 95 % de 0,50-0,82) y buena calibración. Se encontró que ELOVL6 era un valor de pronóstico independiente y sistemático a lo largo de las cohortes para la supervivencia (0,62, 0,51-0,77; 0,64, 0,63-0,64) así como desenlaces secundarios (PEG y NIV). Finalmente, las alteraciones de la regulación génica y actividad de ELOVL6 están generalizadas a lo largo de diferentes modelos celulares de ALS.

En conclusión, la presente invención revela que ELOVL6 es un factor pronóstico independiente de la de supervivencia en ALS y es robusto en diferentes desenlaces de estadificación de ALS, mostrando una buena capacidad de generalización a lo largo de dos cohortes independientes, surgiendo como biomarcador de pronóstico biológico para el desarrollo de ensayos clínicos de fármacos que modifican la enfermedad.

Por tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de ALS que comprende: a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6, en una muestra biológica obtenida a partir del sujeto, y b) en el que si se identifica una desviación o variación del nivel de expresión o actividad, en comparación con el nivel de expresión o actividad de referencia medido en pacientes de control, esto es indicativo de que el sujeto presenta un mal pronóstico.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de ALS que comprende: a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6, en una muestra biológica obtenida a partir del sujeto, y b) en el que si se identifica una sobreexpresión o actividad aumentada, en comparación con el nivel de expresión o actividad de referencia medido en pacientes de control, esto es indicativo de que el sujeto presenta un mal pronóstico.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de ALS que comprende: a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 en una muestra biológica obtenida a partir del paciente, b) procesar los valores con el fin de obtener una puntuación de riesgo y c) en el que si el valor de puntuación de riesgo medido en el paciente es estadísticamente superior en comparación con el nivel de expresión o actividad de referencia medido en pacientes de control, esto es indicativo de que el sujeto presenta un mal pronóstico.

En una realización preferida, la muestra biológica se selecciona de: suero, plasma o sangre completa.

La segunda realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de ELOVL6 para el pronóstico de ALS.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso *in vitro* de ELOVL6 para el pronóstico de ALS en una muestra biológica obtenida a partir del paciente seleccionada de: suero, plasma o sangre completa.

La tercera realización de la presente invención se refiere a un kit de partes para implementar el método *in vitro* de la invención para el pronóstico de ALS que comprende:

- a. reactivos o herramientas para obtener una muestra biológica a partir del paciente, y
- b. reactivos o herramientas para determinar el nivel de expresión o actividad de ELOVL6.

En una realización preferida el kit comprende:

- a. reactivos o herramientas para obtener una muestra biológica a partir del paciente seleccionada de: suero, plasma o sangre completa, y
- b. reactivos o herramientas para determinar el nivel de expresión o actividad de ELOVL6.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del kit para el pronóstico de ALS.

La cuarta realización de la presente invención se refiere a un método para tratar o aliviar síntomas de pacientes que padecen ALS que comprende administrar una cantidad eficaz de un tratamiento una vez que se determina la supervivencia del paciente usando los métodos o kits anteriormente descritos de la invención. Una vez que se evalúa la supervivencia del paciente según la metodología descrita en la presente invención, puede usarse cualquier tratamiento conocido en la técnica anterior, por ejemplo: riluzol y edaravona.

La quinta realización de la presente invención se refiere a un método para el desarrollo de ensayos clínicos de fármacos que modifican la enfermedad una vez que se determina la supervivencia del paciente usando los métodos o kits anteriormente descritos de la invención.

La sexta realización de la presente invención se refiere a inhibidores de ELOVL6 para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica. Los inventores de la presente invención demostraron que la inhibición de ELOVL6 está asociada con el efecto terapéutico, independientemente de si el inhibidor inhibe la expresión del gen de ELOVL6 (tal como un ARNhp) o lleva a cabo una inhibición farmacológica (tal como moléculas pequeñas).

Con respecto al inhibidor de la expresión del gen de ELOVL6, la presente invención muestra (véase el ejemplo 2.4, el ejemplo 2.5, la figura 8 y la figura 9) una secuencia de ARNhp que selecciona como diana ARNm del gen ortólogo de la mosca de ELOVL6 en modelos de *Drosophila* de silenciamiento de TDP-43. Por tanto, otros trastornos provocados por alteraciones de proteínas de TDP-43 pueden tratarse siguiendo este enfoque terapéutico tales como: atrofia muscular espinal, otras enfermedades de las motoneuronas puras o complicadas, demencias frontotemporales, enfermedad de Alzheimer, demencia postraumática, ataxias neurodegenerativas, discapacidad intelectual debida a síndrome del cromosoma X frágil, autismo, miopatía por VCP, miositis por cuerpos de inclusión, miopatía por DNAJB6, miopatías inflamatorias, distrofias musculares facioescapulohumeral o distrofia miotónica.

Con respecto a la inhibición farmacológica, pueden usarse tres familias de moléculas pequeñas: 3-sulfonil-8-azabicyclo[3.2.1]octano, indelodiona y arilcarboxamida. Estas moléculas pueden elegirse de los siguientes documentos que se incluyen en el presente documento como referencia: documentos WO201/123139, WO2009/131065, WO2008/120653, [Toshiyuki Takahashi, *et al.*, 2009. Synthesis and Evaluation of a Novel Indoleione Class of Long Chain Fatty Acid Elongase 6 (ELOVL6) Inhibitors. J. Med. Chem. 2009, 52, 3142-3145], [Tsuyoshi Nagase, *et al.*, 2009. Synthesis and Biological Evaluation of a Novel 3-Sulfonyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane Class of Long Chain Fatty Acid Elongase 6 (ELOVL6) Inhibitors. J. Med. Chem. 2009, 52, 4111-4114 4111 DOI: 10.1021/jm900488k].

La séptima realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento y/o para predecir la respuesta a un tratamiento en un paciente que padece esclerosis lateral amiotrófica que comprende: (a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 en una muestra biológica aislada a partir del paciente después del tratamiento; (b) en el que si el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 determinado en la etapa (a) es estadísticamente inferior al nivel de ELOVL6 antes del tratamiento, es indicativo de que el paciente está respondiendo al tratamiento.

La octava realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para identificar compuestos candidatos útiles en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica que comprende: (a) medir los niveles de expresión o actividad de ELOVL6 en una muestra biológica aislada a partir del paciente después de la administración del compuesto candidato; (b) en el que si el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 determinado en la etapa (a) es estadísticamente inferior al nivel de ELOVL6 determinado antes de la administración del compuesto candidato, es indicativo de que el compuesto candidato es eficaz en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica.

La novena realización de la presente invención se refiere a un método para la determinación de un parámetro que implica la actividad total de ELOVL6, con el objetivo de implementar cualquiera de los métodos descritos en la presente invención. Particularmente, puede usarse la siguiente fórmula: $C_{14:0}/C_{12:0} + C_{16:0}/C_{14:0} + C_{18:0}/C_{16:0} + C_{18:1n-7}/C_{16:1n-7}$, en la que la actividad de ELOVL6 se calcula usando los niveles de seis ácidos grasos: (C12:0, C14:0, C18:0, C16:0, C18:1n-7 y C16:1n-7), sometiéndose el nivel de cada ácido graso a transformación logarítmica y normalizándose el parámetro resultante. Siguiendo este método, los valores de ELOVL6 total se encuentran en el intervalo entre -2 y 2.

Con el propósito de la presente invención, se definen los siguientes términos:

- “Método de pronóstico” se refiere a métodos usados para ayudar a predecir, al menos en parte, el transcurso de una enfermedad. Por ejemplo, este método puede llevarse a cabo cuando se desea obtener una indicación de la probabilidad futura de que el sujeto se vea afectado por ALS y/o la edad a la que es probable que el sujeto desarrolle ALS. Además, un método de pronóstico puede llevarse a cabo con un sujeto al que se le ha diagnosticado previamente ALS o se cree o se sospecha que tiene ALS, cuando se desea obtener mayor información sobre cómo progresará la enfermedad para ese sujeto particular (por ejemplo, la probabilidad de que un sujeto particular responda favorablemente a un fármaco particular u otro tratamiento, y/o cuando se desea clasificar o separar pacientes con ALS en subpoblaciones diferenciadas y diferentes con el propósito de administrar un tipo particular de tratamiento y/o llevar a cabo un ensayo clínico con los mismos). También puede usarse un método de pronóstico para determinar si y/o lo bien que responderá un sujeto a un fármaco particular y/u otro tratamiento.
- El término “que comprende” incluye, pero no se limita a, lo que siga al término “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos indicados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.
- Por “que consiste en” quiere decirse que incluye, y se limita a, lo que siga a la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos indicados se requieren o son obligatorios y que no puede estar presente ningún otro elemento.
- Por “cantidad eficaz de un tratamiento” quiere decirse una cantidad que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, provoca una respuesta terapéutica positiva en el paciente, por ejemplo un alivio de los síntomas. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de (lista no exhaustiva): la especie, edad, estado general del sujeto, la gravedad del estado que está tratándose o el modo de administración. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el presente documento.
- La expresión “el nivel de referencia medido en pacientes de control” se refiere a un “valor de referencia” del nivel de expresión o actividad de los biomarcadores. Si se determina una desviación con respecto a dicha “referencia”, esto es una indicación de mal pronóstico.

- Un “valor de referencia” puede ser un valor umbral o un valor de corte. Normalmente, un “valor umbral” o “valor de corte” puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse de manera arbitraria basándose en las condiciones experimental y/o clínicas existentes, tal como reconocerá un experto habitual en la técnica. Tiene que determinarse el valor umbral con el fin de obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio de beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar los niveles (o puntuaciones) de biomarcador obtenidos según el método de la invención con un valor umbral definido. Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por tanto, el valor umbral) pueden determinarse usando una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles de los biomarcadores en un grupo de referencia, puede usarse un análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de biomarcadores en muestras biológicas que van a someterse a prueba, y, por tanto, obtener un patrón de clasificación que tiene significación para la clasificación de muestras. Se usa principalmente para pruebas de diagnóstico bioquímico clínico. La curva de ROC es un indicador exhaustivo que refleja las variables continuas de tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imágenes. Se establece una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores de límite entre resultados normales y anómalos de prueba de diagnóstico) como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Después, se usa la sensibilidad como coordenada vertical y se usa la especificidad como coordenada horizontal para trazar una curva. Cuanto mayor es el área bajo la curva (AUC), mayor es la precisión de diagnóstico. En la curva de ROC, el punto más próximo a la parte superior izquierda más alejada del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores tanto de alta sensibilidad como de alta especificidad. El valor de AUC de la curva de ROC es de entre 1,0 y 0,5. Cuando $AUC > 0,5$, el resultado de diagnóstico se vuelve cada vez mejor a medida que el AUC se aproxima a 1,0. Cuando AUC es de entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando AUC es de entre 0,7 y 0,9, la precisión es buena. Cuando AUC es superior a 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Pueden usarse software o sistemas existentes en la técnica para trazar la curva de ROC, tales como: el software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1 o SPSS 9.0.

30 Descripción de las figuras

Figura 1. Rutas de elongación de FA que ilustran los FA principales encontrados en suero humano y las actividades enzimáticas estimadas como razones de producto con respecto a precursor. En color oscuro, variables que se incluyeron en el estudio. En gris, variables no detectadas o por debajo del intervalo de detección. En rojo, variables seleccionadas mediante el método de CoxBoost. La variable ELOVL6 seleccionada mediante el modelo corresponde a la actividad de ELOVL6 total, tal como se muestra en rojo. DNL, síntesis de lípidos *de novo*; $\Delta 5D$, desaturación de delta-5 mediante ácido graso desaturasa 1 (FADS1); $\Delta 6D$, desaturación de delta-6 mediante FADS2; $\Delta 9D$, desaturación de delta-9 mediante esteroil-Coa desaturasa 1 (SCD1); ELOVL1-7, elongación de ácidos grasos de cadena muy larga (1-7); MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; SFA, ácidos grasos saturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados.

Figura 2. Puesta a punto y ajuste del modelo de CoxBoost. A, número de iteraciones de refuerzo en las que se optimiza una probabilidad logarítmica parcial media sometida a validación cruzada (línea discontinua). A pesar de que la probabilidad logarítmica parcial muestra valores superiores en etapas de refuerzo inferiores, se eligió el parámetro óptimo en la etapa de refuerzo 100 con el fin de evitar un sobreajuste y porque la probabilidad logarítmica parcial disminuye considerablemente después de esa etapa. B, selección de variables y coeficientes estimados a la probabilidad logarítmica parcial optimizada.

Figura 3. ELOVL6 como factor pronóstico independiente de la supervivencia de ALS. El conjunto de datos de entrenamiento se muestra en azul oscuro, el conjunto de datos de validación en naranja. A, Análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariable para variables seleccionadas y otras variables que comprenden el modelo de predicción de ENCALS anteriormente desarrollado. B, diagrama de cajas de datos estadísticos de la C de Uno para la supervivencia de ALS que compara las variables clínicas que comprende el modelo de predicción de ENCALS y las variables seleccionadas por el modelo de CoxBoost, con o sin el parámetro biológico ELOVL6. C, representación de AUC dependiente del tiempo (incidencia/dinámica, I/D) para la supervivencia de ALS de las tres variables seleccionadas por el modelo de CoxBoost (panel izquierdo) y de la variable biológica ELOVL6 sola (panel derecho) en las cohortes de entrenamiento (azul oscuro) y de validación (naranja). D, los gráficos de Kaplan-Meier y valores de p de rangos logarítmicos muestran diferencias en la supervivencia observada entre los grupos de bajo riesgo o $<$ mediana (azul oscuro) y de alto riesgo o \geq mediana (naranja) en las cohortes tanto de entrenamiento como de validación. Se evaluó la calibración (concordancia de desenlace predicho con observado) de los modelos superponiendo la supervivencia observada y prevista predicha por los modelos (líneas discontinuas).

Figura 4. Valores de AUC dependiente del tiempo (incidencia/dinámica, I/D) para la supervivencia de las variables clínicas que comprende el modelo de predicción de ENCALS anteriormente desarrollado (panel izquierdo) y de las dos variables clínicas seleccionadas por el modelo de CoxBoost (panel derecho). Se calcularon las puntuaciones de predicción mediante validación cruzada de 5 veces usando el método de CoxBoost. Ambos modelos predicen la

supervivencia de ALS dentro de un intervalo de hasta un año desde la toma de muestras, pero no logran predecir tiempos de supervivencia más prolongados.

5 Figura 5. Se estratificaron los pacientes en dos grupos de riesgo según las puntuaciones de predicción calculadas mediante CoxBoost con las variables clínicas que comprende el modelo de predicción de ENCALS anteriormente desarrollado (panel superior) y con las variables seleccionadas por el modelo de CoxBoost, con (panel central) o sin la variable biológica ELVOL6 (panel inferior). Los gráficos de Kaplan-Meier y valores de p de rangos logarítmicos muestran diferencias en la supervivencia observada entre los grupos de bajo riesgo (azul oscuro) y alto riesgo (naranja) grupos en la cohorte de entrenamiento. Se evaluó la calibración (concordancia de desenlace predicho con observado) de los modelos superponiendo la supervivencia observada y prevista predicha por los modelos (líneas discontinuas). El modelo de CoxBoost completo (% de CVF, edad y ELOVL6) muestra la calibración más adecuada.

15 Figura 6. ELOVL6 predice otras medidas indirectas de la estadificación del desarrollo de ALS. A, diagrama de cajas de datos estadísticos de la C de Uno para la predicción de incidencias de ventilación mecánica no invasiva (NIV) o gastrostomía percutánea (PEG), o ambas, mediante ELVOL6 usando el enfoque de CoxBoost. B, los gráficos de Kaplan-Meier y valores de p de rangos logarítmicos muestran diferencias en las incidencias de NIV o PEG observadas, o ambas, entre los grupos respectivos de bajo riesgo (azul oscuro) y alto riesgo (naranja).

20 Figura 7. Alteraciones sistemáticas de ELOVL6 en cuanto a la actividad y regulación génica en pacientes y modelos celulares de ALS. A, diagrama de Venn que muestra cambios superpuestos en ácidos grasos entre suero de ALS y mioblastos humanos tras el silenciamiento de TDP-43 o FUS. La actividad de ELOVL6, tal como se estima mediante actividad de ELOVL6 total, es el único parámetro de ácidos grasos que está estrictamente regulado de manera conjunta en ALS y en modelos de células musculares que presentan disfunción de genes de ALS. A pesar de que los cambios de C18:1n-9 también se superponen, se encuentra que sus niveles están aumentados en suero de ALS mientras que están reducidos en modelos celulares. B, diagrama de Venn que muestra acontecimientos de corte y empalme conjuntamente regulados usando datos de micromatriz de ARN de Affimetrix después del silenciamiento de TDP-43 y FUS en mioblastos humanos. Se encontraron 104 acontecimientos de corte y empalme alternativo regulados por TDP43 y 240 regulados por FUS con cambios significativos (índice de corte y empalme de exones > 2, valor de p de exones < 0,01). Entre ellos, sólo 7 eran acontecimientos de corte y empalme comunes, siendo dos de los mismos genes directamente implicados en rutas lipogénicas: ELOVL6 y INSIG1.

35 Figura 8. La inhibición de la expresión de ELVOL6 mediante ARNip prolonga la vida en moscas *Drosophila* con deficiencia de condicionamiento muscular de TDP-43. Curvas de Kaplan-Meyer de la raza de *Drosophila* de control (UAS-Dicer2-+-Mef2-GAL4, n=45), la raza de *Drosophila* con silenciamiento de condicionamiento muscular de gen ortólogo de TDP-43, *Tbph* (UAS-Dicer2-iTbph(attP40)-Mef2-GAL4, n=43), raza de *Drosophila* con silenciamiento de condicionamiento muscular de gen ortólogo de ELOVL6, *balldspot* (UAS-Dicer2-iElovl6-Mef2-GAL4, n=38), y raza de *Drosophila* con silenciamiento de condicionamiento muscular tanto de *Tbph* como de *balldspot* (UAS-Dicer2-iTbph(attP40)-iElovl6-Mef2-GAL4, n=43). Las moscas UAS-Dicer2-iTbph(attP40)-Mef2-GAL4 tienen tiempos de supervivencia reducidos en comparación con las moscas UAS-Dicer2-+-Mef2-GAL4 de control o las moscas UAS-Dicer2-iTbph(attP40)-iElovl6-Mef2-GAL4; prueba de Mantel-Cox, ***p<0,001.

40 Figura 9. La inhibición de la expresión de ELOVL6 mediante ARNip mitiga la mortalidad de faratos adultos en *Drosophila melanogaster* con deficiencia de condicionamiento muscular de TDP-43. La raza de *Drosophila* con silenciamiento de condicionamiento muscular del gen ortólogo de TDP-43, *Tbph* (UAS-Dicer2-iTbph^{pkk(08354)}-Mef2-GAL4) presenta una reducción muy prominente de la supervivencia de moscas farato adultas. La raza de *Drosophila* con silenciamiento de condicionamiento muscular tanto de *Tbph* como de *balldspot* (UAS-Dicer2-iTbph^{pkk(08354)}-iElovl6-Mef2-GAL4) presenta un aumento significativo de la supervivencia de faratos adultos en comparación con las moscas UAS-Dicer2-iTbph^{pkk(08354)}-Mef2-GAL4. La supervivencia de faratos adultos se calculó dividiendo el número de moscas adultas que eclosionaron de las pupas entre el número de pupas totales en cada tubo. El gráfico muestra el promedio de la supervivencia de faratos adultos de 6 experimentos diferentes (n= 77 pupas por grupo por experimento). Se realizó una prueba de la t; ***p<0,001. Los valores se expresan como media de porcentaje ± DE.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como una limitación del alcance de protección ofrecido por la presente invención.

Ejemplo 1. MATERIAL Y MÉTODOS.

60 Ejemplo 1.1. Diseño del estudio, participantes y recopilación de datos.

Se determinó una cohorte de entrenamiento seleccionando pacientes con sospecha de enfermedad de las motoneuronas vistos en el Hospital universitario de Bellvitge entre el 17 de mayo de 2014 y el 2 de mayo de 2017 (n= 37). Los pacientes i) cumplían los criterios de El Escorial de ALS probable o definitiva (o bien espinal o bien bulbar) y ii) se había realizado una extracción de muestras de sangre antes de un año desde el diagnóstico de la enfermedad. Se realizó EMG en todos los casos para cumplir con El Escorial y excluir posibles enfermedades que

se confunden fácilmente con ALS. Se recopilaron datos de seguimiento hasta el 12 de diciembre de 2019, y el tiempo de seguimiento total fue de 78,2 meses.

5 Se generó una cohorte de validación seleccionando pacientes que cumplieran los criterios de El Escorial para ALS probable o definitiva (o bien espinal o bien bulbar) de los Hospitales universitarios de Donostia, Araba y Marqués de Valdecilla de una manera consecutiva desde el 4 de abril de 2011 hasta el 1 de mayo de 2017 (n=38: 29+4+5 respectivamente). Se recopilaron datos hasta el 10 de enero de 2020, y el tiempo de seguimiento total fue de 106,8 meses.

10 Se estableció un intervalo de al menos 2,5 años desde la toma de muestras para evaluar posibles biomarcadores de lípidos en suero de la supervivencia y progresión de ALS. Este punto final se estableció teniendo en cuenta la mediana de la supervivencia de 2-3 años desde la aparición de síntomas tal como se notifica habitualmente [Fogh I, Lin K, Tiloca C, *et al.* Association of a locus in the CAMTA1 gene with survival in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. JAMA Neurol. American Medical Association; 2016; 73:812-820]. El desenlace primario fue la muerte, y los desenlaces secundarios fueron ventilación no invasiva (NIV) e inserción de gastrostomía endoscópica percutánea (PEG) como medidas indirectas de estadio 4 de King en el seguimiento (2,5 años). Los pacientes que todavía estaban vivos al final del seguimiento se censuraron para los análisis de supervivencia. Los pacientes que ya tenían terapia con NIV o PEG en el momento de la toma de muestras se excluyeron de la evaluación de desenlaces secundarios. Dado que una proporción de pacientes habitualmente rechazan las intervenciones de NIV y PEG, también se excluyó a aquellos pacientes que habían fallecido sin terapia de NIV o PEG con el fin de evitar factores de confusión. Los pacientes que no habían recibido terapias de NIV o PEG al final del seguimiento se censuraron para el análisis de desenlaces secundarios.

25 Ejemplo 1.2. Aprobaciones de protocolo convencionales, registros y consentimientos de pacientes.

El estudio lo aprobó el comité ético local de las instituciones participantes (Junta ética de Euskadi-Osakidetza, número de referencia PI2016075, año 2016) y se extrajeron muestras después de que los participantes dieran su consentimiento informado por escrito según la Declaración de Helsinki.

30 Ejemplo 1.3. Modelos de células musculares de ALS.

Se hicieron crecer mioblastos humanos inmortalizados en el medio de proliferación que consistía en medio de crecimiento de esqueleto de (SGM) de Promocell complementado con el 10 % de FBS, el 1 % de Glutamax y el 1 % de gentamicina (ambos de Gibco-Invitrogen). Se llevó a cabo el silenciamiento génico mediante infección con partículas lentivirales que contenían ARN de horquilla pequeño (ARNhp). Los plásmidos usados para crear estas partículas fueron: SHC001 (ADN de plásmido de control de vector vacío de ARNhp), TRCN000016038 (humano, ARNhp de TARDBP MISSION), TRCN0000288639 (humano, ARNhp de FUS MISSION), TRCN00 (ARNhp de 33 FOXO MISSION) (MISSION® pLKO.1-Pure, Sigma-Aldrich). Se produjeron partículas virales y se titularon por la unidad de vectores virales del CNIC (Madrid). Cuando se encontraron mioblastos a una confluencia del 50 %, se añadieron partículas virales a una MOI de 10. Después de 24 horas se retiró el medio y se sustituyó por medio de proliferación SGM nuevo. Para verificar el grado de silenciamiento génico, se midieron las proteínas de TDP-43 y FUS mediante inmunotransferencia de tipo Western (datos no mostrados).

45 Ejemplo 1.4. Razas de *Drosophila*

Se han generado dos razas de *Drosophila* que silencian el gen *Tbph* (ortólogo de TDP-43 humano) en diferentes locus en células musculares (UAS-Dicer2-iTbph^{attp40}-Mef2-GAL4 y UAS-Dicer2-iTbph^{pkk(08354)}-Mef2-GAL4). Como moscas de control, se usó la raza UAS-Dicer2-+-Mef2-GAL4. Se alojaron las moscas a 24 °C, el 70 % de humedad y ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h. Para ensayos de longevidad, se seleccionaron 40-100 moscas (cinco por tubo) de cada raza. Se contaron las moscas muertas cada 2 días. Se usó el método de Kaplan-Meier para representar gráficamente los resultados. Se usó una prueba de Mantel-Cox para analizar la supervivencia seguida por una corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

55 Ejemplo 1.5. Determinaciones de ácidos grasos en suero.

Extracción de ácidos grasos

Se extrajeron lípidos con cloroformo/metanol (2:1, v/v) y se evaporó la fase de cloroformo hasta sequedad a vacío (Speed-VAC, Savant Inc., Midland, MI, EE.UU.). Se disolvió el residuo de lípidos en tolueno y se aplicó en puntos sobre placas de cromatografía de capa fina (SIL G-25, Macherey-Nagel, Duren, Alemania). Se revelaron las placas en n-heptano/diisopropil éter/ácido acético (70:30:2, v/v/v). Tras pulverizar la placa con una disolución etanólica de 2',7'-diclorofluoresceína, los lípidos se volvieron visibles con luz UV. Se rasparon las bandas y se sometieron los ácidos grasos a transmetilación seguido por protocolo de Lepage y Roy (Lepage y Roy, 1986).

65 Condiciones de cromatografía

Se analizaron los ésteres metílicos de ácidos grasos con un cromatógrafo de gases HP5890 serie II equipado con un detector por ionización de llama tal como se describió anteriormente en [Ruiz-Sanz J-I, Pérez-Ruiz I, Meijide S, Ferrando M, Larreategui Z, Ruiz-Larrea M-B. Lower follicular n-3 polyunsaturated fatty acid levels are associated with a better response to ovarian stimulation. *J Assist Reprod Genet* [revista en línea]. Springer New York LLC; 2019; 36: 473-482]. Se inyectaron muestras a través del orificio de inyección fraccionada (razón de fraccionamiento, 30:1) sobre una columna capilar SP 2330 (30 m × 0,25 mm, 0,20 mm de grosor de película; Supelco Company, EE.UU.). Se usó helio como gas portador a una presión de 0,5 bar y las temperaturas de inyector y de detector eran de 250 °C. Se programó la temperatura del horno a 80 °C durante 1 min, se aumentó desde 80 hasta 140 °C a una tasa de 50 °C/min, después desde 140 hasta 190 °C a una tasa de 5 °C/min, y después se mantuvo a 190 °C durante 5 min. Finalmente, se aumentó la temperatura desde 190 hasta 210 °C a una tasa de 5 °C/min y se mantuvo a 210 °C durante 15 min. Se identificaron ácidos grasos individuales comparando los tiempos de retención relativos con patrones comerciales (Nu Chek, EE.UU.). Se usó ácido heptadecanoico como patrón interno.

Ejemplo 1.6. Micromatrices de ARN.

Se analizó el ARN obtenido a partir de cultivos celulares de mioblastos usando micromatrices de expresión de transcripción humana completas de GeneChip del tipo Clariom D (Affymetrix). Estas micromatrices analizan más de 540.000 transcritos y permiten el análisis a dos niveles: el nivel de expresión génica y el nivel de corte y empalme alternativo. Se hibridaron las micromatrices siguiendo los protocolos recomendados, usando un horno de hibridación a 45 °C a 60 rpm durante 16 h. Tras completarse la hibridación, se realizó una etapa de lavado y tinción en el dispositivo GeneChip Fluidics Station 450. Se realizó la captura de imágenes en el explorador GeneChip 7G (Affymetrix). El software de análisis usado fue Expression Console (Affymetrix), Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 y Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; Broad Institute).

Ejemplo 1.7. Análisis estadístico.

VARIABLES DE FACTOR PRONÓSTICO

Se detectaron cincuenta y cinco variables de lípidos, incluyendo FA individuales y actividades enzimáticas estimadas como razones de producto con respecto a precursor (figura 1). Además, había seis variables clínicas disponibles, incluyendo edad, sexo, tipo de aparición, retraso en el diagnóstico, % de capacidad vital forzada (CVF) e índice de masa corporal (BMI) en la toma de muestras. Se sometieron las variables continuas a transformación logarítmica y se normalizaron mientras que las variables binarias simplemente se normalizaron antes de analizarse.

Desenlaces

El desenlace primario fue la supervivencia desde la toma de muestras. En un análisis secundario, se examinó el rendimiento del modelo seleccionado evaluando la capacidad de predicción sobre dos desenlaces adicionales como medidas indirectas de estadificación de ALS: la necesidad de intervenciones de PEG o NIV, que se definieron como el tiempo en el que se proporcionaron.

Selección de variables

Para modelos construidos a partir de datos de muchas dimensiones para predecir probabilidades de supervivencia individual basándose en las covariables disponibles, las herramientas estadísticas tradicionales dejan de ser apropiadas, por tanto se han desarrollado enfoques modernos para realizar una estimación de parámetros y selección de covariables evitando simultáneamente descartar covariables antes del ajuste de modelo. Uno de estos enfoques se basa en refuerzo, que lo hace imponiendo una penalización sobre los parámetros de modelo para la estimación. La estructura de esta penalización se elige de tal manera que la mayoría de los parámetros estimados serán iguales a cero y, por tanto, el valor de las covariables correspondientes no influye en las predicciones obtenidas a partir del modelo ajustado.

Se aplicó un método de CoxBoost para ajustar modelos de riesgos proporcionales de Cox basándose en refuerzo. A diferencia del refuerzo en gradiente, CoxBoost no se basa en gradientes de funciones de pérdida, sino que se basa en refuerzo por componentes. Adapta el enfoque de refuerzo basado en desplazamiento para estimar modelos de riesgos proporcionales de Cox de Tutz y Binder [Tutz G, Binder H. Boosting ridge regression. *Comput Stat Data Anal*. North-Holland; 2007; 51:6044-6059]. En cada iteración de refuerzo se incorporan las etapas de refuerzo anteriores como desplazamiento en la estimación de probabilidad parcial penalizada, que se emplea para obtener una actualización para un único parámetro. Esto da como resultado ajustes dispersos similares a enfoques de tipo Lasso, siendo muchos coeficientes estimados cero. El refuerzo se basa en dos parámetros de puesta a punto: penalización y número de etapas de refuerzo. El primer parámetro controla la “debilidad” del estimador, y el segundo desempeña un papel importante en evitar el sobreajuste y en controlar la dispersión del modelo. Se usó el paquete de R CoxBoost, que aprovecha el método de refuerzo [CRAN - Package CoxBoost [en línea]. Consultado en: <https://cran.r-project.org/web/packages/CoxBoost/index.html>. Consultado el 9 de abril de 2020]. El número óptimo de etapas de refuerzo se seleccionó mediante validación cruzada dejando uno fuera usando la función `cv.CoxBoost` aplicando el valor de penalización que se eligió usando la función `optimCoxBoostPenalty`. Para un rendimiento de

5 modelo óptimo en el refuerzo basado en probabilidad, se sugiere que el número óptimo de etapas de refuerzo debe ser mayor de o igual a 50 [Tutz G, Binder H. Generalized additive modelling with implicit variable selection by likelihood based boosting *Projektpartner Generalized additive modelling with implicit variable selection by likelihood based boosting*. Biometrics [revista en línea]. International Biometric Society; 2004; 401:961-971]. Una vez optimizados los parámetros de puesta a punto, se obtuvo la selección de variables y sus coeficientes estimados usando la función de CoxBoost.

10 Se incluyeron sesenta y una covariables disponibles, incluyendo seis variables clínicas (tipo de aparición, sexo, retraso en el diagnóstico, % de CVF, edad y BMI en la toma de muestras) y cincuenta y cinco parámetros de FA (figura 1 y tabla 1) en el análisis de CoxBoost, con la supervivencia desde la toma de muestras como desenlace primario.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con ALS en el estudio en cada cohorte.

	Cohorte de entrenamiento	Cohorte de validación	Valor de p
Número de pacientes	37	38	--
Edad en la toma de muestras (años) ^a	61,6 ± 13,0	63,4 ± 12,1	0,55 ^d
Sexo (hombre/mujer)	20/17	26/12	0,20 ^e
Causa (esporádica/familiar)	37/0	34/4	0,04 ^e
Tipo de aparición (espinal/bulbar)	28/9	33/5	0,21 ^e
% de CVF ^a	64,3 ± 24,5	--	--
Pendiente de ALSFRS-R ^{a,b,c}	0,74 ± 0,56	--	--
FTD (sí/no)	4/33	2/36	0,38 ^e
Retraso en el diagnóstico (días) ^a	404,5 ± 233,3	274,0 ± 181,7	0,01 ^d
BMI (kg) ^a	25,8 ± 3,7	--	--
Tratamiento (estatina/antidiabético)	7/1	5/1	0,82 ^e
Seguimiento (meses)	78,2	106,8	--

15 ^aValores dados como media ± desviación estándar.

^bLa pendiente de ALSFRS-R viene dada como la reducción de la puntuación al mes y se calcula usando la siguiente fórmula: (48 menos puntuación de ALSFRS-R) / (fecha de puntuación de ALSFRS-R menos fecha de aparición).

20 ^cALSFRS-R está disponible de 20 pacientes.

^dPrueba de la t de Student.

25 ^ePrueba de la chi cuadrado.

Evaluación de rendimiento del modelo

30 Se usaron tres parámetros de precisión para evaluar el rendimiento del modelo en la cohorte tanto de entrenamiento como de validación. Además, se usaron estos parámetros para comparar el valor de pronóstico de las variables seleccionadas con las variables clínicas que comprenden la herramienta de predicción de ENCALs (principalmente el % de CVF, retraso en el diagnóstico, edad en el diagnóstico y tipo de aparición) [Westeneng H-J, Debray TPA, Visser AE, *et al.* Prognosis for patients with amyotrophic lateral sclerosis: development and validation of a personalised prediction model. *Lancet Neurol* [revista en línea]. Lancet Publishing Group; 2018; 17:423-433. Accedido en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29598923>. Accedido el 22 de abril de 2020].

35 El primero es el dato estadístico de la C de Uno, que define la probabilidad de que las predicciones para un par aleatorio de sujetos concuerden con sus desenlaces. El valor de la C de Uno tiene la misma interpretación que el índice de concordancia de Harrell pero se basa en ponderaciones de probabilidad inversa de censura (IPC) para desplazar la dependencia de la C de Harrell sobre la censura [Uno H, Cai T, Pencina MJ, D Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med* [revista en línea]. 2011; 30:1105-1117]. Por tanto, este dato estadístico tiene como objetivo superar la imprecisión del índice de concordancia no ponderado cuando se correlaciona el tiempo de censura con la puntuación de riesgo del paciente. Se entrenaron los modelos con el 75 % de las muestras seleccionadas aleatoriamente de la cohorte de entrenamiento y volvieron a tomarse muestras 50 veces o bien con la prueba retenida del 25 % restante o bien con toda la cohorte de validación para obtener una puntuación de predicción con la que se determinó la mediana y el IC del 95 % del dato estadístico de la C de Uno usando el paquete R survAUC.

40 El segundo parámetro es el área bajo la curva de ROC (AUC) dependiente del tiempo (incidente/dinámica). El promedio ponderado de AUC específicas del tiempo es otra manera de expresar el índice de concordancia. Sin embargo, en un contexto descriptivo, el AUC dependiente del tiempo proporciona un enfoque gráfico más sencillo y un resumen más global que usar el índice de concordancia, sin tener que especificar un intervalo de tiempo a lo largo del cual se acumulan los casos [Heagerty PJ, Zheng Y. Survival model predictive accuracy and ROC curves.

Biometrics. 2005; 61:92-105]. Además, dado que el estado patológico de un individuo cambia a lo largo del tiempo y también lo hace su información de pronóstico, tal como mediciones de laboratorio actualizadas en visitas a la clínica de rutina, el AUC dependiente del tiempo es particularmente relevante cuando se estudia el pronóstico en enfermedades que tienen una tasa de progresión alta pero también heterogénea, tales como ALS, en las que, por tanto, las medidas de laboratorio pueden determinarse en momentos de nivel inicial heterogéneos. Se han desarrollado nuevos conceptos y métodos estadísticos asociados para evaluar el rendimiento variable con el tiempo de cualquier posible modelo de pronóstico, permitiendo la estimación de AUC en función del tiempo, proporcionando por tanto una estimación detallada de rendimiento de modelo longitudinal para su uso en la práctica [Bansal A, Heagerty PJ. A Tutorial on Evaluating the Time-Varying Discrimination Accuracy of Survival Models Used in Dynamic Decision Making. Med. Decis. Mak. SAGE Publications Inc.; 2018. págs. 904-916]. En la cohorte de entrenamiento, se obtuvo la puntuación de predicción mediante validación cruzada de 5 veces usando el método de CoxBoost. En la cohorte de validación, se usó la puntuación de predicción que se calculó mediante CoxBoost en una nueva toma de muestras a modo de ejemplo que presentó un valor de mediana del dato estadístico de la C de Uno. Las AUC incidentes/dinámicas se calcularon usando los paquetes de R survivalROC y risksetROC, implementados con el código desarrollado y descrito por Bansal y Heagerty.

El tercer parámetro es el valor de p de rangos logarítmicos. Se estratificaron los pacientes en dos subgrupos de la puntuación de predicción calculada mediante CoxBoost: bajo riesgo (por debajo de la mediana) y alto riesgo (por encima de la mediana). Después se calculó un valor de p de rangos logarítmicos para comparar distribuciones de supervivencia estimadas mediante curvas de Kaplan-Meier entre estos grupos usando el paquete de R survival. En la cohorte de entrenamiento, se obtuvo la puntuación de predicción mediante validación cruzada de 5 veces usando el método de CoxBoost. En la cohorte de validación, se usó la puntuación de predicción que se calculó mediante CoxBoost en una nueva toma de muestras a modo de ejemplo que presentó un valor de mediana del dato estadístico de la C de Uno. Merece la pena indicar que la estratificación de pacientes ignora las diferencias dentro de cada subgrupo, por tanto puede conducir a menos precisión en comparación con el dato estadístico de la C de Uno o AUC.

Evaluación de calibración de modelo

La calibración determina la concordancia entre el desenlace predicho y observado, lo cual es importante para que el modelo proporcione información probabilística. La distribución de supervivencia observada entre subgrupos de riesgo se analizó mediante curvas de Kaplan-Meier como anteriormente. Las probabilidades de supervivencia predichas en cada momento dado se calcularon mediante CoxBoost. Tanto las distribuciones de supervivencia observadas como la mediana de las probabilidades de supervivencia predichas para cada subgrupo de pacientes se representaron gráficamente juntas para evaluar su grado de superposición.

Ejemplo 2. RESULTADOS.

Las características demográficas y clínicas de pacientes con ALS en cada cohorte se describen en la tabla 1. De los 37 pacientes en la cohorte de entrenamiento, se censuraron 5 al final del periodo de seguimiento el 12 de diciembre de 2019 con una mediana del tiempo de seguimiento de 48,7 meses (intervalo de 32,4 a 53,6). Los 33 pacientes restantes fallecieron durante el seguimiento con una mediana del tiempo de supervivencia de 17,0 meses desde la toma de muestras (intervalo de 1,0 a 46,4). De los 38 pacientes en la cohorte de validación, se censuraron 8 al final del periodo de seguimiento el 10 de enero de 2020 con una mediana del tiempo de seguimiento de 45,3 meses (intervalo de 35,5 a 87,8). Los 30 restantes fallecieron durante el seguimiento con una mediana del tiempo de supervivencia de 13,2 meses desde la toma de muestras (intervalo de 1,2 a 37,9).

Ejemplo 2.1. Generación de un modelo de predicción de supervivencia de ALS.

Se incluyeron 55 variables de FA detectadas y 6 variables clínicas anteriormente asociadas con la supervivencia (edad, sexo, tipo de aparición, BMI, % de CVF y retraso en el diagnóstico) en el modelo de riesgos proporcionales de CoxBoost (tabla 2).

Tabla 2. Variables clínicas (6) y de FA (55) incluidas en el método de riesgos proporcionales de CoxBoost.

55

Variables clínicas			
Edad	Sexo	Tipo de aparición	
BMI	% de CVF	Retraso en el diagnóstico	
Ácidos grasos individuales			
C12:0	C14:0	C14:1n-5	C15:0
C16:0	C16:1n-7	C17:0	C18:0
C18:1n-9(t)	C18:1n-9	C18:1n-7	C18:2n-6(t)
C18:2n-6	C18:3n-6	C20:0	C18:3n-3
C20:1n-9	C20:2n-6	C20:3n-6	C20:4n-6
C22:1n-9	CC23:0	C20:5n-3	C24:0

C22:4n-6 C24:1n-9 C22:5n-6 C25:0
 C22:5n-3 C22:6n-3

<u>Razones de producto con respecto a precursor</u>	
ELOVL6 (C12:0):	$C14:0/C12:0$
ELOVL6 (C14:0):	$C16:0/C14:0$
ELOVL6 (C16:0):	$C18:0/C16:0$
ELOVL6 (C16:1n-7):	$C18:1n-7/C16:1n-7$
ELOVL6 (total):	$C14:0/C12:0 + C16:0/C14:0 + C18:0/C16:0 + C18:1n-7/C16:1n-7$
$\Delta 9D$ (C14:0):	$C14:1n-5/C14:0$
$\Delta 9D$ (C16:0):	$C16:1n-7/C16:0$
$\Delta 9D$ (C18:0):	$C18:1n-9/C18:0$
$\Delta 9D$ (total):	$C14:1n-5/C14:0 + C16:1n-7/C16:0 + C18:1n-9/C18:0$
ELOVL3 (C18:1n-9):	$C20:1n-9/C18:1n-9$
ELOVL3 (C20:1n-9):	$C22:1n-9/C20:1n-9$
ELOVL3 (C22:1n-9):	$C24:1n-9/C22:1n-9$
ELOVL3 (total):	$C20:1n-9/C18:1n-9 + C22:1n-9/C20:1n-9 + C24:1n-9/C22:1n-9$
ELOVL1 (C18:0):	$C20:0/C18:0$
ELOVL1 (C20:0):	$C22:0/C20:0$
ELOVL1 (C22:0):	$C24:0/C22:0$
ELOVL1 (total):	$C20:0/C18:0 + C22:0/C20:0 + C24:0/C22:0$
$\Delta 6D$ (C18:2n6):	$C18:3n-6/C18:2n-6$
$\Delta 5D$ (C20:3n6):	$C20:4n-6/C20:3n-6$
ELOVL5 (C18:2n6):	$C20:2n-6/C18:2n-6$
ELOVL5 (C18:3n6):	$C20:3n-6/C18:3n-6$
ELOVL5 (C20:5n3):	$C22:5n-3/C20:5n-3$
ELOVL5 (C20:4n6):	$C22:4n-6/C20:4n-6$
ELOVL5 (total):	$C20:2n-6/C18:2n-6 + C20:3n-6/C18:3n-6 + C22:5n-3/C20:5n-3 + C22:4n-6/C20:4n-6$
$\Delta 8D$ (C20:2n6):	$C20:3n-6/C20:2n-6$

Tras ajustar el modelo de CoxBoost en la cohorte de entrenamiento (n=37) mediante la probabilidad logarítmica parcial óptima lograda después de 100 etapas de refuerzo (figura 2), sólo tres variables presentaron coeficientes distintos de cero. Se trataba de la edad y el % de CVF en la toma de muestras, y la actividad de ELVOL6 global (figura 2) que se calcula a partir de las razones de productos y precursores correspondientes: C14:0/C12:0, C16:0/C14:0, C18:0/C16:0 y C18:1n-7/C16:1n-7. Cada una de estas variables así como otras variables incluidas en el modelo de predicción de ENCALS anteriormente desarrollado (retraso en el diagnóstico y tipo de aparición) presentaron razones de riesgos (HR) significativas tal como puede observarse en el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariable (figura 3A). Los coeficientes estimados mediante CoxBoost para ELOVL6 y edad en la toma de muestras fueron positivos y sus HR por encima de 1, lo que significa que valores superiores de estas variables están asociados con una supervivencia más corta. El coeficiente estimado para el % de CVF era negativo y su HR por debajo de 1, lo que significa que valores inferiores de esta variable están asociados con una supervivencia más corta.

Se evaluó el rendimiento de pronóstico del modelo mediante ponderación de IPC con el dato estadístico de la C de Uno. Se dividió aleatoriamente el conjunto de datos de entrenamiento en un subconjunto de entrenamiento del 75 % y volvieron a tomarse muestras 50 veces para calcular las puntuaciones de predicción usando el método de CoxBoost. Se evaluó el rendimiento de los modelos con el subconjunto de prueba retenido del 25 % restante del conjunto de datos de entrenamiento y con una cohorte de validación externa de pacientes con ALS de 3 hospitales diferentes (n=38). Las variables seleccionadas tenían un valor de la C de Uno de 0,69 (0,50-0,82), lo cual es comparable con el dato estadístico presentado por las variables clínicas del modelo de predicción de ENCALS de riesgo anteriormente desarrollado (0,71, 0,56-0,82) (figura 3B). La diferencia es que el presente modelo de predicción incluye una variable biológica; por tanto se evaluó el rendimiento de predicción de la variable ELOVL6 por sí sola. Resultó que el valor de la C de Uno de la variable ELOVL6 disminuyó ligeramente en comparación con el valor del modelo entero (0,62, 0,51-0,77), pero se reprodujo correctamente en la cohorte de validación (0,64, 0,63-

0,64) (figura 3B). También se calcularon datos estadísticos de la C de Harrell y mostraron valores comparables al valor de la C de Uno (datos no mostrados).

Calculando los valores de AUC de incidencia/dinámica, se observó que o bien el modelo seleccionado o bien la variable ELOVL6 por sí sola son capaces de predecir la supervivencia de ALS dentro de un intervalo de hasta un año desde la toma de muestras, pero no logran predecir tiempos de supervivencia más prolongados (figura 3C). Este resultado es similar al AUC dependiente del tiempo para la supervivencia de ALS proporcionada por las variables clínicas del modelo de predicción de ENCALS de riesgo anteriormente desarrollado (figura 4).

Se estratificaron los pacientes en dos subgrupos de riesgo según las puntuaciones de predicción calculadas mediante CoxBoost con la variable ELOVL6 con el fin de comparar la distribución de supervivencia entre los grupos de bajo riesgo (<mediana) y de alto riesgo (\geq mediana). Los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier y valores de p de rangos logarítmicos muestran una diferencia significativa entre los grupos de bajo riesgo y de alto riesgo en las cohortes tanto de entrenamiento ($p=0,0095$) como de validación ($p=0,0031$) (figura 3D). El modelo de ELOVL6 estaba adecuadamente calibrado (concordancia de desenlace predicho con observado) en la cohorte de entrenamiento; sin embargo, la probabilidad de supervivencia del grupo de alto riesgo estaba subestimada en la cohorte de validación (figura 3D). El modelo de CoxBoost entero, con y sin la variable ELOVL6, y las variables clínicas del modelo de predicción de riesgo de ENCALS proporcionaron diferencias entre los grupos de bajo y alto riesgo respectivos con valores de p por debajo de 0,01 (los gráficos de Kaplan-Meier y de calibración se muestran en la figura 5).

Ejemplo 2.2. ELOVL6 predice otras medidas indirectas de estadificación de ALS.

Se llevó a cabo la misma metodología para evaluar la capacidad de ELOVL6 para predecir el tiempo desde la toma de muestras hasta la necesidad de PEG o NIV, como medidas indirectas de estadificación de ALS. Los casos que tenían PEG y/o NIV en la toma de muestras, o casos que fallecieron sin PEG y/o NIV, se excluyeron del análisis. Los casos restantes de las cohortes tanto de entrenamiento como de validación se combinaron en un único conjunto de datos con este propósito ($n=40$ para el desenlace de NIV; $n=39$ para el desenlace de PEG; $n=50$ para cualquiera de los desenlaces). Como anteriormente, se dividieron aleatoriamente los conjuntos de datos en subconjuntos de entrenamiento del 75 % y volvieron a tomarse muestras 50 veces para calcular las puntuaciones de predicción usando el método de CoxBoost, con el que se sometieron a prueba los subconjuntos retenidos del 25 % restante. ELOVL6 presentó un valor de la C de Uno de 0,68 (0,49-0,90) para predecir NIV, 0,66 (0,49-0,88) para PEG, y 0,60 (0,49-0,84) para cualquiera de los dos (figura 6A). Se estratificaron de nuevo los pacientes con dos grupos de riesgo según las puntuaciones de predicción calculadas mediante CoxBoost con la variable ELOVL6 con el fin de comparar la distribución de incidencia de PEG o NIV entre los grupos de bajo riesgo (<mediana) y de alto riesgo (\geq mediana). Se asoció ELOVL6 con la probabilidad de necesitar soporte de NIV ($p=0,001$), de someterse a PEG ($p=0,00097$) o ambas ($p=0,0014$) (figura 6B).

Ejemplo 2.3. Superposición de anomalías de ELOVL6 en pacientes y modelos celulares.

El músculo esquelético es uno de los órganos metabólicamente más activos del organismo, realizando una importante contribución al metaboloma circulante, incluyendo en particular especies de lípidos. Se plantea la hipótesis de que anomalías de ácidos de FA detectadas en suero de pacientes con ALS pueden surgir de alteraciones en el metabolismo y la función muscular en ALS. Para someter a prueba esta predicción, se ha analizado el perfil de FA en una línea celular de mioblasto humana que reproduce características metabólicas y miogénicas de ALS tras el silenciamiento o bien de TDP-43 o bien de FUS (datos no mostrados). La ventaja de estudiar un modelo celular aislado de músculo esquelético es que cualquier cambio observado será secundario con respecto a la pérdida de función de TDP-43 o FUS pero independiente de los efectos de la denervación muscular. Se encontraron 13 características de FA que estaban superpuestas tras silenciar TDP-43 y FUS. Y, lo más sorprendentemente, sólo se observaron 2 características de FA que estaban sistemáticamente alteradas en los modelos celulares y en las muestras de suero de pacientes con ALS con respecto a los controles. Estas características de FA eran C18:1n-9 y la actividad de ELOVL6 total (figura 7A). Sin embargo, sólo ELOVL6 presentó cambios en el mismo sentido en los diferentes grupos.

Dado que TDP-43 y FUS son proteínas de unión a ARN con papeles importantes en la regulación del corte y empalme de ARN, se estudiaron acontecimientos de corte y empalme alternativo tras el silenciamiento de TDP-43 y FUS en mioblastos humanos usando micromatrices de expresión Affymetrix Clariom™ D. Se detectaron 240 y 104 acontecimientos de corte y empalme alternativos significativos (índice de corte y empalme de exones > 2, valor de $p < 0,01$) en células con silenciamiento de FUS y TDP-43. Entre los 7 acontecimientos de corte y empalme alternativo regulados conjuntamente en ambas condiciones, se encontró ELOVL6 y otro gen implicado en rutas lipogénicas, INSIG1 (figura 7B).

En conjunto, estos resultados sugieren que ELOVL6 puede ser una diana patogénica común de ALS que media en la toxicidad por pérdida de función de FUS y TDP-43 en músculo esquelético. ELOVL6 puede ser un modificador de la enfermedad y eso explicaría por qué su actividad reflejada en sangre es un indicador de pronóstico de enfermedad de ALS.

Ejemplo 2.4. ARNip que selecciona como diana ARNm del gen ortólogo de la mosca de ELOVL6 *baldspot* prolonga la vida en moscas *Drosophila* con deficiencia de condicionamiento muscular de TDP-43.

5 Se generó un modelo de *Drosophila* en el que el gen *Tbph*, que es un ortólogo de TDP-43 humano, se silenció de manera condicionada en músculo (*iTbph^{attp40}*) mediante un ARNip de SEQ ID NO: 1 (CCAGTTAAGAATTGTATTTAA) que selecciona como diana ese gen. También se generó un segundo modelo de *Drosophila* en el que el gen *baldspot*, que es ortólogo de ELOVL6 humano, se silenció de manera condicionada en músculo (*iElov16*) mediante un ARNip de SEQ ID NO: 2 (CTGGACATGGGTGTTCTACTA) que selecciona como
10 diana ese gen, y un tercer modelo *Drosophila* en el que se silenciaron de manera condicionada en músculo ambos genes *baldspot* y *Tbph* (*iTbph^{attp40}-iElov16*).

Se realizaron ensayos de longevidad para caracterizar esos modelos de mosca. Las moscas con silenciamiento de *Tbph* manifestaron drásticas reducciones de los tiempos de supervivencia en comparación con el grupo de control, tal como se indica mediante curvas de Kaplan-Meier (figura 8). De manera interesante, las moscas con doble silenciamiento de *Tbph* y *baldspot* (ortólogo de ELOVL6) tenían una supervivencia superior a moscas con tan sólo silenciamiento de *Tbph* (figura 8). Es importante observar que el silenciamiento de *baldspot* no afecta a la vida en las moscas de control (figura 8), sugiriendo por tanto una falta de toxicidad cuando se inhibe la actividad de ELOVL6 *in vivo*.
15

20 Ejemplo 2.5. ARNip que selecciona como diana ARNm del gen ortólogo de la mosca de ELOVL6 *baldspot* mitiga la mortalidad de faratos adultos en *Drosophila melanogaster* con deficiencia de condicionamiento muscular de TDP-43.

Se generó un modelo de *Drosophila* en el que el gen *Tbph*, que es ortólogo de TDP-43 humano, se silenció de manera condicionada en músculo (*iTbph^{pkk(08354)}*) mediante un ARNip de SEQ ID NO: 3 (CTCCGCAGATCCAGCATTATAAGTGCACAATCTTTATAACTAACTTTCTTAGCGTAAGCCAAAATATATTTAATA
25 AACAAACAAAATACAAATCAAATTCTACTTAAGTGATACAATGATACAATTTTTACTGAGCTTTGGCGCAGAATTTAT
TTTGAAGTGTGTTTTATCAATTGTGTTATTAGCCATCCAGTGTCATCTTGTTTACAATTATCAAAATATCTATTACAT
ATTAATACAATTCTTAAGTGGTTTGTATGTGGAATACATATATGTAAATTTAAGTAAGCTACAGAGGTGTTGGTTA
30 ACCACATTAACCACATCATTGGGTGACAGGCACCGCCTTAAGAAAAGTTTGACTTCTCCGCGGCGTTTTGAGATC
CGCTGCTCT) que selecciona como diana ese gen. Las moscas de este genotipo completaron la metamorfosis de larvas a adultos dentro de la pupa (una fase conocida como farato) pero no fueron capaces de emerger de la pupa y, por consiguiente, murieron. Esta característica se denomina mortalidad de faratos adultos y permite realizar ensayos con los que evaluar la eficacia de la inhibición de ELOVL6. También se generó un modelo de *Drosophila* en el que el gen *baldspot*, que es ortólogo de ELOVL6 humano, se silenció de manera condicionada en músculo de moscas
35 *iTbph^{pkk(108254)}* mediante ARNip de SEQ ID NO: 2 (CTGGACATGGGTGTTCTACTA) que selecciona como diana este gen (*iElov16*). Midiendo este desenlace se observó que seleccionar como diana ARNm de *baldspot* (ortólogo de ELOVL6) en el modelo de *Drosophila* *iTbph^{pkk(108254)}* mitigó significativamente la mortalidad de faratos en aproximadamente el 30 % (figura 9).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica que comprende: a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6, en una muestra biológica obtenida a partir del sujeto, y b) en el que si se identifica una desviación o variación del nivel de expresión o actividad, en comparación con el nivel de expresión o actividad de referencia medido en pacientes de control, esto es indicativo de que el sujeto presenta un mal pronóstico.
- 10 2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende: a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6, en una muestra biológica obtenida a partir del sujeto, y b) en el que si se identifica una sobreexpresión o actividad aumentada, en comparación con el nivel de expresión o actividad de referencia medido en pacientes de control, esto es indicativo de que el sujeto presenta un mal pronóstico.
- 15 3. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 en una muestra biológica obtenida a partir del paciente, b) procesar los valores con el fin de obtener una puntuación de riesgo y c) en el que si el valor de puntuación de riesgo medido en el paciente es estadísticamente superior en comparación con el nivel de expresión o actividad de referencia medido en pacientes de control, esto es indicativo de que el sujeto presenta un mal pronóstico.
- 20 4. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica se selecciona de: suero, plasma o sangre completa.
5. Uso *in vitro* de ELOVL6 para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica.
- 25 6. Uso *in vitro* de ELOVL6, según la reivindicación 5, para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica en una muestra biológica obtenida a partir del paciente seleccionada de: suero, plasma o sangre completa.
7. Uso de un kit que comprende:
 - 30 a. reactivos o herramientas para obtener una muestra biológica a partir del paciente, y
 - b. reactivos o herramientas para determinar el nivel de expresión o actividad de ELOVL6, para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica.
- 35 8. Uso de un kit, según la reivindicación 7, que comprende:
 - 40 a. reactivos o herramientas para obtener una muestra biológica a partir del paciente seleccionada de: suero, plasma o sangre completa, y
 - b. reactivos o herramientas para determinar el nivel de expresión o actividad de ELOVL6, para el pronóstico de esclerosis lateral amiotrófica.
- 45 9. Inhibidor de ELOVL6 para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica.
10. Inhibidor de ELOVL6 para su uso, según la reivindicación 9, en el que el inhibidor inhibe la expresión del gen de ELOVL6 o lleva a cabo una inhibición farmacológica.
- 50 11. Inhibidor de ELOVL6 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el inhibidor es un ARNip caracterizado por la secuencia SEQ ID NO: 1, 2 ó 3.
- 55 12. Método *in vitro* para monitorizar la eficacia de un tratamiento y/o para predecir la respuesta a un tratamiento en un paciente que padece esclerosis lateral amiotrófica que comprende: (a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 en una muestra biológica aislada a partir del paciente después del tratamiento; (b) en el que si el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 determinado en la etapa (a) es estadísticamente inferior al nivel de ELOVL6 antes del tratamiento, es indicativo de que el paciente está respondiendo al tratamiento.
- 60 13. Método *in vitro* para identificar compuestos candidatos útiles en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica que comprende: (a) medir el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 en una muestra biológica aislada a partir del paciente después de la administración del compuesto candidato; (b) en el que si el nivel de expresión o actividad de ELOVL6 determinado en la etapa (a) es estadísticamente inferior al nivel de ELOVL6 determinado antes de la administración del compuesto candidato, es indicativo de que el compuesto candidato es eficaz en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica.
- 65

14. Método *in vitro*, según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en el que la muestra biológica se selecciona de: suero, plasma o sangre completa.

Figura 1

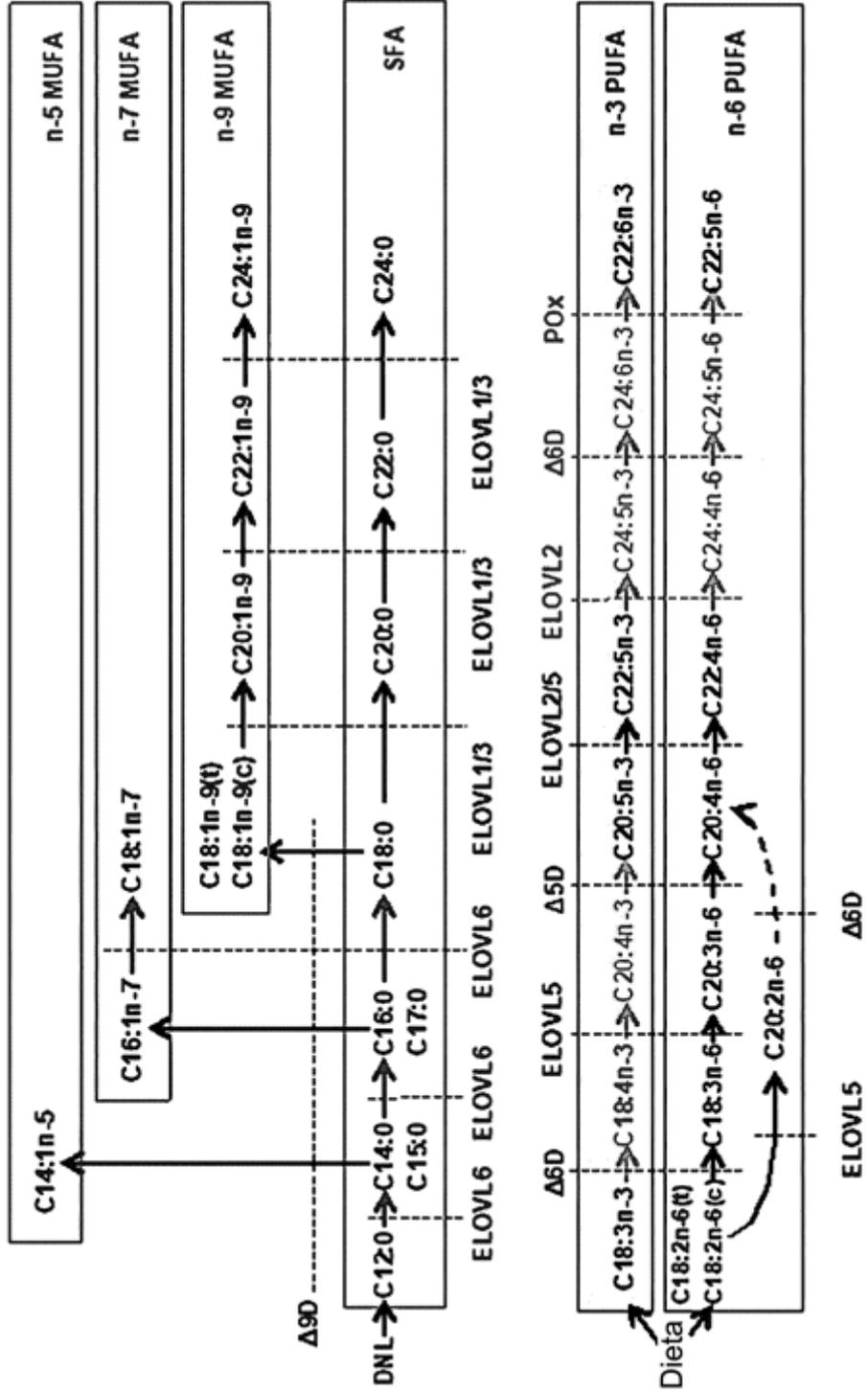
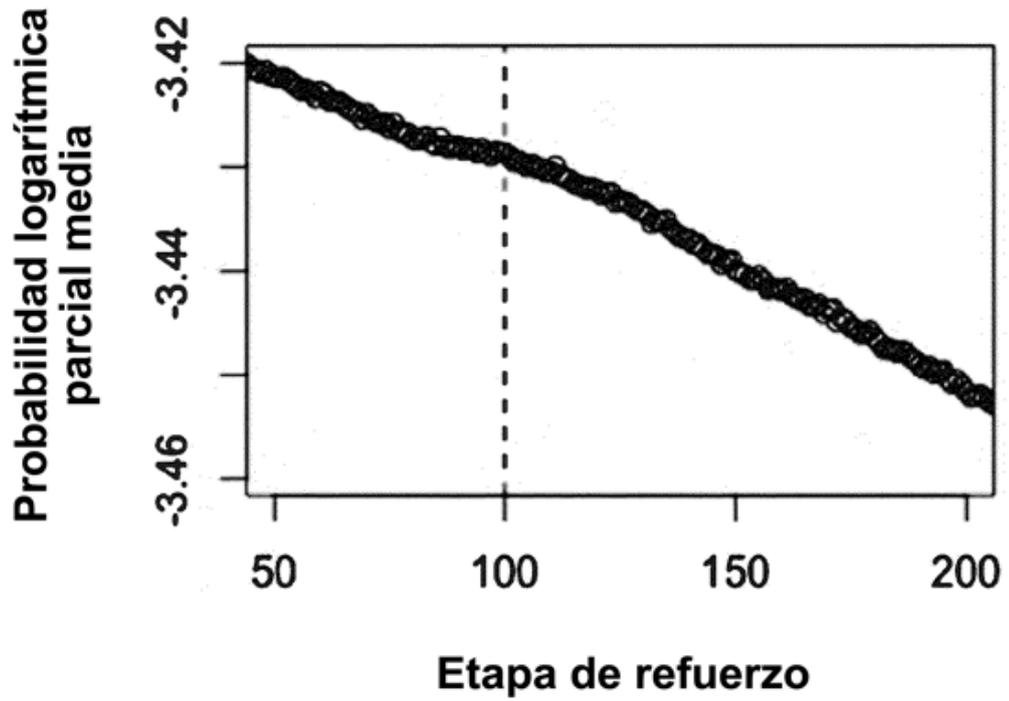


Figura 2

A



B

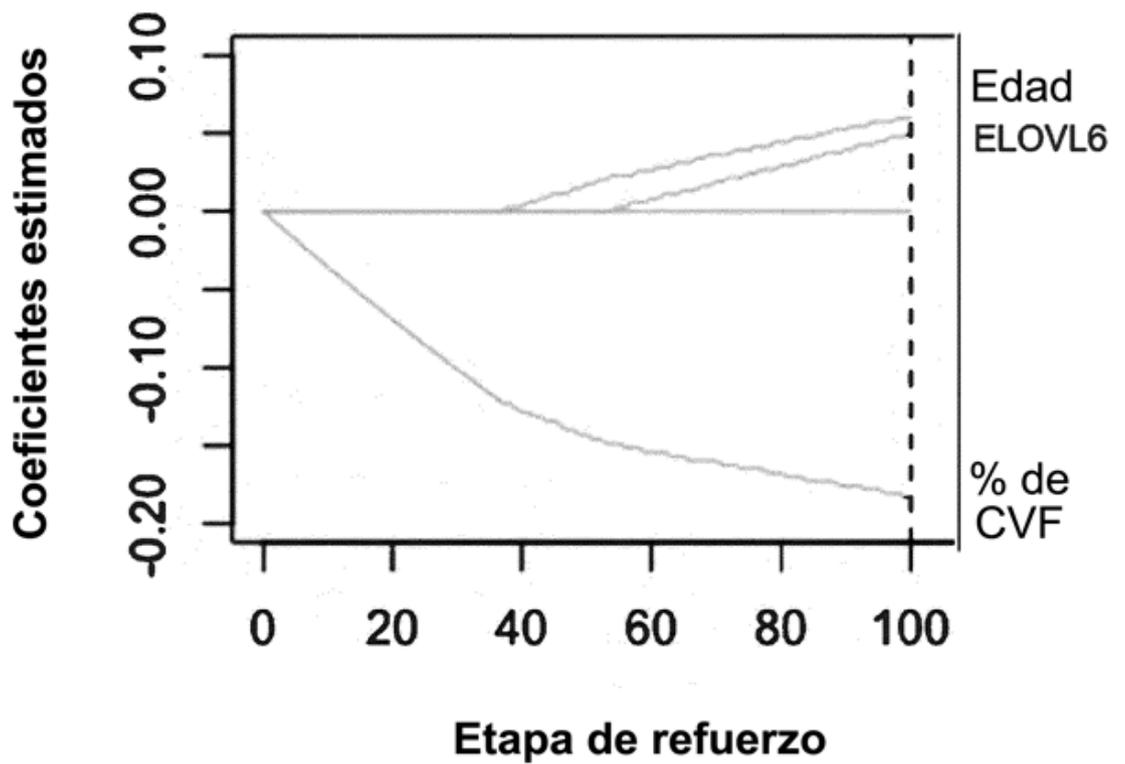
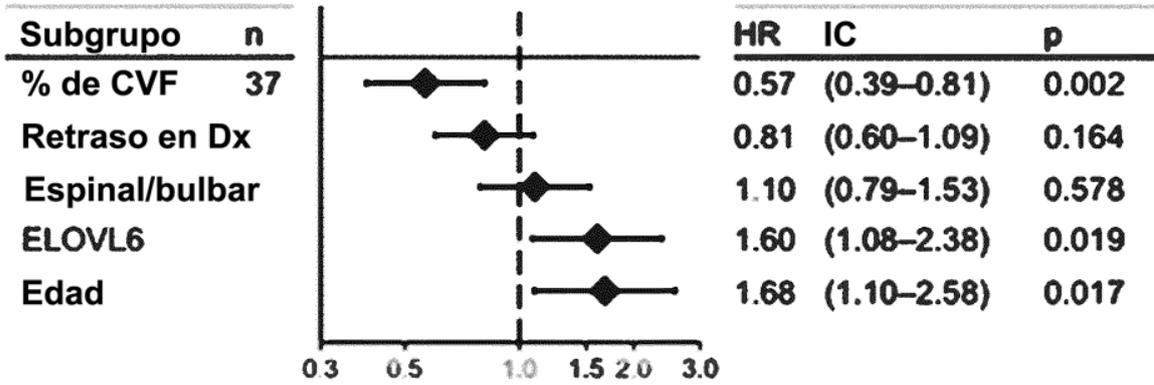


Figura 3

A

Cohorte de entrenamiento



Cohorte de validación

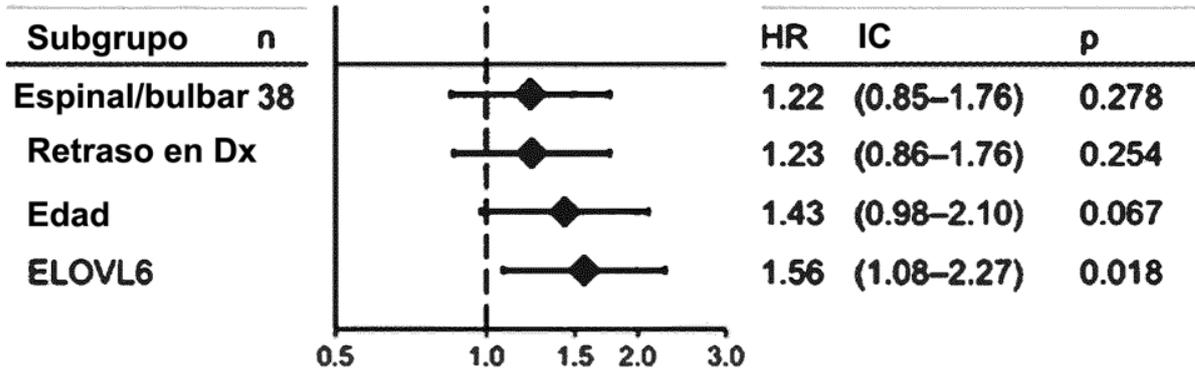


Figura 3 (cont.)

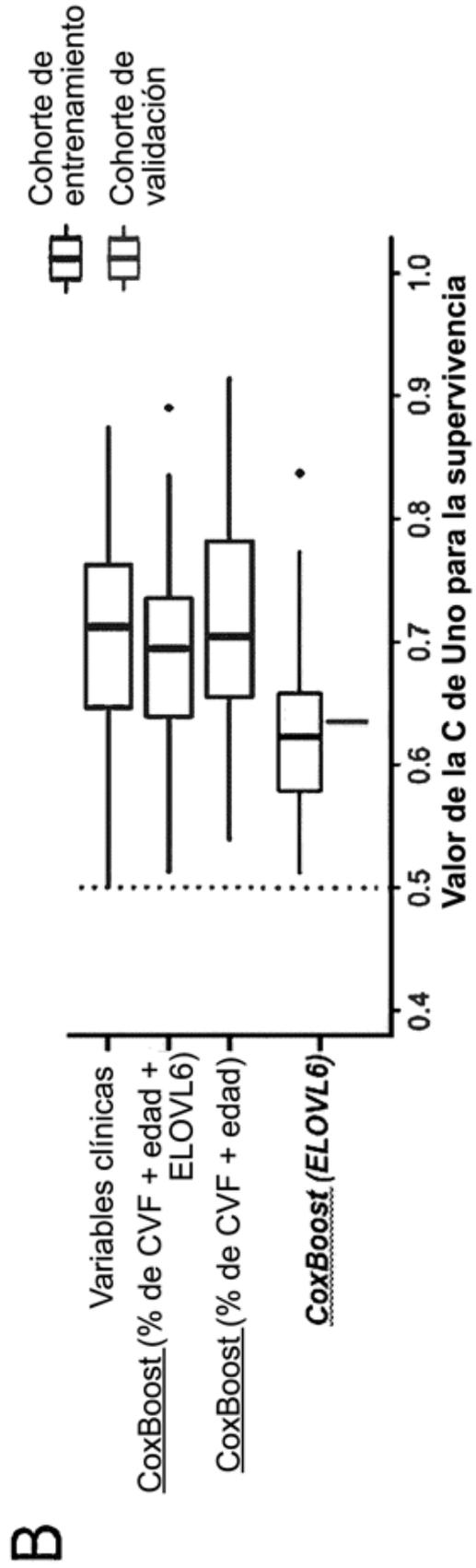


Figura 3 (cont.)

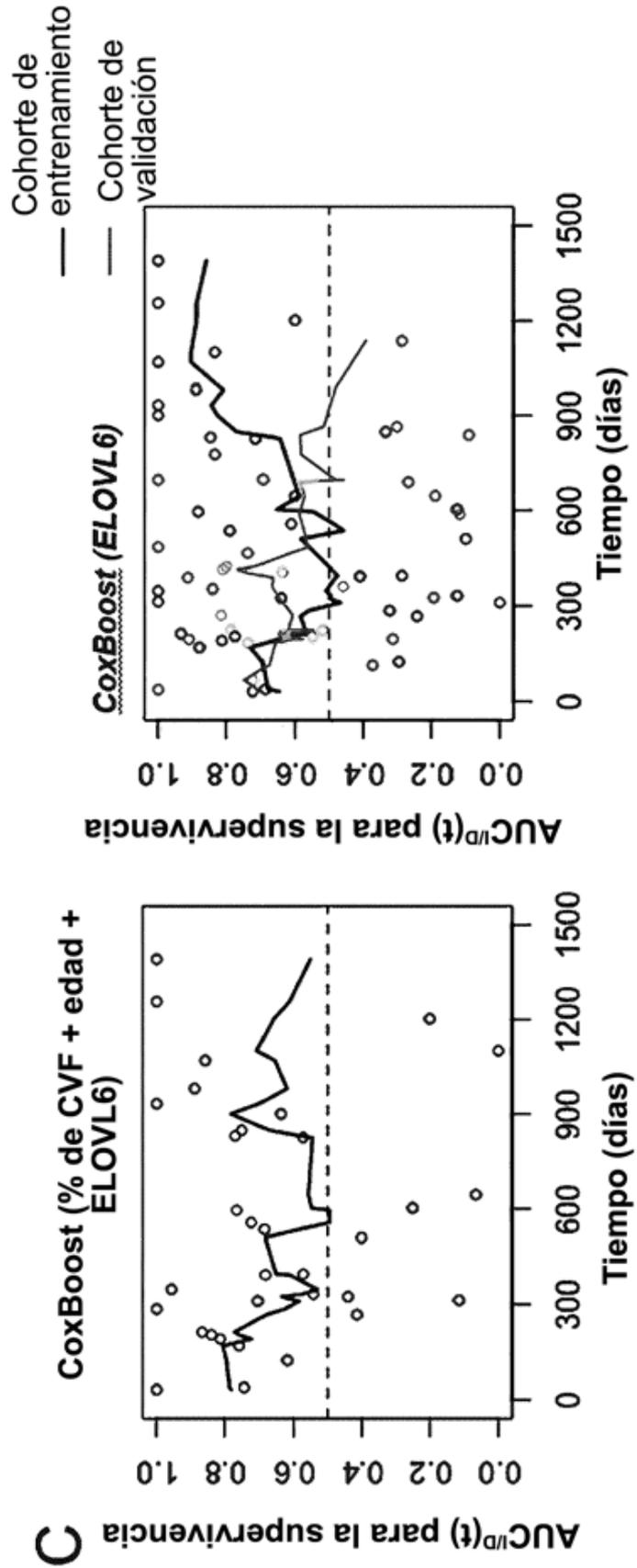


Figura 3 (cont.)

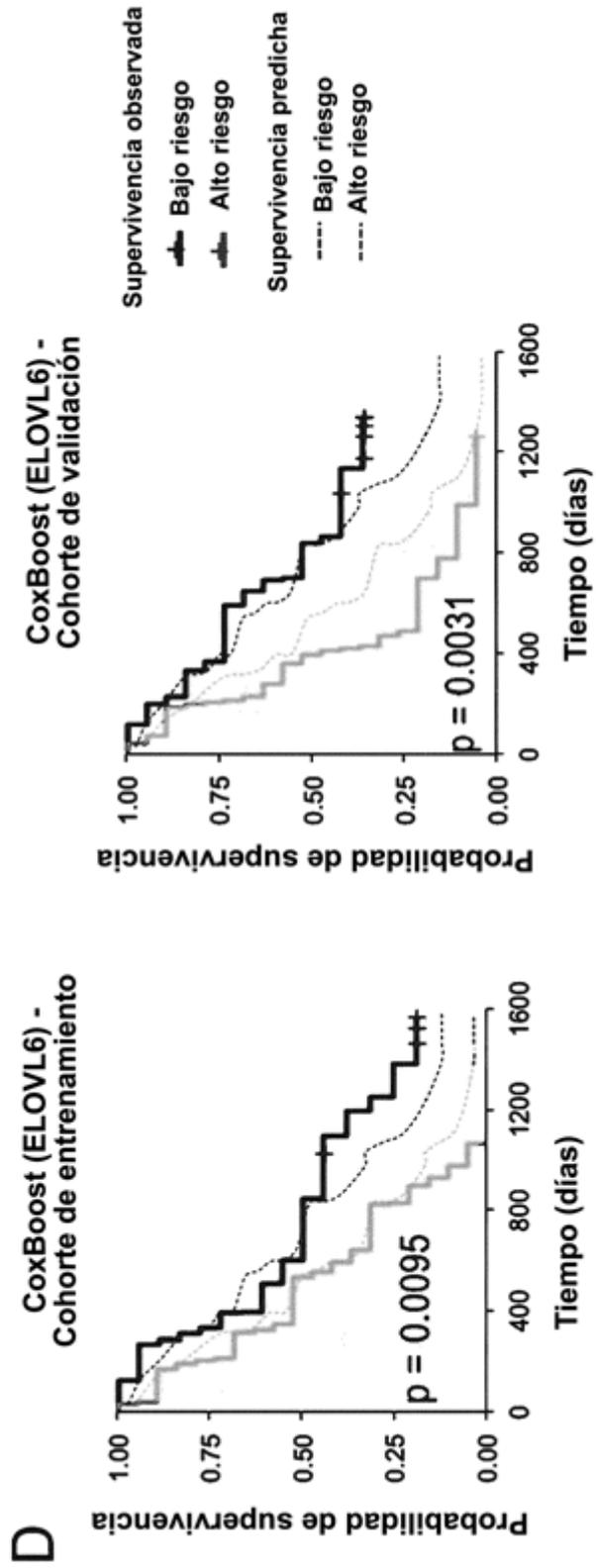


Figura 4

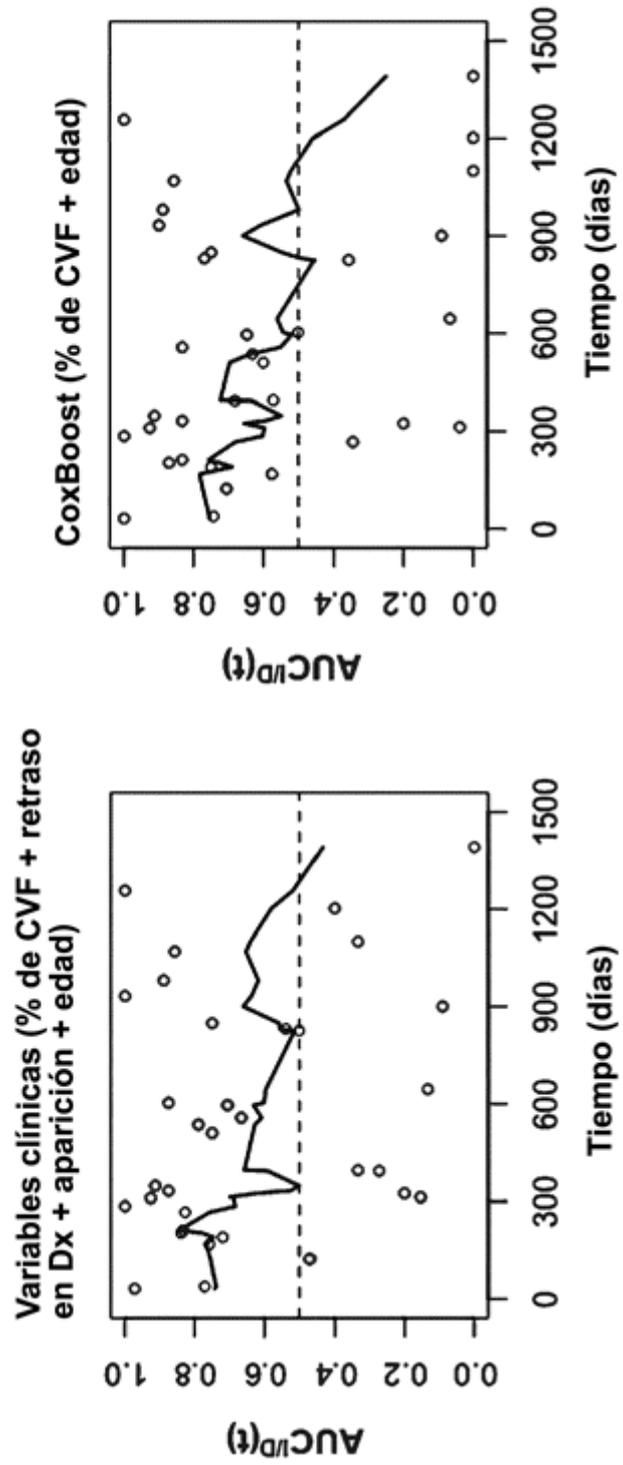


Figura 5

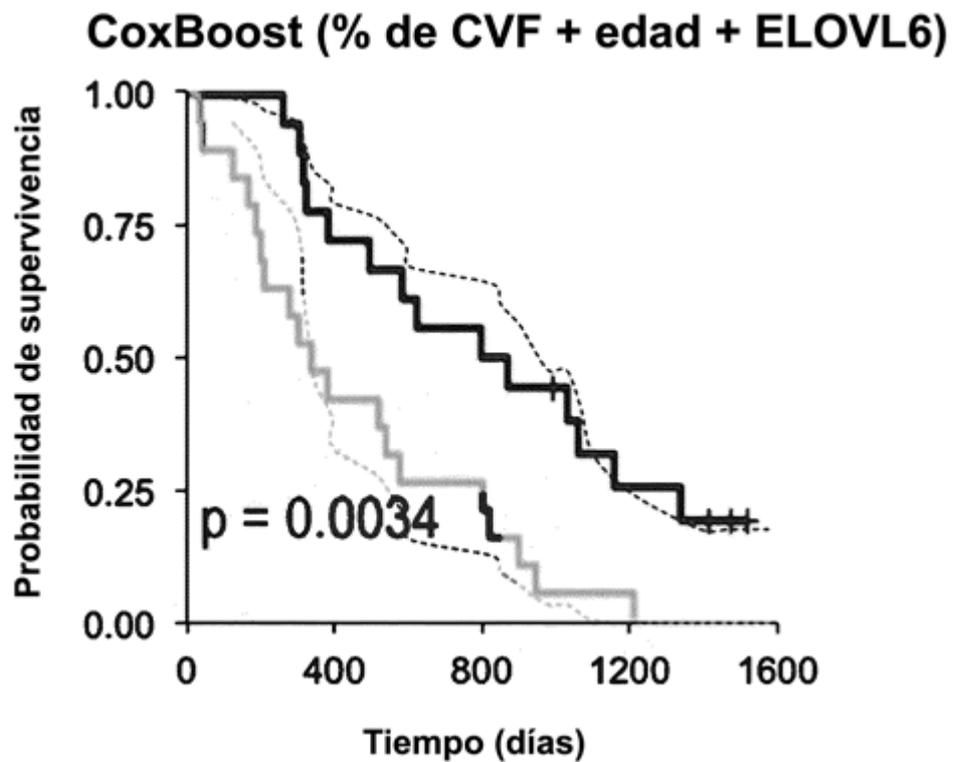
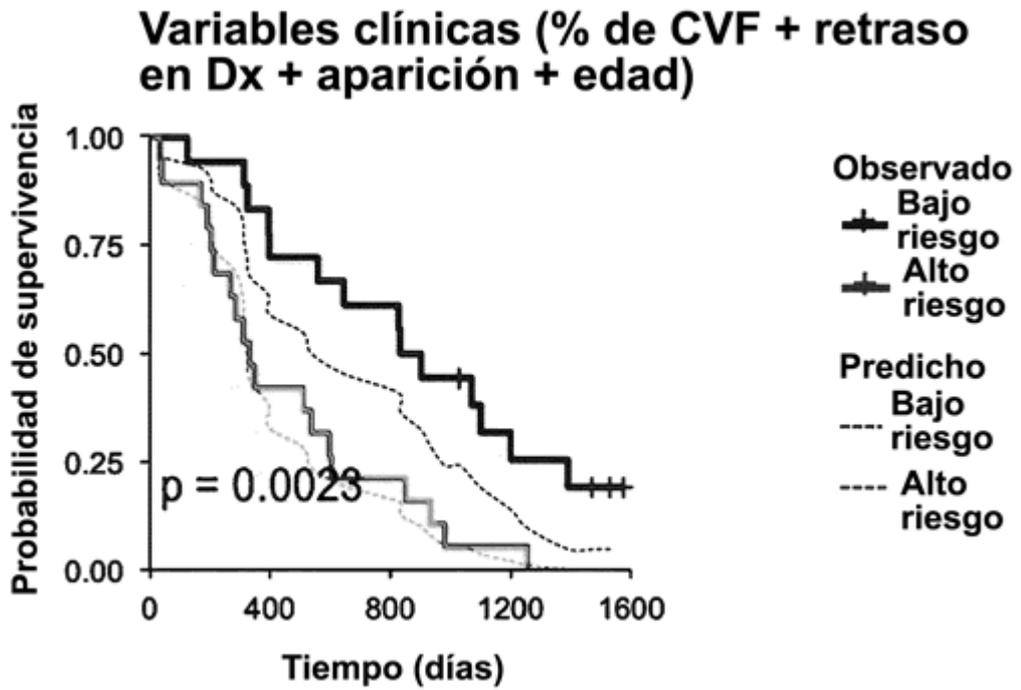


Figura 5 (cont.)

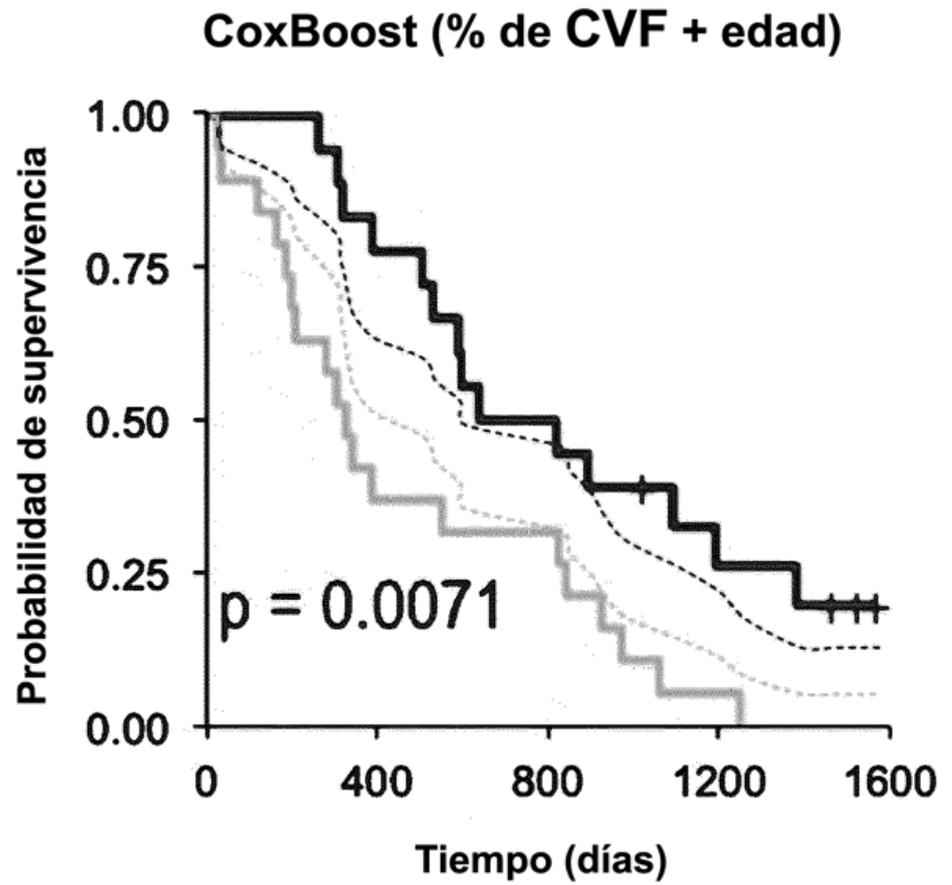


Figura 6

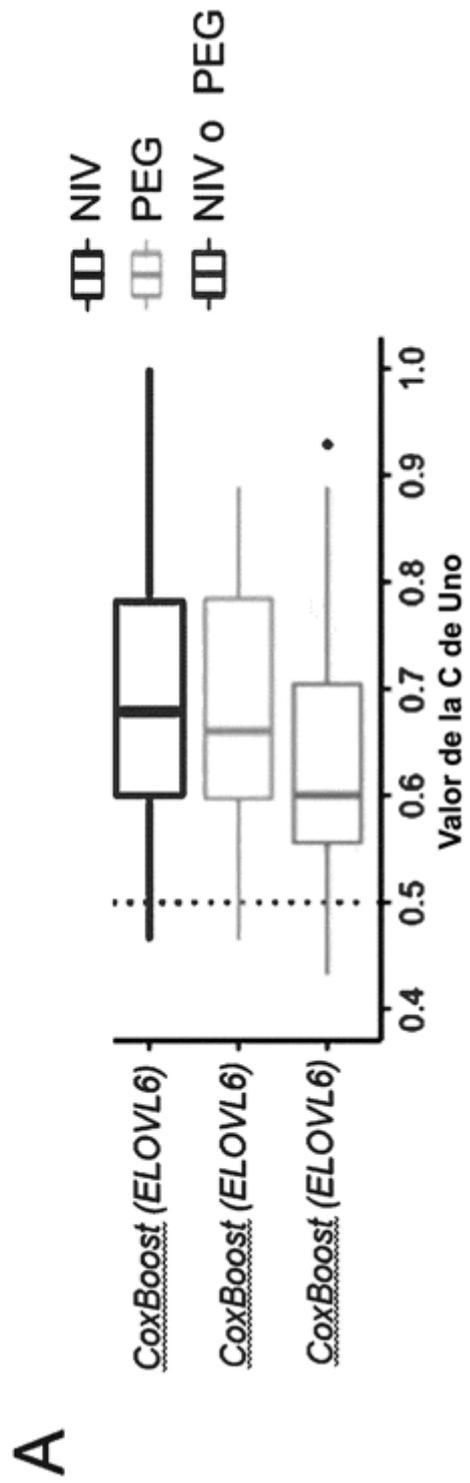


Figura 6 (cont.)

B

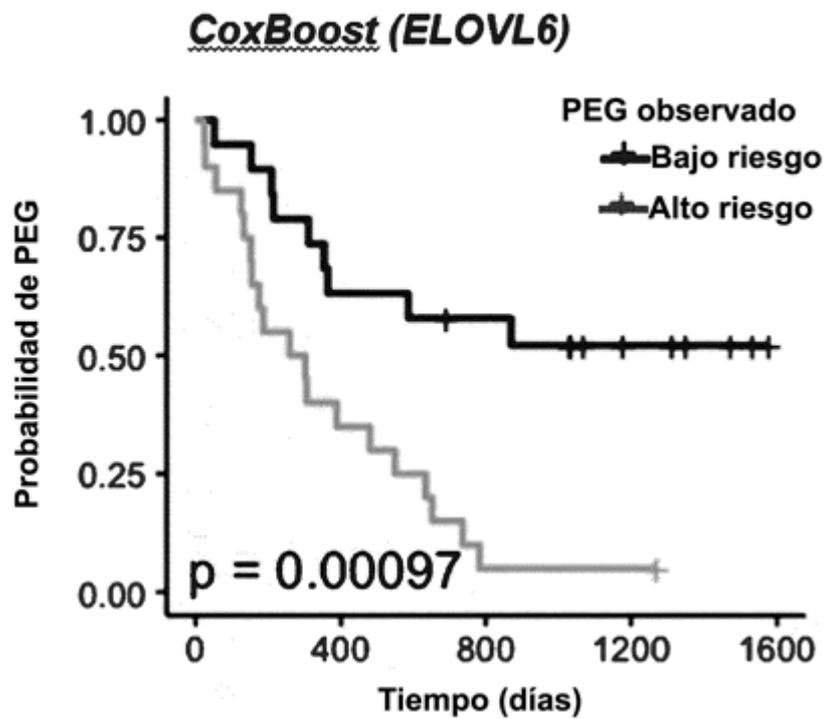
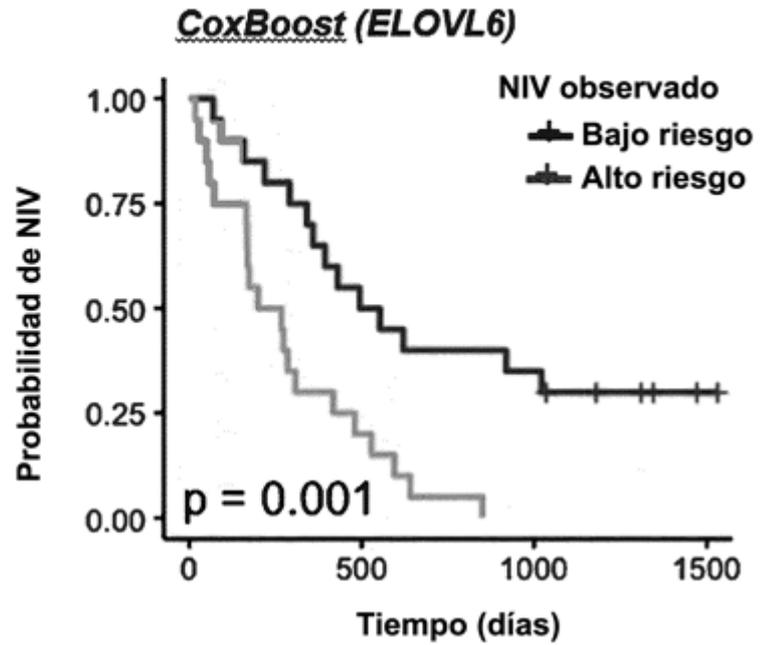


Figura 6 (cont.)

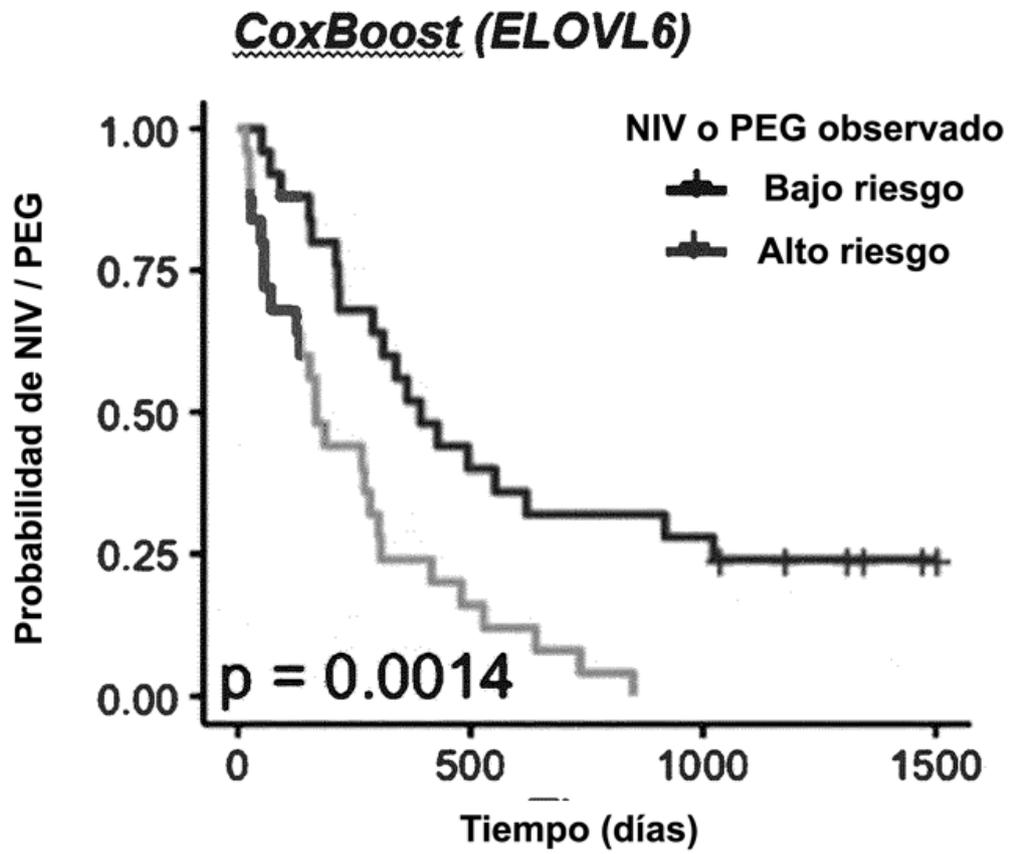


Figura 7

A Perfil de ácidos grasos superpuestos en pacientes y modelos celulares de ALS

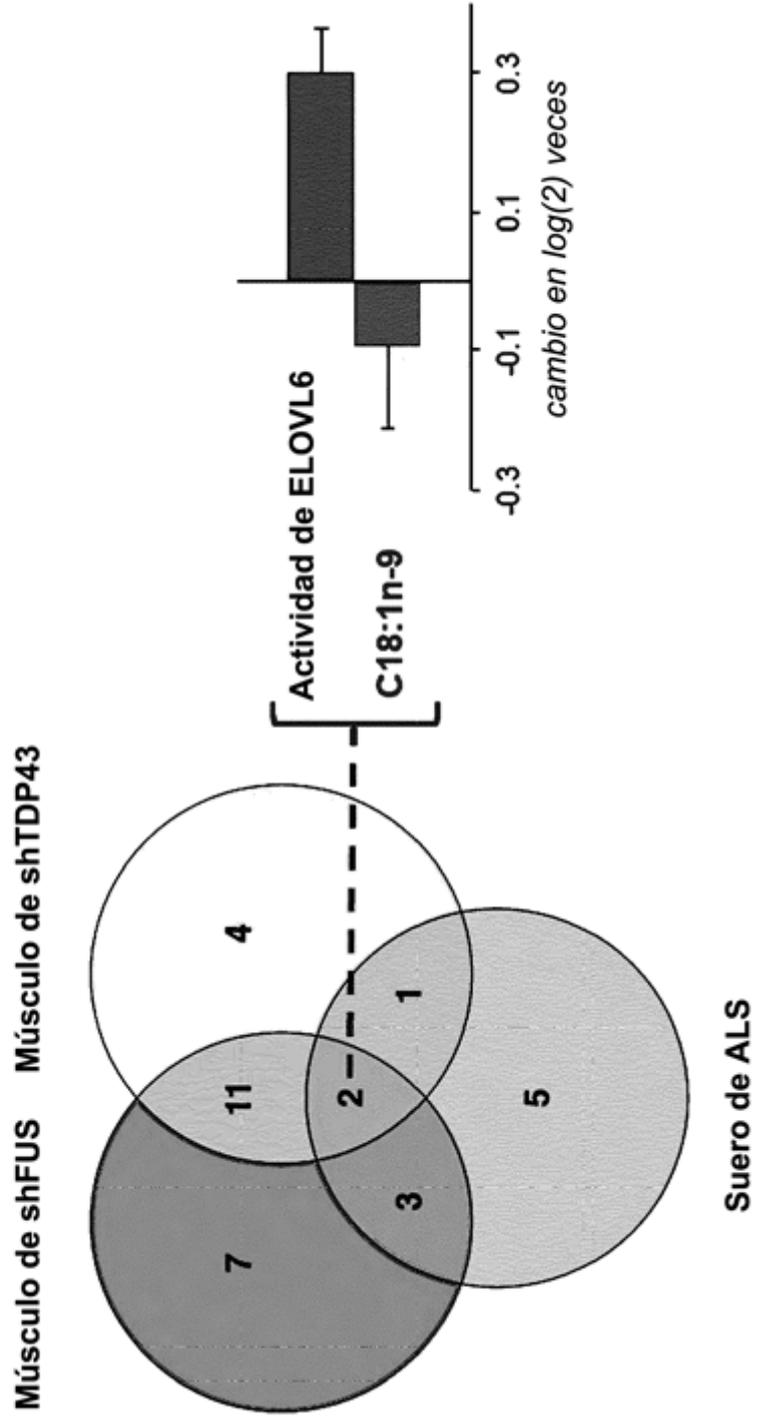


Figura 7 (cont.)

B Acontecimientos de corte y empalme regulados conjuntamente en modelos celulares de ALS

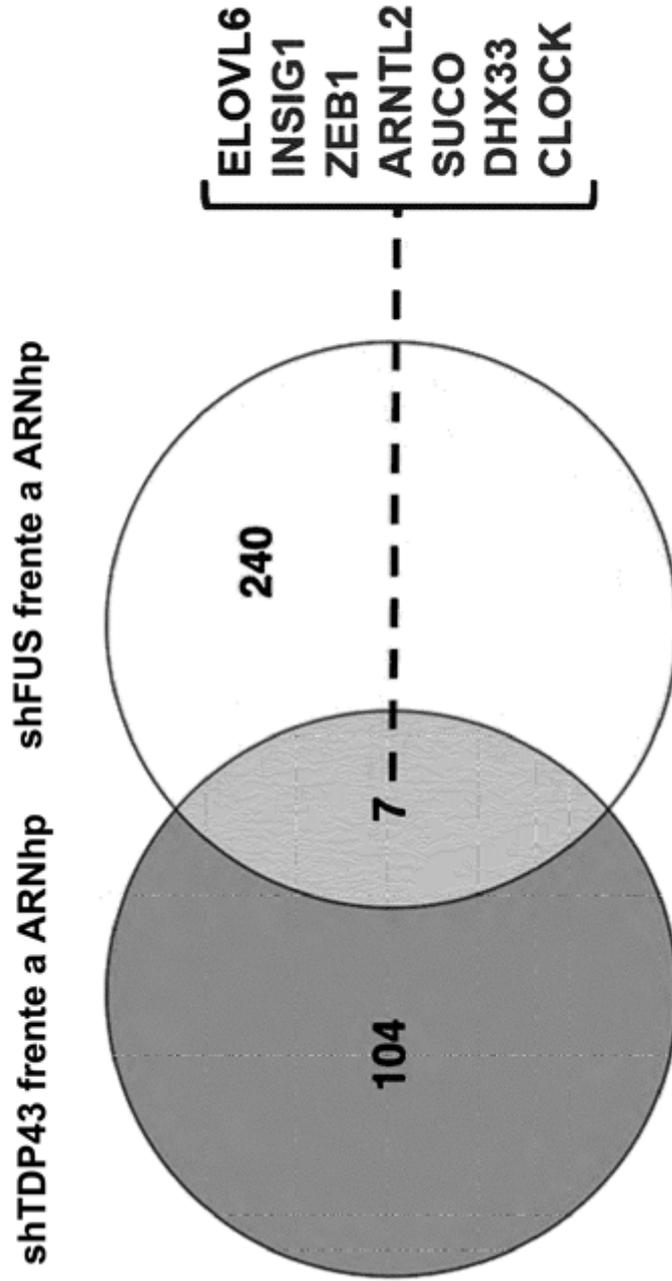


Figura 8

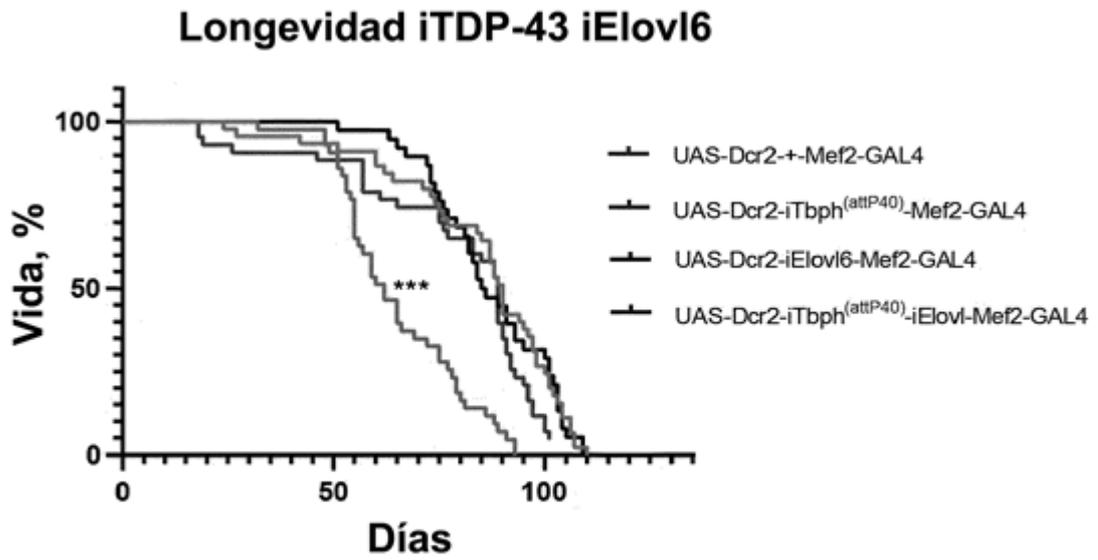


Figura 9

