

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 603**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09750097 .9**
96 Fecha de presentación: **22.05.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2286238**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

54 Título: **Procedimientos para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o formada por proteólisis**

30 Prioridad:
23.05.2008 GB 0809445
21.05.2009 PT 10458509

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.07.2012

73 Titular/es:
**Biocant - Associação De Transferência De
Tecnologia
Centro de Inovacao em Biotecnologia Biocant
Park Parque Tecnologia de Cantanhede Nucleo
04., Lote 3
Cantanhede 3060-197, PT**

72 Inventor/es:
JONES, John Griffith

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 384 603 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

Procedimientos para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o formada por proteólisis

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un ensayo para distinguir entre los orígenes de la glutamina en el cuerpo de un ser humano o de un animal. El ensayo es particularmente adecuado para distinguir entre fuentes catapleróticas y proteolíticas de glutamina hepática.
- 10 **[0002]** La glutamina es un abundante aminoácido no esencial que está muy involucrado en la transferencia de carbono y nitrógeno entre diferentes órganos y tejidos. El músculo esquelético es la fuente principal de producción de glutamina en todo el cuerpo, lo que supone el 50 – 70 % de la tasa de aparición (R_a) de la glutamina. El esqueleto carbonado de la glutamina es utilizado por el intestino como fuente de energía y por el hígado como precursor gluconeogénico. Termodinámicamente, la glutamina es un potente aminoácido gluconeogénico puesto que su conversión a los azúcares-fosfato va acompañada por una ganancia neta de ATP y equivalentes de reducción.
- 15 Existen evidencias de que la glutamina procedente de tejidos periféricos es una importante fuente de carbono para la gluconeogénesis hepática. Por tanto, alteraciones en la producción de glutamina en todo el cuerpo pueden tener un efecto significativo sobre la actividad gluconeogénica y el metabolismo de la glucosa hepática.
- 20 **[0003]** La glutamina puede proceder tanto de fuentes metabólicas como proteolíticas puesto que su R_a puede verse influenciada por cambios en la actividad metabólica periférica o en la cinética de proteínas en todo el cuerpo. Éstas podrían incluir el equilibrio entre el anabolismo y catabolismo de las proteínas de todo el cuerpo así como las actividades intermedias de flujo metabólico de diversos tejidos periféricos.
- 25 **[0004]** El músculo esquelético presenta un reservorio de glutamina libre relativamente grande que se encuentra en rápida renovación y procede tanto de actividades metabólicas como proteolíticas. El contenido en glutamina de las proteínas musculares solubles en bases es del 4 % aproximadamente, por lo que la degradación de proteínas supone una fuente directa de glutamina. Además, la glutamina se puede sintetizar a partir de otros aminoácidos que se liberan durante la proteólisis, incluyendo prolina, histidina, asparagina y glutamato. De estos precursores, el glutamato es cuantitativamente el más importante puesto que su abundancia en las proteínas del músculo esquelético es ~ 4 veces superior a la de la glutamina. En consecuencia, cada equivalente de glutamina que se libera directamente por la proteólisis de músculo esquelético va acompañada por cuatro glutamatos que potencialmente se pueden convertir en glutamina. La glutamina también se puede obtener a partir del reservorio de metabolitos del ciclo de Krebs a través del α -cetoglutarato y glutamato. La producción neta de glutamina a partir de esta fuente requiere que el α -cetoglutarato que se pierde en el ciclo de Krebs se compense con la introducción anaplerótica en el ciclo. En el músculo esquelético, las actividades de la piruvato carboxilasa y la enzima málica permiten la utilización anaplerótica del piruvato. Se ha informado de la presencia de niveles significativos de flujo anaplerótico en el músculo esquelético de rata mediante marcadores ^{13}C .
- 30 **[0005]** Desde hace mucho tiempo existe la necesidad médica de que un facultativo sea capaz de identificar las fuentes de los carbonos de la glutamina en todo el cuerpo para la actividad gluconeogénica hepática. Una enfermedad crítica se caracteriza por una pérdida de masa corporal magra (deterioro muscular) por lo que existe potencial para el aumento en la generación de glutamina a partir de la degradación de proteínas. Este escenario también se caracteriza por hiperlipidemia y tasas elevadas de gluconeogénesis hepática. Dado que la glutamina puede ser un contribuyente importante en la gluconeogénesis hepática en sujetos sanos, el aumento de la disponibilidad de glutamina hepática durante la enfermedad podría contribuir a elevar los flujos gluconeogénicos hepáticos. No obstante, hasta la fecha, no ha sido posible detectar en qué grado contribuyen la degradación de proteínas en todo el cuerpo y los flujos catapleróticos al reservorio de glutamina hepática. Los procedimientos actuales pueden estimar la contribución de glutamina liberada directamente por la degradación de proteínas a la R_a de la glutamina en todo el cuerpo. No obstante, en la medida en que se sintetice la glutamina a partir de otros aminoácidos liberados durante la degradación de proteínas (principalmente el glutamato), los procedimientos de la técnica anterior sustancialmente subestiman la contribución total de la degradación de proteínas al reservorio de glutamina hepática y no son útiles para la detección temprana del deterioro muscular.
- 35 **[0006]** Por tanto, es un objeto de la presente invención evitar las desventajas asociadas a la técnica anterior y proporcionar los procedimientos mejorados para distinguir entre los orígenes de los esqueletos carbonados de la glutamina hepática.
- 40 **[0007]** Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o proteólisis en un sujeto que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;
- 45 **[0007]** Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o proteólisis en un sujeto que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;
- 50 **[0007]** Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o proteólisis en un sujeto que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;
- 55 **[0007]** Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o proteólisis en un sujeto que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;
- 60 **[0007]** Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o proteólisis en un sujeto que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;

en donde la muestra corporal procede de un sujeto al que se le ha administrado agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$) y que ha

sido tratado con un agente que promueve la excreción de glutamina del sujeto; y

en donde las contribuciones catapleróticas y proteolíticas a la formación de glutamina se cuantifican analizando el enriquecimiento en ^2H de la glutamina, indicando así las proporciones en la muestra corporal de glutamina formada a partir de la cataplerosis y de la proteólisis.

[0008] Kuhn y col., 1999 (Am. J. Clin. Nut 70(4): 484 – 489) se propusieron medir la glutamina en proteína muscular. Usaron datos compilados procedentes de estudios previos para recalculan las contribuciones de la proteólisis y la síntesis *de novo* a la producción endógena de glutamina en especímenes de músculo (biopsias abiertas) procedentes de seres humanos, ratas, vacas y cerdos.

[0009] Hankard y col., 2000 (Am. J. Phys. End. Met 279(3): E608 – E613) investigaron el papel de la glucosa en la regulación del metabolismo de la glutamina en sujetos sanos y con diabetes de tipo 1 dependiente de insulina usando una infusión continua elaborada de D-[U- ^{14}C]glucosa, L-[5,5- $^2\text{H}_3$]leucina y L-[3,4- ^{13}C]glutamina y controlando la glucosa plasmática.

[0010] Chapa y col., 2000 (Neurochem. Int. 37 (2 – 3): 217 – 228) utilizaron espectroscopía de RMN [^{13}C , ^2H] *ex vivo* para estimar los tamaños relativos de los reservorios de glutamato neuronales y gliales y las contribuciones relativas de (1- ^{13}C) glucosa y (2- ^{13}C ,2- $^2\text{H}_3$) acetato a los ciclos de los ácidos tricarbóxicos neuronales y gliales en cerebro de adulto. Las ratas se infundieron durante 60 minutos en la vena yugular derecha con disoluciones que contienen (2- ^{13}C ,2- $^2\text{H}_3$) acetato y (1- ^{13}C) glucosa o (2- ^{13}C ,2- $^2\text{H}_3$) acetato solo. Al final de la infusión los cerebros se congelaron *in situ* y se prepararon extractos con ácido perclórico y se analizaron mediante espectroscopía de RMN ^{13}C de alta resolución (90,5 MHz).

[0011] Jones y col., 2001 (Am. J. Phys. End. Met 281 (4): E848 – 856) usaron un estudio de gluconeogénesis con RMN ^2H y ^{13}C integrada y el flujo del ciclo de los TCA en seres humanos. Se midió la síntesis de glucosa hepática procedente de glucógeno, glicerol y del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) en cinco sujetos mantenidos en ayunas durante toda la noche mediante análisis de RMN ^1H , ^2H y ^{13}C de glucosa en sangre, acetaminofen glucurónido en orina y fenilacetilglutamina en orina después de la administración de [1,6- $^{13}\text{C}_2$] glucosa, $^2\text{H}_2\text{O}$, y [U- $^{13}\text{C}_3$] propionato.

[0012] Perdigoto y col., 2001 (NMR in Biomed. 16(4): 189 – 198) examinaron el metabolismo de la glucosa en cinco sujetos sanos mantenidos en ayunas durante 16 horas, medidos con una combinación de [U- $^{13}\text{C}_3$] glucosa y marcadores de $^2\text{H}_2\text{O}$. La producción de glucosa se cuantificó por análisis de RMN ^{13}C del derivado de monoacetona de glucosa plasmática.

[0013] Kadrofske y col., 2006 (Am. J. Phys. End. Met 290(4): E622 – E630) examinaron el efecto de aminoácidos intravenosos sobre las cinéticas de la glutamina y de proteínas en recién nacidos prematuros con bajo peso. Se determinaron las cinéticas de la síntesis *de novo* de glutamina, leucina N, fenilalanina y urea utilizando marcadores isotópicos estables en muestras de sangre obtenidas de un catéter de la arteria umbilical.

[0014] Hankard y col., 1995 (Am. J. Phys 269: E663 – E670) investigaron la respuesta del metabolismo de la glutamina a glutamina exógena en seres humanos y determinaron que la infusión de glutamina llevaba asociada un incremento en la oxidación y en la glutamina plasmática, sin cambio en la glutamina liberada de la proteólisis y una reducción en la síntesis *de novo* de glutamina.

[0015] También se describe un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis y proteólisis en un sujeto que comprende:

- 50 (a) la administración de agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$) a un sujeto;
- (b) el tratamiento del sujeto con un agente que promueve la excreción de glutamina del sujeto;
- (c) la obtención de una muestra corporal del sujeto; y
- (d) someter a ensayo la muestra corporal para la presencia de glutamina deuterada;

55 en donde las contribuciones catapleróticas y proteolíticas a la formación de glutamina se cuantifican analizando el enriquecimiento en ^2H de la glutamina, indicando así las proporciones de glutamina en la muestra corporal formada a partir de la cataplerosis y de la proteólisis.

[0016] Con el término "cataplerosis" queremos indicar las reacciones responsables de la eliminación de compuestos intermedios del ciclo de Krebs. Existen varias enzimas catapleróticas; éstas incluyen la PEPCK, la aspartato aminotransferasa, y la glutamato deshidrogenasa. En el contexto de la presente invención, la glutamato deshidrogenasa es responsable de la conversión del α -cetoglutarato, un compuesto intermedio del ciclo de Krebs, en

glutamato. El glutamato, a su vez, se puede convertir en el hígado en glutamina.

[0017] Con el término "glutamina cataplerótica" queremos indicar la glutamina que se ha obtenido del ciclo de Krebs (procedente, a su vez, de glutamato y α -cetoglutarato). La glutamina obtenida por cataplerosis puede tener un átomo de hidrógeno en las posiciones 2, 3 o 4 (véase Figura 1) que procede del agua del cuerpo. Además, el hidrógeno en esta posición se puede renovar más frecuentemente que el hidrógeno equivalente en la glutamina obtenida de la proteólisis.

[0018] Con el término "glutamina proteolítica" queremos indicar la glutamina que, directa o indirectamente, procede de aminoácidos que se liberan después de la degradación de proteínas.

[0019] La presente invención se basa en una hipótesis desarrollada y sometida a ensayo cuando los inventores se dieron cuenta de que una serie de aspectos podrían contribuir a desarrollar un procedimiento mejorado para la medición de la producción de glutamina.

[0020] En primer lugar, se dieron cuenta de que las contribuciones catapleróticas y proteolíticas de todo el cuerpo a la glutamina (principalmente producida en el hígado) se pueden cuantificar analizando el enriquecimiento en ^2H de la glutamina después del consumo de $^2\text{H}_2\text{O}$. Cuando el agua del cuerpo está enriquecida con $^2\text{H}_2\text{O}$, los aminoácidos libres que se intercambian con el piruvato y los metabolitos del ciclo de Krebs se enriquecen rápidamente con ^2H . Los aminoácidos liberados de la proteína no estarán enriquecidos de manera significativa en ^2H durante este período debido a una tasa de renovación fraccional mucho más pequeña de la proteína. El glutamato procedente del ciclo de Krebs a través de la cataplerosis presentará niveles de enriquecimiento en ^2H predecibles en lugares específicos, lo que refleja la participación de los hidrógenos del agua en las diversas etapas del ciclo de Krebs y durante la aminación del α -cetoglutarato (véase Figura 1). Puesto que se preserva la incorporación de ^2H durante la conversión de glutamato en glutamina, el nivel de enriquecimiento en ^2H de la glutamina refleja la contribución cataplerótica de los esqueletos carbonados al reservorio de glutamina. El grado en el cual este enriquecimiento se diluye en relación al del agua corporal es una medida de la contribución de las moléculas de glutamina cuyos esqueletos carbonados proceden de la degradación de proteínas.

[0021] En segundo lugar, los inventores se dieron cuenta de que sería posible medir el enriquecimiento en ^2H de la glutamina de una forma no invasiva. Esto se puede conseguir combinando la glutamina con una gente que promueva la excreción de la glutamina del cuerpo (por ejemplo, en la orina). Se apreciará que el enriquecimiento en ^2H de los esqueletos carbonados de la glutamina se mantendrá en la fracción de glutamina unida al agente.

[0022] En tercer lugar, los inventores establecieron que la glutamina cataplerótica (enriquecida en ^2H) se puede distinguir de la glutamina procedente de la proteólisis (sin enriquecimiento en ^2H) examinando las moléculas con un sistema de ensayo adecuado tal como resonancia magnética nuclear (RMN) o espectroscopia de masas.

[0023] Por tanto se apreciará que, según los procedimientos de la invención, una elevada proporción de glutamina deuterada (por ejemplo, comparada con un promedio normal o control) en una muestra sugiere cataplerosis. Además, una baja proporción de glutamina deuterada (por ejemplo, comparada con un promedio normal o control) en una muestra sugiere proteólisis.

[0024] El sujeto puede ser cualquier organismo en el cual se pueda sintetizar glutamina en el cuerpo mediante cataplerosis y proteólisis. Se prefiere que el sujeto sea un mamífero. El mamífero puede ser un animal de interés veterinario o de interés científico. Por ejemplo, el sujeto puede ser un mamífero seleccionado del grupo compuesto por caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, primates, gatos, perros, ratas, ratones o conejos. Lo más preferido es que el sujeto sea un ser humano.

[0025] Los procedimientos de la invención pueden ser particularmente útiles cuando un investigador desea utilizar una muestra de un sujeto para seleccionar si un compuesto de prueba promueve o no promueve la proteólisis o la cataplerosis. Una muestra corporal obtenida de un sujeto tratado con dicho compuesto de prueba se trató con agua deuterada y un agente que promueve la excreción de glutamina (como se ha descrito anteriormente). Una reducción en la proporción de glutamina deuterada en un sujeto, cuando se compara con un control, sugeriría que más glutamina de la muestra procede de la proteólisis y que el compuesto de prueba provoca proteólisis. Por el contrario, un incremento en la proporción de glutamina deuterada (es decir, glutamina cataplerótica) en un sujeto sugeriría que el compuesto de prueba reduce la degradación de proteínas y puede ser anabólico. Se apreciará que esto representa una característica importante de la invención y por tanto los procedimientos del primer aspecto de la invención se pueden adaptar para su utilización como selección para su uso por la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos fármacos. Dicha selección también se puede utilizar para someter a ensayo la utilización o no por parte de atletas de sustancias prohibidas para su deporte.

[0026] Por tanto, según otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de selección de un compuesto para establecer si el compuesto es proteolítico o anabólico, que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;

5 en donde la muestra corporal procede de un sujeto al que se le ha administrado agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$), ha sido tratado con un agente que promueve la excreción de glutamina del sujeto, y ha sido tratado con el compuesto; y

en donde, cuando se compara con un control, un incremento en la proporción de glutamina deuterada indica que el compuesto es anabólico o reduce la proteólisis y una reducción en la proporción de glutamina deuterada indica que
10 el compuesto promueve la proteólisis.

[0027] También se describe un procedimiento de selección de un compuesto para establecer si el compuesto es proteolítico o anabólico, que comprende:

- 15 (a) el tratamiento de un sujeto con el compuesto;
 (b) la administración de agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$) al sujeto,
 (c) el tratamiento del sujeto con un agente que promueve la excreción de glutamina del sujeto;
 (d) la obtención de una muestra corporal del sujeto; y
 (e) someter a ensayo la muestra corporal para la presencia de glutamina deuterada;

20 en donde, cuando se compara con un control, un incremento en la proporción de glutamina deuterada indica que el compuesto es anabólico o reduce la proteólisis y una reducción en la proporción de glutamina deuterada indica que el compuesto promueve la proteólisis.

25 **[0028]** La muestra corporal según cualquier aspecto de la invención puede ser cualquier muestra en la que se excrete glutamina, o un conjugado de glutamina junto con el agente. Por ejemplo, la muestra puede ser sudor o lágrimas. No obstante, lo más preferido es que la muestra corporal sea una muestra de orina.

[0029] Se apreciará que el $^2\text{H}_2\text{O}$ se puede administrar a los sujetos mediante cualquier medio que permita
30 que el $^2\text{H}_2\text{O}$ alcance el hígado del sujeto (donde se produce la mayor parte del metabolismo de la glutamina). El $^2\text{H}_2\text{O}$ se puede introducir de tal manera que se administre sistémicamente. Por ejemplo, el $^2\text{H}_2\text{O}$ se puede administrar por medio de gotero intravenoso. No obstante, se prefiere que el $^2\text{H}_2\text{O}$ se ingiera. Idealmente, un sujeto debería comenzar a ingerir el $^2\text{H}_2\text{O}$ al menos 2 horas antes de la obtención de la muestra. Por ejemplo, el sujeto puede comenzar a ingerir el $^2\text{H}_2\text{O}$ 24 horas o más antes de la obtención de la muestra. Preferentemente, el sujeto
35 comienza la ingesta de $^2\text{H}_2\text{O}$ 16 horas antes de la obtención de la muestra y más preferentemente comienza aproximadamente 8 horas antes de la obtención de la muestra.

[0030] Se puede planificar la recogida de muestras corporales de un sujeto por la mañana (por ejemplo, a las 9:00 h). Cuando éste sea el caso, el sujeto puede comenzar a ingerir $^2\text{H}_2\text{O}$ la noche anterior. Idealmente, el sujeto
40 también debería estar en ayunas (por ejemplo, a partir de las 20:00 h después de una cena / ingesta normal). Durante la noche, cada sujeto debe beber entre 1,0 – 10,0 g / kg de agua corporal de $^2\text{H}_2\text{O}$ y preferentemente 5,0 g / kg de agua corporal de $^2\text{H}_2\text{O}$ aproximadamente.

[0031] Cuando el sujeto es un ser humano, el $^2\text{H}_2\text{O}$ se puede administrar en forma de disolución (por
45 ejemplo, $2\text{H}_2\text{O}$ al 35 % aproximadamente) en agua no carbonatada (para un volumen total de ~ 350 ml). Esta disolución se puede dividir en dos fracciones iguales. Cuando las muestras se tienen que obtener a las 9:00 h, la primera fracción se puede administrar a la 1:00 h y la segunda porción se puede administrar a las 3:00 h. Durante el resto del estudio, el sujeto puede beber agua que contenga $^2\text{H}_2\text{O}$ al 0,5 % para mantener el enriquecimiento del agua corporal.
50

[0032] Bajo algunas circunstancias descritas en el presente documento se evita la necesidad de tratamiento con un agente que promueva la excreción de glutamina. Por ejemplo, la prueba para glutamina deuterada puede ser
suficientemente sensible para detectar glutamina libre que se excreta del cuerpo de un mamífero. No obstante, normalmente existe una excreción limitada de glutamina libre y se utiliza un agente que promueva la excreción de
55 glutamina. El agente puede ser cualquier compuesto que reaccione, se una, o se conjugue con la glutamina de tal forma que promueva la excreción de glutamina del cuerpo. Cuando la muestra corporal es orina se prefiere que el agente comprenda un grupo fenilacetilo y reaccione con la glutamina para formar una fenilacetilglutamina (PAGN). Los agentes preferidos incluyen el aspartamo, fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico que pueden reaccionar con la glutamina para formar una PAGN. Se apreciará que la glutamina enriquecida en ^2H (formada mediante cataplerosis)
60 se conserva en la fracción glutamina de la PAGN. A continuación, la PAGN se puede aislar del cuerpo en la orina y la muestra de orina se puede someter a ensayo según los procedimientos de la invención.

- 5 **[0033]** La dosificación y el calendario del tratamiento con el agente dependerá del agente específico seleccionado; cómo se formula; su tasa conocida de absorción en el cuerpo; y la eliminación del cuerpo. Cuando el agente es aspartamo, fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico se prefiere que se formule para ingestión oral. Por ejemplo, el agente se puede formular en forma de comprimido o en forma de disolución para su ingesta. El agente puede estar encapsulado en gelatina.
- 10 **[0034]** El agente se puede ingerir 0,5 – 8 horas antes de la obtención de una muestra y más preferentemente 1 – 4 horas aproximadamente antes de la obtención de la muestra. A modo de ejemplo, un agente encapsulado con gelatina que comprende un grupo fenilacetilo se puede ingerir 2 horas antes de la obtención de una muestra de orina. Por ejemplo, si las muestras de orina se tienen que recoger a partir de las 9:00 h, entonces a las 7:00 h el sujeto humano puede ingerir una cápsula de gelatina que contenga 50 – 500 mg, y preferentemente 300 mg aproximadamente, de ácido fenilbutírico.
- 15 **[0035]** Se apreciará que el $^2\text{H}_2\text{O}$ y el agente se pueden administrar a un sujeto por separado. Alternativamente se pueden combinar en una única disolución acuosa con el fin de que el sujeto sometido a ensayo pueda ingerir de manera conveniente una única disolución. Alternativamente, se puede utilizar una disolución que contenga $^2\text{H}_2\text{O}$ para ayudar a tragar un comprimido o una cápsula de gelatina que comprenda el agente.
- 20 **[0036]** La dosificación y el calendario del tratamiento con los compuestos de prueba dependerán de la naturaleza del compuesto específico sometido a ensayo; cómo se formula; su tasa conocida de absorción en el cuerpo; y la eliminación del cuerpo.
- 25 **[0037]** La(s) disolución(es) que contiene(n) el $^2\text{H}_2\text{O}$ y / o agente y / o compuesto de prueba también puede(n) contener agentes aromatizantes y similares para hacer que dichas disoluciones sean más apetecibles.
- 30 **[0038]** La muestra corporal puede ser adecuada para su ensayo inmediato. No obstante, dependiendo del procedimiento de prueba utilizado, la muestra corporal puede requerir procesamiento. Por ejemplo, la muestra puede requerir que se diluya o que se concentre en su contenido en glutamina para hacerla adecuada para las pruebas. También puede ser necesario liberar la glutamina de la fracción (por ejemplo, un grupo fenilacetilo) que haya promovido la excreción de la glutamina del sujeto. Algunos de los procedimientos utilizados para liberar la glutamina pueden dar como resultado la desaminación de la glutamina para generar glutamato. Se apreciará que la glutamina y el glutamato comparten el mismo esqueleto carbonado y el análisis de ^2H sobre la glutamina o el glutamato serán igualmente útiles para discriminar entre la glutamina cataplerótica y la glutamina proteolítica.
- 35 **[0039]** La muestra corporal se puede someter a ensayo de diferentes maneras. Por ejemplo, se puede utilizar espectroscopia de masas para analizar el contenido en glutamina (o glutamato) de la muestra. Se pueden utilizar técnicas de espectroscopía de masas convencionales.
- 40 **[0040]** Se prefiere que los procedimientos de la invención supongan la prueba de las muestras mediante análisis de RMN y es más preferido la utilización de técnicas de RMN ^2H .
- 45 **[0041]** El análisis de bajos niveles de enriquecimientos en ^2H mediante RMN requiere la recuperación de ~ 0,1 – 0,2 mmol de analito. Los inventores han encontrado que se obtiene suficiente analito en una muestra de orina cuando se ingiere una única cápsula que contiene 50 – 500 mg de un agente y se prosigue con la recogida de orina 2 – 4 horas después aproximadamente. Por ejemplo, una cápsula de gelatina que contiene 0,3 – 0,5 g de ácido fenilbutírico basta para producir analito suficiente para el análisis por RMN de orina procedente de un sujeto humano que se recoge 2 – 4 horas después de que se haya consumido la cápsula.
- 50 **[0042]** Los inventores han descubierto que la glutamina procedente de la cataplerosis se puede distinguir de la glutamina procedente de la proteólisis cuando se analizan trazas mediante RMN ^2H . La Figura 3 ilustra cómo los átomos de hidrógeno ^2H sobre el esqueleto carbonado de la glutamina se pueden resolver en las posiciones 2, 3 ó 4. La presencia de hidrógeno ^2H , particularmente en posición 3, se puede cuantificar, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1, para proporcionar la relación de glutamina cataplerótica / glutamina proteolítica en una muestra.
- 55 **[0043]** Según una forma de realización preferida de la invención se obtiene una muestra de orina procedente de un sujeto que haya ingerido previamente $^2\text{H}_2\text{O}$ (para cargar la glutamina cataplerótica con ^2H) y un agente que promueve la excreción de glutamina del cuerpo (por ejemplo, aspartamo, fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico). Se recoge una muestra de orina del sujeto. A continuación la muestra se procesa (véase a continuación) y se lleva a cabo una RMN ^2H sobre la muestra procesada para analizar el contenido en glutamina cataplerótica y glutamina proteolítica de la muestra.
- 60 **[0044]** Lo más preferido es que una muestra de orina que contiene PAGN se procese utilizando el siguiente

procedimiento:

(A) La orina se puede concentrar (ejemplo, mediante un evaporador rotatorio).

5 (B) El pH del concentrado se puede ajustar a 7 aproximadamente (por ejemplo, con NaOH).

(C) A continuación la muestra se puede centrifugar, se puede retirar el precipitado y el pH del sobrenadante se puede ajustar a 1,5 (por ejemplo, con HCl).

10 (D) El sobrenadante se puede introducir en una columna de extracción en fase sólida y la PAGN se puede eluir con acetato de etilo.

(E) La PAGN recogida a continuación se puede hidrolizar para liberar el glutamato disolviendo el acetato de etilo en ácido y calentando a 100 °C aproximadamente.

15

(F) A continuación la disolución resultante se puede centrifugar, el sobrenadante se puede mezclar con agua y el pH se puede ajustar a 1,0 (por ejemplo, con la adición de HCl).

(G) La disolución se puede pasar a través de una resina de intercambio catiónico. La columna se lava con agua y el glutamato libre se eluye con una base volátil (por ejemplo, NH₄OH 2 M).

20

(H) A continuación el disolvente se puede evaporar hasta sequedad y el residuo que contiene glutamato se puede disolver en agua no deuterada antes del análisis por RMN ²H.

25 **[0045]** Los procedimientos más preferidos se describen en los Ejemplos. Estos procedimientos preferidos se pueden adaptar fácilmente para incluir un compuesto de prueba que se deba seleccionar según la invención.

[0046] Los procedimientos del primer aspecto de la invención son útiles en la gestión clínica de animales o seres humanos. Los datos de los inventores indican que, en sujetos en estado post-absortivo sanos, aproximadamente el 50 % de los esqueletos carbonados en el reservorio de glutamina hepática proceden de la degradación de proteínas. No obstante, también se ha demostrado que esta relación puede variar en sujetos que padecen una enfermedad crítica (por ejemplo, que han sufrido quemaduras, lesiones, inflamación o dolencias inmunológicas importantes). Los procedimientos de la invención permiten a un facultativo distinguir si la glutamina está siendo sintetizada en el cuerpo mediante el catabolismo inadecuado de las proteínas (dando lugar al deterioro muscular, etc.) o si procede de compuestos intermedios del ciclo de Krebs. Esta información puede proporcionar una percepción valiosa al facultativo y le permite tomar decisiones (con respecto a los tratamientos o la dieta) que ayudarán a manejar la dolencia de un paciente.

30

35

[0047] Los procedimientos del primer aspecto de la invención son particularmente útiles para el control de pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI). Los pacientes de UCI son propensos al deterioro muscular y dicho deterioro puede tener una gran influencia sobre la morbilidad y la mortalidad. Los procedimientos de la invención se pueden aprovechar para obtener una visión temprana sobre el deterioro muscular mediante el ensayo para un incremento de la glutamina proteolítica. La detección temprana del deterioro muscular permite que el facultativo pueda ajustar la dieta del paciente y así mejorar la salud de dicho paciente. Esta detección temprana también beneficia al hospital puesto que permite mejorar la nutrición de los pacientes de UCI, reduciendo el tiempo de estancia de un paciente en la UCI, con lo que se reducen los costes.

40

45

[0048] Los procedimientos del primer aspecto de la invención también se pueden aprovechar en clínica cosmética (para controlar la pérdida de masa magra en tratamientos de pérdida de peso); en medicina deportiva (para controlar el deterioro o la ganancia muscular en atletas); en regímenes de estado físico general (para controlar la pérdida o ganancia muscular); y para controlar la utilidad de suplementos nutricionales tales como suplementos de aminoácidos utilizados para promover el crecimiento muscular.

50

[0049] Ahora la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos y Figuras, que describen:

55

Figura 1: Ilustra esquemáticamente las fuentes de enriquecimiento de hidrógeno de la glutamina procedentes de intercambios o adición de protones del agua corporal a compuestos intermedios del ciclo de Krebs. Los dos átomos de hidrógeno en posición 4 de la glutamina (mostrados en negrita) se originan a partir de los hidrógenos metílicos del acetil-CoA. El hidrógeno 3R (mostrado en negrita y subrayado) se incorpora a partir de agua libre durante la conversión de aconitato y citrato a través de la aconitasa, y el hidrógeno 3S (también mostrado en negrita y subrayado) se incorpora durante la conversión de oxalosuccinato a α-cetoglutarato mediante la isocitrato

60

deshidrogenasa. El hidrógeno 2 (mostrado en negrita y con doble subrayado) se incorpora a través de la aminación del α -cetoglutarato a glutamato mediante la transaminasa o la glutamato deshidrogenasa.

Figura 2: Ilustra la relación entre el enriquecimiento en ^2H teórico y experimental del hidrógeno 2 del glutamato medido mediante espectroscopía de RMN ^2H de una serie de patrones de glutamato. Los patrones se prepararon a partir de precursores de glutamina que contienen fracciones conocidas de $[2,3,3,4,4\text{-}^2\text{H}_5]$ glutamina comprendidas entre el 0,1 – 0,5 %.

Figura 3: Ilustra el espectro de RMN ^1H y ^2H del glutamato obtenido a partir de la hidrólisis de fenilacetilglutamina en orina de un sujeto en ayunas durante toda la noche. Ambos espectros se procesaron con una anchura de línea de 0,5 Hz. El espectro de ^1H representa una adquisición mientras que el espectro de ^2H representa 7608 caídas libres de la inducción. El número encima de cada resonancia identifica la posición del hidrógeno de glutamilo alifático y el origen metabólico de cada posición del sitio de enriquecimiento en ^2H según lo representado en la Figura 1.

Figura 4: Modelo esquemático que representa las fuentes principales del esqueleto carbonado glutamina de la fenilacetilglutamina procedente del ciclo de Krebs y de restos aminoácidos de proteínas. También se muestra la molécula de fenilacetilglutamina con los hidrógenos alifáticos de la glutamina resaltados en relación a sus fuentes metabólicas según lo representado en la Figura 1.

20 **EJEMPLO 1**

1.1 RESUMEN

[0050] Los inventores realizaron pruebas para demostrar el valor de los procedimientos según la invención para distinguir entre glutamina cataplerótica y proteolítica en muestras de orina procedentes de sujetos humanos. El análisis posicional de los enriquecimientos en ^2H de la glutamina a partir de $^2\text{H}_2\text{O}$ se llevó a cabo utilizando RMN. La glutamina procedente de la cataplerosis estaba enriquecida en posición 3 mientras que la glutamina procedente de la proteólisis no lo estaba.

[0051] Los enriquecimientos en ^2H de la glutamina se cuantificaron en ocho sujetos sanos mediante análisis de RMN ^2H de fenilacetilglutamina en orina después de la ingestión de $^2\text{H}_2\text{O}$ al $0,49 \pm 0,03$ % de enriquecimiento en agua corporal y 0,3 gramos de ácido fenilbutírico. El enriquecimiento de glutamina en posición 2 fue del $0,33 \pm 0,02$ %; en 3R fue del $0,27 \pm 0,02$ %; en 3S fue del $0,27 \pm 0,02$ % y el enriquecimiento medio de los dos hidrógenos en posición 4 fue del $0,17 \pm 0,01$ %. La fracción de glutamina hepática procedente de la cataplerosis se estimó a partir de la relación de enriquecimiento en posición 3 a agua corporal. Mediante este análisis, el 55 ± 3 % de la glutamina hepática procedía de la cataplerosis y el 45 ± 3 % procedía de la proteólisis. El enriquecimiento del hidrógeno en 2 fue significativamente superior que en 3R o 3S ($p < 0,05$) lo que indica que una fracción del precursor glutamato sin marcar experimentó un intercambio con el α -cetoglutarato que no estaba relacionado con el ciclo de Krebs. El enriquecimiento medio de los hidrógenos en posición 4 fue de $0,66 \pm 0,01$ al de las posiciones 3R,S lo que indica que los hidrógenos metílicos del precursor acetil-CoA de la glutamina cataplerótica se intercambiaron en un 66 ± 1 % con los protones del agua corporal. En conclusión, el enriquecimiento en ^2H de la glutamina hepática a partir de $^2\text{H}_2\text{O}$ refleja la contribución de las fuentes catapleróticas y proteolíticas y el grado en el que los hidrógenos del acetil-CoA se intercambian con los del agua corporal.

45 **1.2 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

1.2.1 Estudios en seres humanos

[0052] Todos los estudios se realizaron de acuerdo con un protocolo aprobado por el comité ético del Hospital universitario de Coímbra tras el consentimiento informado de cada sujeto. Los sujetos comenzaron el ayuno a las 20: 00 h después de una cena normal. Durante la noche, cada sujeto ingirió 5,0 g / kg de agua corporal de $^2\text{H}_2\text{O}$ en forma de disolución al 35 % en agua mineral no carbonatada (para un volumen total de ~ 350 ml) dividida en dos fracciones iguales: la primera fracción se administró a la 1: 00 h y la segunda fracción se administró a las 3: 00 h. Durante el resto del estudio, cada sujeto bebió agua que contiene $^2\text{H}_2\text{O}$ al 0,5 % para mantener el enriquecimiento del agua corporal. A las 7: 00 h los sujetos ingirieron una cápsula de gelatina que contiene 300 mg de ácido fenilbutírico la orina se recogió entre las 9: 00 h y las 11: 00 h.

1.2.2 Aislamiento y procesamiento de la fenilacetilglutamina en orina

[0053] La orina se concentró hasta 10 – 15 ml mediante evaporación rotatoria, el pH del concentrado se ajustó a 7 con NaOH 5 M y la muestra se centrifugó. Después de la extracción del precipitado, el pH del sobrenadante se ajustó a 1,5 con HCl 2 M y se introdujo en una columna de extracción en fase sólida de 20 ml

(Isolute HM-N, Symta, S.A.L., España). La PAGN se eluyó con 80 ml de acetato de etilo y el acetato de etilo se evaporó hasta sequedad. Para la hidrólisis de la PAGN a glutamato, el extracto de acetato de etilo se disolvió en 5 ml de HCl 6 M y se calentó durante 24 horas a 105 °C. La disolución se centrifugó y el sobrenadante se mezcló con ~ 35 ml de agua. El pH se subió hasta 1,0 con la adición de NH₄OH 2 M y la disolución se pasó a través de una columna de resina de intercambio de cationes de 18 cm x 1 cm de Dowex 50X8 – 200-H⁺. La columna se lavó con 40 ml de agua, el glutamato se eluyó con 40 ml de NH₄OH 2 M y el disolvente se evaporó hasta sequedad. Se aplicó el mismo procedimiento de hidrólisis y purificación a un grupo de muestras de [2,3,3,4,4-²H₅]glutamato para generar patrones de [2,3,3,4,4-²H₅]glutamato. Para la espectroscopía de RMN, el residuo que contiene el glutamato se disolvió en ~ 0,6 ml de agua no deuterada que contiene una cantidad conocida del 0,505 % de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) como patrón de concentración interno de ¹H y ²H.

1.2.3 Espectroscopía de RMN

[0054] El espectro de RMN ²H con desacoplamiento protónico se obtuvo a 11,75 T en un sistema Varian Unity 500 equipado con una sonda de banda ancha de 5 mm (Varian, Palo Alto, CA). Los espectros se obtuvieron a 60 °C sin bloqueo del campo-frecuencia con un ángulo de inclinación de 90 grados, una anchura de barrido de 10 ppm, y un tiempo de adquisición de 2 segundos, y un retraso en el pulso de 5 segundos. Se obtuvieron entre 1500 y 7600 caídas libres de la inducción (FID) por muestra para tiempos de obtención de 3 – 15 horas. Las FID totales se procesaron con una anchura de línea de 0,5 Hz antes de aplicar la transformada de Fourier. Se obtuvieron espectros de RMN ¹H completamente relajados bajo las mismas condiciones con pre-saturación de la señal de agua. Se utilizó una anchura de pulso de 45 grados, un tiempo de adquisición de 3 segundos y un retraso de 16 segundos. Cada espectro de ¹H se obtuvo con una única FID. El enriquecimiento en ²H del agua de la orina se analizó mediante RMN ²H como se ha descrito previamente (Yang y col. (1993) Anal. Biochem. 212 p277 – 282). Todos los espectros de RMN se analizaron utilizando una rutina de ajuste de la curva suministrada con el programa NUTS de análisis espectral de RMN para PC (Acorn NMR Inc., Fremont CA).

1.2.4 Cálculo del enriquecimiento posicional en ²H del glutamato

[0055] Dado el enriquecimiento conocido en ²H del patrón de DMSO (0,505 %) y asumiendo los mismos equivalentes protónicos para el DMSO y el glutamato (la señal ¹H o ²H del DMSO representa 6 protones equivalentes o átomos de deuterio por molécula), el enriquecimiento en ²H de cualquier señal del glutamato es simplemente el enriquecimiento del DMSO multiplicado por la relación de las intensidades de la señal de ²H del DMSO y el glutamato. En el caso de la posición 2 del glutamato (G2), el enriquecimiento sería igual a 0,505 × ²H señal_{G2} / ²H señal_{DMSO}. Para considerar cantidades distintas de moléculas de DMSO y glutamato presentes en la muestra, esta expresión se multiplica por las cantidades relativas de DMSO y glutamato, obtenidas a partir de la relación de las señales de RMN ¹H del DMSO y del glutamato (¹H señal_{DMSO} / ¹H señal_{G2}). Por tanto, el porcentaje de enriquecimiento del hidrógeno 2 en el glutamato se calculó a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Enriquecimiento del G2 (\%)} = 0,505 \times \left(\frac{{}^2\text{H señal}_{\text{G2}}}{{}^2\text{H señal}_{\text{DMSO}}} \right) \times \left(\frac{{}^1\text{H señal}_{\text{DMSO}}}{{}^1\text{H señal}_{\text{G2}}} \right)$$

[0056] Los enriquecimientos posicionales en ²H de las posiciones del hidrógeno 3 proquiral que se pueden resolver se cuantificaron de la misma manera. El par de hidrógenos de la posición 4 del glutamato (G4) son magnéticamente equivalentes puesto que la señal del deuterio G4 representa el enriquecimiento en ²H total en estos dos sitios y el enriquecimiento medio por hidrógeno en posición 4 está representado por una mitad de la intensidad de la señal G4 de la manera siguiente:

$$\text{Enriquecimiento del G4 (\%)} = 0,505 \times 0,5 \times \left(\frac{{}^2\text{H señal}_{\text{G4}}}{{}^2\text{H señal}_{\text{DMSO}}} \right) \times \left(\frac{{}^1\text{H señal}_{\text{DMSO}}}{{}^1\text{H señal}_{\text{G4}}} \right)$$

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Análisis de RMN ²H de la PAGN en orina

[0057] Se recuperó el glutamato a partir de fenilacetilglutamato en orina en cantidades que abarcan entre 170 y 500 μmol. Para la espectroscopía de RMN ²H se obtuvieron las anchuras de línea óptimas de la señal con cantidades de glutamato de 300 μmol o inferior (concentración de ~ 0,5 M para nuestros volúmenes de muestra). No había niveles detectables de fenilbutirilglutamato en las muestras tal y como se determina con el análisis de RMN ¹H de fracciones de orina concentradas.

[0058] Después de desalinizar, hidrólisis ácida y cromatografía de intercambio iónico, la muestra se caracterizó mediante señales de RMN ¹H de glutamato y un metabolito desconocido con una resonancia que estaba adyacente al hidrógeno 2 del glutamato (marcado con X en la Figura 2). Para la espectroscopía de RMN ²H, se obtuvieron las anchuras de línea óptimas de la señal del 2H (~ 3 Hz) y la dispersión disolviendo directamente el

glutamato eluido procedente de la columna final de intercambio catiónico (esencialmente mono-amonio de glutamato) en agua y adquiriendo el espectro a 60 °C. En estas condiciones, se resuelven las señales del hidrógeno 3R y 3S, permitiendo el enriquecimiento en ^2H en cada posición proquiral a determinar. Para comprobar que el procedimiento de hidrólisis no alteraba los niveles de enriquecimiento en ^2H de los hidrógenos del glutamilo, se hidrolizaron una serie de patrones de glutamina enriquecidos con $[2,3,3,4,4\text{-}^2\text{H}_5]$ glutamina y el glutamato resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio catiónico y se analizó mediante RMN ^1H y ^2H . Las relaciones medias de la señal de ^2H (en relación a un valor arbitrario para el hidrógeno 2 de 100) fueron de $100 \pm 3,3$ (hidrógeno 3R), $112 \pm 2,8$ (hidrógeno 3S) y $188 \pm 2,3$ (hidrógeno 4), todas dentro del $\sim 10\%$ de la relación teórica 1: 1: 2. Además, las estimaciones del enriquecimiento en ^2H para el hidrógeno 2 obtenido mediante RMN presentaban una correlación excelente con los valores del enriquecimiento real como se muestra en la Figura 3. El enriquecimiento de las otras posiciones también estaban bien correlacionadas con la línea de identidad (hidrógeno 3R; $y = 1,03x + 0,01$, $R^2 = 0,97$; hidrógeno 3S; $y = 0,98x - 0,02$, $R^2 = 0,93$ e hidrógeno 4; $y = 1,13x - 0,01$, $R^2 = 0,96$).

[0059] Estos datos demuestran que:

- 1) la distribución del enriquecimiento posicional en ^2H entre los hidrógenos alifáticos de la glutamina se conserva después de la purificación e hidrólisis, y
- 2) el procedimiento de RMN proporciona una medida exacta y precisa de los valores absolutos del enriquecimiento en ^2H .

[0060] La Figura 3 muestra los espectros de RMN ^1H y ^2H de glutamato preparado a partir de PAGN obtenido de un sujeto humano sano que previamente había ingerido $^2\text{H}_2\text{O}$ y ácido fenilbutírico. La región de 1,5 – 4,0 ppm del espectro que caracteriza a las señales del glutamato presentaba una resonancia única adicional a 3,4 ppm procedente de un compuesto desconocido. La presencia de ambas señales de RMN ^1H y ^2H indica que este sitio estaba enriquecido con ^2H , consistente con un metabolito que hubiese experimentado intercambio con agua corporal enriquecida en ^2H y co-purificada con PAGN y glutamato. Las señales ^2H del glutamato derivadas de la PAGN no presentaban una distribución homogénea del enriquecimiento en ^2H , lo que refleja la especificidad de las reacciones de intercambio que median en la transferencia de ^2H desde agua libre a las diversas posiciones de los hidrógenos del esqueleto de glutamilo. Los enriquecimientos fraccionales en ^2H estimados de cada sitio, mostrados en la Tabla 2, indican que el hidrógeno en posición 2 presentaba los niveles de enriquecimiento más elevados, seguidos por los hidrógenos en los sitios 3R y 3S, con los valores de enriquecimiento más bajos encontrados en los hidrógenos en posición 4. El intervalo de enriquecimientos era sustancialmente inferior al del agua corporal, lo que indica que una fracción significativa de las moléculas de glutamina hepática no habían experimentado intercambio con el agua corporal marcada con ^2H y por tanto no se podían haber originado mediante el ciclo de Krebs, sino que procedían de un reservorio de glutamina metabólicamente inerte.

Tabla 1: Enriquecimiento posicional en ^2H del glutamato obtenido a partir de fenilacetilglutamina en orina para cuatro sujetos sanos mantenidos en ayunas durante toda la noche a los que se les había administrado $^2\text{H}_2\text{O}$ y fenilbutirato durante un ayuno nocturno. También se muestra el enriquecimiento en ^2H del agua corporal.

Sujeto	Enriquecimiento en el hidrógeno 2 de la PAGN (%)	Enriquecimiento en el hidrógeno 3S de la PAGN (%)	Enriquecimiento en el hidrógeno 3R de la PAGN (%)	Enriquecimiento en el hidrógeno 4 de la PAGN (%)	Agua corporal (%)
1	0,25	0,20	0,21	0,14	0,47
2	0,44	0,39	0,42	0,25	0,67
3	0,35	0,25	0,25	0,16	0,51
4	0,35	0,27	0,27	0,17	0,57
5	0,32	0,23	0,23	0,16	0,40
6	0,30	0,26	0,24	0,18	0,42
7	0,32	0,30	0,29	0,19	0,41
8	0,28	0,23	0,23	0,15	0,44
Media	0,33*	0,27	0,27	0,17	0,49
DEM	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03

* Significativamente superiores a los enriquecimientos H3S y H3R ($p < 0,05$, prueba t de Student apareada)

Tabla 2: Fuentes de glutamina hepática procedentes del flujo cataplerótico del ciclo de Krebs y de la proteólisis estimadas a partir de los enriquecimientos fraccionales en ^2H en las posiciones 2 y 3R,S en relación a la del agua

corporal. También se muestra la fracción de aminoácidos proteolíticos que participaron en el intercambio con la transaminasa antes de la conversión a glutamina. Por definición, las moléculas de glutamina procedentes del ciclo de Krebs presentarán la incorporación completa de deuterio procedente del agua corporal en posición 2 (es decir, equivalente a un intercambio del 100 %).

5

ID	Fuentes de carbono de la glutamina		Intercambio a través de la transaminasa	
	Ciclo de Krebs	Proteólisis	Fuentes del ciclo de Krebs	Fuentes proteolíticas
1	44	56	100	17
2	60	40	100	17
3	49	51	100	38
4	47	53	100	27
5	58	43	100	53
6	60	40	100	29
7	72	28	100	22
8	52	48	100	24
Media	55	45	100	28
DEM	3	3		4

1.4 DISCUSIÓN

1.4.1 Consideraciones analíticas

10

[0061] Los inventores han demostrado que el enriquecimiento posicional en ^2H de la glutamina hepática humana a partir de agua corporal enriquecida en ^2H se puede medir mediante RMN ^2H siguiendo un procedimiento de purificación relativamente simple.

15

[0062] En principio, el análisis se puede aplicar directamente a PAGN puesto que esta molécula presenta desplazamientos químicos bien resueltos para los hidrógenos del esqueleto de glutamilo. En la práctica, a los inventores les resultó difícil purificar la PAGN con un grado suficiente para evitar la contaminación con otros metabolitos de la orina mediante procedimientos de SPE simples. Además, una porción de la PAGN puede sufrir isomerización para formar fenilacetilisoglutamina durante el secado de la muestra lo que da como resultado una mezcla de dos componentes y la dispersión de las señales de RMN. Por último, con la utilización de ácido fenilbutírico como agente para la biopsia del metabolito, siempre existe la posibilidad de que se pudiera producir fenilbutirilglutamina además de PAGN, potencialmente incrementando de nuevo la complejidad del espectro de RMN. La hidrólisis de PAGN (o fenilbutirilglutamina) purificada por SPE seguido del aislamiento del producto glutamato mediante intercambio catiónico reduce enormemente las contribuciones de fondo de otros metabolitos de la orina y genera un único analito con un buen rendimiento. Además, el glutamato recuperado se puede analizar directamente mediante RMN en forma de disolución acuosa sin necesidad de ajuste del pH u otras manipulaciones aparte de la adición de un patrón interno.

20

25

1.4.2 Fuentes intrahepáticas frente a fuentes extrahepáticas de la PAGN

30

[0063] La glutamina que se recluta para la síntesis de la PAGN puede tener su origen tanto en fuentes hepáticas como en fuentes extrahepáticas. Existen evidencias de que el reservorio de glutamina hepática recibe una contribución significativa de fuentes periféricas y se intercambia relativamente bien con la glutamina plasmática. Los marcadores metabolizados profusamente por el músculo esquelético, tales como el $[2-^{14}\text{C}]$ acetato, se recuperan en la glutamina obtenida de muestras del hígado. Con los marcadores metabolizados preferentemente por el ciclo de Krebs hepático tales como el $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ propionato y el $[3-^{14}\text{C}]$ lactato, el enriquecimiento en ^{13}C de la glutamina hepática o la actividad específica del ^{14}C es sustancialmente inferior a la de otros productos anapleróticos tales como la glucosa-6-fosfato. Esto es consistente con la dilución de la glutamina marcada procedente del ciclo de Krebs hepático por glutamina sin marcar procedente de fuentes periféricas.

35

40

1.4.3 Enriquecimiento en ^2H de la glutamina a partir de $^2\text{H}_2\text{O}$

45

[0064] La Figura 1 muestra las etapas metabólicas que están involucradas en la transferencia del enriquecimiento en ^2H desde el agua corporal enriquecida en ^2H a los cinco hidrógenos alifáticos de la glutamina. El enriquecimiento del hidrógeno 2 se consigue con la conversión del α -cetoglutarato en glutamato. Esto puede estar catalizado mediante la glutamato deshidrogenasa, o alternativamente, cualquier transaminasa que utilice α -cetoglutarato como receptor de amina tal como alanina aminotransferasa o aspartato aminotransferasa. En todos los

casos, se asume que la incorporación de agua corporal en posición 2 es cuantitativa puesto que existe un intercambio esencialmente total entre el precursor de hidrógeno NADH y el del agua libre (en el caso de la glutamato deshidrogenasa) y los compuestos intermedios piridoxal aldimina / ketimina y el agua libre (en el caso de las transaminasas). Como consecuencia, se puede asumir que el nivel de enriquecimiento en ^2H en posición 2 refleja las moléculas glutamina originadas a partir de α -cetoglutarato y a partir de moléculas de glutamato que hayan participado en el intercambio de glutamato- α -cetoglutarato.

[0065] Para enriquecer una molécula de glutamina en los hidrógenos en posición 3, su esqueleto carbonado se tiene que haber originado a partir de α -cetoglutarato generado a partir de citrato mediante el ciclo de Krebs o mediante la aconitasa citosólica y la isocitrato deshidrogenasa. El hidrógeno 3R se incorpora durante la conversión de citrato en isocitrato, catalizada por la aconitasa. El hidrógeno 3S se incorpora después de la conversión de isocitrato en α -cetoglutarato mediante la adición de protones al compuesto intermedio transitorio oxalosuccinato. Durante una vuelta completa del ciclo de Krebs, ambos sitios se enriquecen con agua corporal dando como resultado el enriquecimiento equivalente de las posiciones 3R y 3S. Cuando en el citosol están presentes las actividades aconitasa e isocitrato deshidrogenasa y, en principio, se podría producir el enriquecimiento de estos sitios independientemente del metabolismo mitocondrial, el rápido equilibrio de los reservorios de metabolitos citosólicos y mitocondriales a través del transporte de citrato y de las lanzaderas malato-aspartato aseguran que los reservorios de α -cetoglutarato citosólico y mitocondrial se enriquezcan de manera equivalente a partir de agua corporal ^2H en condiciones estacionarias.

[0066] El carbono en posición 4 de una fracción glutamilo procedente del ciclo de Krebs se origina a partir del carbono metílico del acetil-CoA. Se ha demostrado que los hidrógenos metílicos del acetil-CoA se intercambian parcialmente con los del agua corporal, como se observa por la pérdida parcial de deuterio siguiendo el metabolismo del $[2-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}_3]$ acetato en glutamato y glutamina. Además, los precursores de los hidrógenos metílicos del acetil-CoA tales como los hidrógenos metílicos del piruvato también se intercambian de manera profusa con los del agua corporal. No obstante, a diferencia de las reacciones de la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa, la incorporación de hidrógenos de agua corporal en el sitio metilo del acetil-CoA no es obligatoria.

1.4.4 Niveles de enriquecimiento en ^2H en la PAGN y fuentes de esqueletos carbonados de glutamilo

[0067] En el contexto del enriquecimiento a partir de agua corporal enriquecida en ^2H , se puede considerar que la fracción glutamilo de la PAGN procede de tres fuentes distintas. Éstas incluyen:

- 1) la liberación directa de glutamina a partir de la degradación de proteínas;
- 2) aminación del glutamato producido por la degradación de proteínas (glutamato que se libera directamente además del glutamato producido en el catabolismo de la histidina, prolina y asparagina); y
- 3) aminación de una molécula de glutamato procedente del ciclo de Krebs mediante cataplerosis.

[0068] Los esqueletos carbonados de la glutamina procedentes del ciclo de Krebs estarán enriquecidos tanto en hidrógenos 3R como 3S, mientras que los derivados de la degradación de proteínas, ya sea en forma de glutamina o glutamato, no estarán enriquecidos en estos sitios. Por tanto, el enriquecimiento de glutamina 3R o 3S en relación a la del agua corporal es equivalente a la fracción de glutamina procedente del ciclo de Krebs. En la medida en que la glutamina o el glutamato derivados de las proteínas experimenten un intercambio con el α -cetoglutarato del ciclo de Krebs, enriqueciéndose así en posición 3, la fracción de glutamina procedente del ciclo de Krebs se sobrestimarán y, en consecuencia, se subestimarán la fracción procedente de la degradación de proteínas. En este estudio, el enriquecimiento de los sitios 3R,S en relación al enriquecimiento del agua corporal fue del $\sim 55\%$, lo que indica que la mitad de las fracciones de glutamilo de la PAGN procedían de fuentes catapleróticas y la otra mitad de la degradación de proteínas. En un estudio de Kuhn y col. (1999) Am J. Clin. Nutr. 70 p 484 – 489) se valoró la tasa de aparición de glutamina proteolítica midiendo la renovación total de proteínas mediante la $[1-^{13}\text{C}]$ leucina y multiplicando esto por la fracción de restos de glutamina en la proteína. Esta tasa representaba el $\sim 14\%$ de la R_a de la glutamina de todo el cuerpo, lo que indica que la proteólisis supone el 14% y la síntesis de novo supone el 86% de la R_a de la glutamina. En este análisis, la síntesis de novo incluye la glutamina sintetizada a partir de glutamato cataplerótico y proteolítico. Puesto que la fracción de restos glutamato en la proteína es ~ 4 veces la de la glutamina, la liberación de un equivalente de glutamina mediante proteólisis está acompañada por cuatro de glutamato. Si este glutamato se convirtiese cuantitativamente en glutamina, supondría el $\sim 56\%$ de la R_a de la glutamina. Por tanto, la máxima contribución de esqueletos carbonados proteolíticos (glutamato + glutamato) a la R_a de la glutamina sería del $\sim 70\%$. La contribución del 45% de estas fuentes a la PAGN determinada a partir de la medición de la relación de hidrógeno 3 / enriquecimiento en ^2H del agua corporal puede reflejar la utilización de glutamato proteolítico a través de otras vías, y / o el intercambio parcial de glutamato proteolítico con metabolitos del

ciclo de Krebs.

[0069] El enriquecimiento de la glutamina en posición 2 tiene su origen durante la conversión de α -cetoglutarato en glutamato y se puede catalizar mediante la glutamato deshidrogenasa y diversas transaminasas que acoplan el glutamato / α -cetoglutarato con otros aminoácidos y sus equivalentes cetoácidos. Por tanto, las moléculas de glutamina cuyos esqueletos carbonados proceden del ciclo de Krebs estarán enriquecidas en esta posición, así como en posición 3. La observación por parte de los inventores de que el enriquecimiento de la posición 2 era significativamente superior que la de la posición 3 se explica mejor por la participación de glutamato sin marcar en el intercambio con las transaminasas antes de ser convertido en glutamina. Además, este intercambio debe haber involucrado reservorios de α -cetoácidos que se encontraban aislados de los metabolitos del ciclo de Krebs, ya que de otra forma no habría enriquecimiento selectivo de la posición 2. Por tanto, los inventores creen que los reservorios de α -cetoácidos catalíticos asociados a las transaminasas citosólicas podrían proporcionar la oportunidad de un intercambio rápido de glutamato / α -cetoglutarato sin mezclarse con moléculas de α -cetoglutarato procedentes del ciclo de Krebs. A partir de la diferencia en el enriquecimiento entre las posiciones 2 y 3 de la glutamina hepática, se estima que el 23 % de los precursores de aminoácidos proteolíticos participaron en el intercambio con las transaminasas antes de la conversión en glutamina. Dado que el hidrógeno 2 se enriquece independientemente del flujo cataplerótico del ciclo de Krebs, su enriquecimiento sobrestimaré la fracción de glutamato procedente de la cataplerosis.

20 1.4.5 Enriquecimiento de acetil-CoA a partir de agua corporal enriquecida en ^2H

[0070] El carbono 4 del glutamato y su par de hidrógenos proceden del carbono metílico y los hidrógenos del acetil-CoA, un producto habitual de la oxidación del piruvato y ácidos grasos. La incorporación de acetil-CoA al citrato a través de la citrato sintasa está acompañada por la pérdida de uno de los hidrógenos metílicos. Los dos hidrógenos restantes unidos al carbono no participan en ninguna de las reacciones que transforman el citrato en glutamina. En la medida en que estos hidrógenos no se intercambien con los del agua corporal durante la conversión del citrato en α -cetoglutarato y glutamato, el enriquecimiento de la posición 4 refleja el enriquecimiento de las moléculas de acetil-CoA que entran en el ciclo de Krebs. El grado de enriquecimiento del acetil-CoA se puede determinar comparando los enriquecimientos relativos de la posición 4 y la posición 3, puesto que por cada molécula de α -cetoglutarato que procede del ciclo de Krebs, los hidrógenos en posición 3 se intercambian completamente con los del agua corporal. A partir de los niveles de enriquecimiento posicional de la PAGN presentados en la tabla 1, la relación media de los enriquecimientos en ^2H de la posición 4 a la posición 3 fue de 0,66, lo que indica que el intercambio entre los hidrógenos metílicos del acetil-CoA que se introducen en el ciclo de Krebs y el agua corporal se completó en un 66 %. Este valor puede reflejar una contribución ponderada del acetil-CoA a partir del piruvato, mediante la piruvato deshidrogenasa, y a partir de fuentes acilo que incluyen β -oxidación. Los hidrógenos metílicos del acetil-CoA procedentes del piruvato se espera que se intercambien de manera cuantitativa con los del agua como resultado de la actividad alanina aminotransferasa. Para el acetil-CoA procedente de la β -oxidación de ácidos grasos, se desconoce el grado de enriquecimiento en hidrógenos metílicos procedentes del agua corporal enriquecida en ^2H , pero es probable que sea inferior al del piruvato. La secuencia de β -oxidación supone la incorporación de 2 hidrógenos del agua por molécula de acetil-CoA liberada (hidratación de trans- Δ^2 -enoil-CoA por la S-3-hidroxiacil-CoA hidrolasa y escisión del acetil-CoA del 3-cetoacil-CoA por la 3-cetotiolasa), dando un valor de enriquecimiento teórico del 66 % del enriquecimiento del agua corporal. Los intercambios a través del tautomerismo ceto-enólico de los compuestos intermedios de la β -oxidación pueden contribuir a un enriquecimiento adicional. En ayunas, la β -oxidación supone la mayoría de producción de acetil-CoA en el hígado y también en la mayoría de los tejidos periféricos, incluyendo el músculo esquelético. Debido a esto, es probable que la mayoría de los hidrógenos en posición 4 de la PAGN originados en la β -oxidación con la oxidación de piruvato supongan una fracción mínima.

1.4.6 Producción de glutamina en todo el cuerpo y gluconeogénesis hepática

[0071] Para sujetos en estado post-absortivo sanos, la R_a de la glutamina es de 4,5 – 6,0 $\mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$. En comparación, el flujo gluconeogénico es de $\sim 5,0 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$ (10 $\mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$ de equivalentes de triosa-P) del cual el 90 %, o $\sim 9 \mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$, se obtiene mediante las vías anapleróticas del ciclo de Krebs. Por lo tanto, potencialmente la glutamina podría proporcionar hasta 2 / 3 de carbonos anapleróticos para la gluconeogénesis. En sujetos sanos infundidos con glutamina enriquecida en ^{13}C , se estima que la contribución de la glutamina a la producción de glucosa endógena fue del 8 % después de 18 horas de ayuno, incrementándose hasta el 16 % después de 42 horas de ayuno. En la medida en que el marcador del ^{13}C se diluya como resultado de los intercambios a nivel del ciclo de Krebs hepático y los reservorios de aminoácidos, es probable que estos valores subestimen la contribución real de la glutamina a la gluconeogénesis. La R_a de la glutamina se incrementa significativamente en varios tipos de enfermedades críticas. En sujetos infectados con el VIH, el deterioro muscular está asociado a un incremento del $\sim 50 \%$ en la R_a de la glutamina. Durante la sepsis, se produce un aumento del efluvio de glutamina desde el músculo esquelético que está asociado a una pérdida neta de proteínas. Las enfermedades críticas también se caracterizan por hiperglicemia y una actividad gluconeogénica incrementada. En

pacientes con cáncer de pulmón que experimentan una pérdida de masa corporal magra, tanto la producción de glucosa endógena como la gluconeogénesis a partir de alanina se encontraban significativamente elevadas en comparación con pacientes con cáncer de pulmón que tenían un peso estable. Los sujetos resistentes a insulina que no tienen una enfermedad crítica también pueden presentar una disponibilidad de aminoácidos incrementada para la gluconeogénesis debido a una estimulación de la síntesis de proteínas afectada por la insulina.

1.4.7 Observaciones finales

[0072] Estos estudios demuestran que los procedimientos del primer aspecto de la invención se pueden aprovechar para proporcionar información útil relativa a los orígenes de la glutamina y el glutamato en sujetos sanos o en estado patológico.

[0073] Los datos destacan el importante papel de los aminoácidos gluconeogénicos procedentes de tejidos periféricos sobre el metabolismo de la glucosa hepática en un espectro de dolencias patológicas.

[0074] En conclusión, los procedimientos de la invención presentan un procedimiento simple y no invasivo para resolver las contribuciones de las actividades metabólicas y proteolíticas en todo el cuerpo al suministro de esqueletos carbonados de la glutamina hepática basados en la ingestión de $^2\text{H}_2\text{O}$ y fenilbutirato seguido del análisis de la PAGN en orina. Este análisis permite una mejor definición del papel del metabolismo de los compuestos intermedios periféricos y la síntesis / degradación de proteínas sobre las fuentes de los carbonos de la glutamina hepática. La recuperación de PAGN y el análisis se puede integrar con las mediciones de $^2\text{H}_2\text{O}$ de gluconeogénesis hepática. Por tanto, los procedimientos de la invención permiten que se pueda explorar la relación entre las fuentes de glutamina hepática y la actividad gluconeogénica en una variedad de configuraciones fisiológicas y patofisiológicas.

EJEMPLO 2

[0075] Los inventores realizaron experimentos adicionales para demostrar la utilidad de los procedimientos de la invención.

[0076] Se aprovecharon los procedimientos empleados en el Ejemplo 1, a menos que se especifique lo contrario.

[0077] La glutamina procedente de tejidos periféricos es un sustrato eficaz para la gluconeogénesis hepática. La glutamina se puede liberar durante la fase proteolítica de la renovación de proteínas o se puede originar en el ciclo de Krebs mediante cataplerosis (Figura 4). En la medida en que los estados patofisiológicos, tales como la resistencia a la insulina, modifican la cinética de proteínas en todo el cuerpo, la disponibilidad de glutamina procedente de la proteólisis puede estar alterada. Asimismo, cambios en el flujo cataplerótico de los tejidos periféricos también pueden influir en la disponibilidad de la glutamina para la gluconeogénesis hepática. La disponibilidad de la glutamina en todo el cuerpo se puede determinar mediante mediciones con dilución de isótopos, pero este procedimiento no resuelve las contribuciones catapleróticas y proteolíticas.

[0078] Los inventores resolvieron las contribuciones catapleróticas y proteolíticas a la glutamina hepática mediante el análisis del enriquecimiento en ^2H de la glutamina a partir de $^2\text{H}_2\text{O}$. La glutamina procedente del ciclo de Krebs está enriquecida en los hidrógenos en posición 3 (H3) mientras que la glutamina obtenida mediante proteólisis, o sintetizada a partir de glutamato obtenido proteolíticamente, no está enriquecida en estos sitios. Por tanto, la fracción de glutamina hepática procedente de fuentes catapleróticas es igual a H3 dividido por el enriquecimiento del agua corporal (AC). La glutamina hepática se puede obtener de forma no invasiva como fenilacetilglutamina (PAGN) en orina mediante la ingestión de ácido fenilbutírico.

[0079] Cuatro sujetos sanos ingirieron $^2\text{H}_2\text{O}$ al $0,56 \pm 0,08$ % de AC durante la noche en ayunas. A las 06:00 h, tomaron 300 mg de ácido fenilbutírico en una cápsula de gelatina. Se recogió la orina entre las 08:00 – 10:00 y el AC se sometió a ensayo directamente mediante RMN ^2H . La PAGN en orina se purificó mediante extracción en fase sólida, se hidrolizó en glutamato, y se analizó mediante RMN ^2H para obtener los valores de enriquecimiento en H3 (como se ha descrito previamente). El porcentaje de glutamina hepática procedente de la cataplerosis se estimó como $100 \times (\text{H3} / \text{AC})$, siendo el resto la contribución proteolítica. Los datos se presentan como media \pm D.E.

[0080] A partir del espectro RMN ^2H del glutamato, se estimó que H3 era el $0,29 \pm 0,09$ %. A partir de la relación H3 / AC, la contribución cataplerótica a la glutamina hepática fue del 51 ± 9 % con fuentes proteolíticas que contribuyen en un 49 ± 9 %. Por lo tanto, en sujetos sanos mantenidos en ayunas durante toda la noche, las fuentes catapleróticas y proteolíticas contribuyen de la misma manera al reservorio de glutamina hepática.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para distinguir entre la glutamina formada por cataplerosis o proteólisis en un sujeto, que comprende someter a ensayo una muestra corporal del sujeto para glutamina deuterada
5
- en donde la muestra corporal procede de un sujeto al que se le ha administrado agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$) y que ha sido tratado con un agente que promueve la excreción de glutamina del sujeto; y
- en donde las contribuciones catapleróticas y proteolíticas a la formación de glutamina se cuantifican analizando el
10 enriquecimiento en ^2H de la glutamina, indicando así las proporciones de glutamina en la muestra corporal formada a partir de la cataplerosis y de la proteólisis.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2 en donde la muestra corporal es una muestra de orina.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en donde el agente promueve la excreción de glutamina en orina.
- 20 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en donde el agente incluye una fracción fenilacetilo.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en donde el agente es uno comprendido entre: aspartamo, fenilacetato sódico o fenilbutirato sódico.
- 25 7. El procedimiento según las reivindicaciones 4 o 5 en donde el agente y la glutamina se combinan para formar una fenilacetilglutamina (PAGN).
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en donde la muestra de orina se procesa adicionalmente para liberar glutamina o glutamato.
30
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la muestra se somete a ensayo llevando a cabo resonancia magnética nuclear de ^2H para identificar la glutamina deuterada o uno de sus derivados deuterados.
- 35 10. El uso de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9 para evaluar el estado de salud de un sujeto.
11. El uso según la reivindicación 10, en donde el sujeto es sospechoso de padecer una enfermedad crítica que está al menos parcialmente **caracterizada por** una proteólisis incrementada.
40
12. El uso según la reivindicación 10, donde el sujeto presenta, o es sospechoso de desarrollar, deterioro muscular.
13. El uso según la reivindicación 10, en donde el sujeto es sospechoso de padecer una enfermedad crítica que está al menos parcialmente **caracterizada por** una cataplerosis anormal.
45
14. Un procedimiento de selección de un compuesto para establecer si el compuesto es proteolítico o anabólico que comprende someter a ensayo una muestra corporal procedente de un sujeto para glutamina deuterada;
50
- en donde la muestra corporal procede de un sujeto al que se le ha administrado agua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$), ha sido tratado con un agente que promueve la excreción de glutamina del sujeto, y ha sido tratado con el compuesto; y
- en donde, cuando se compara con un control, un incremento en la proporción de glutamina deuterada indica que el
55 compuesto es anabólico o reduce la proteólisis y una reducción en la proporción de glutamina deuterada indica que el compuesto promueve la proteólisis.
15. El procedimiento según la reivindicación 14, en donde el compuesto es un candidato a producto farmacéutico.
60

FIGURA 1

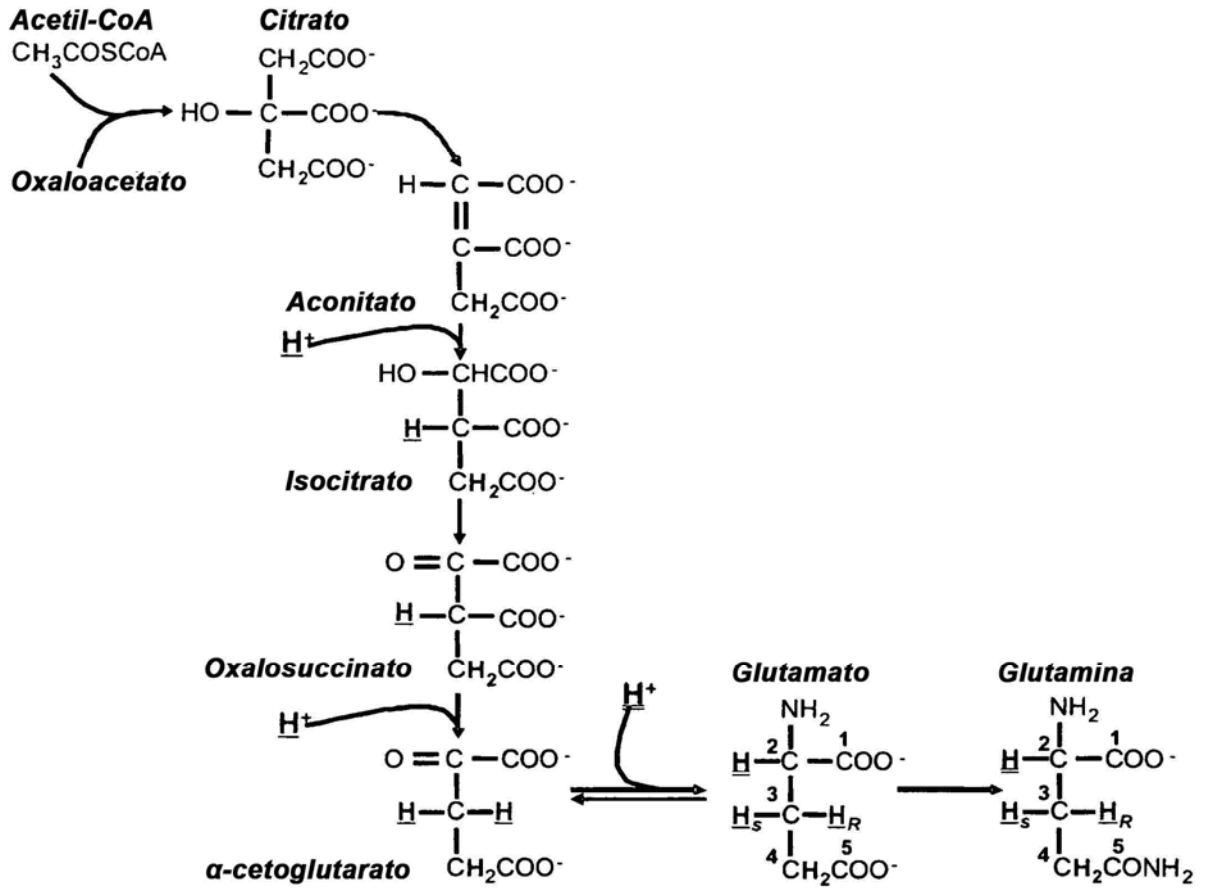


FIGURA 2

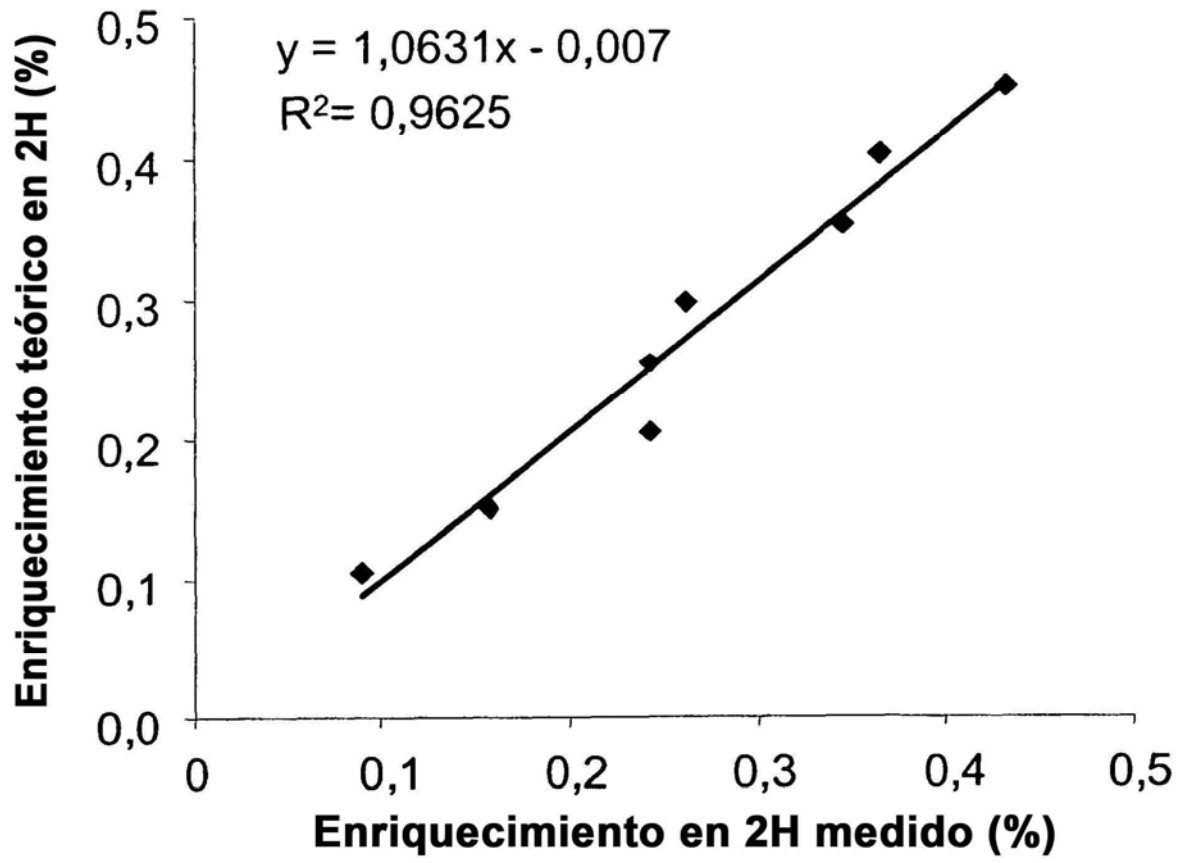


FIGURA 3

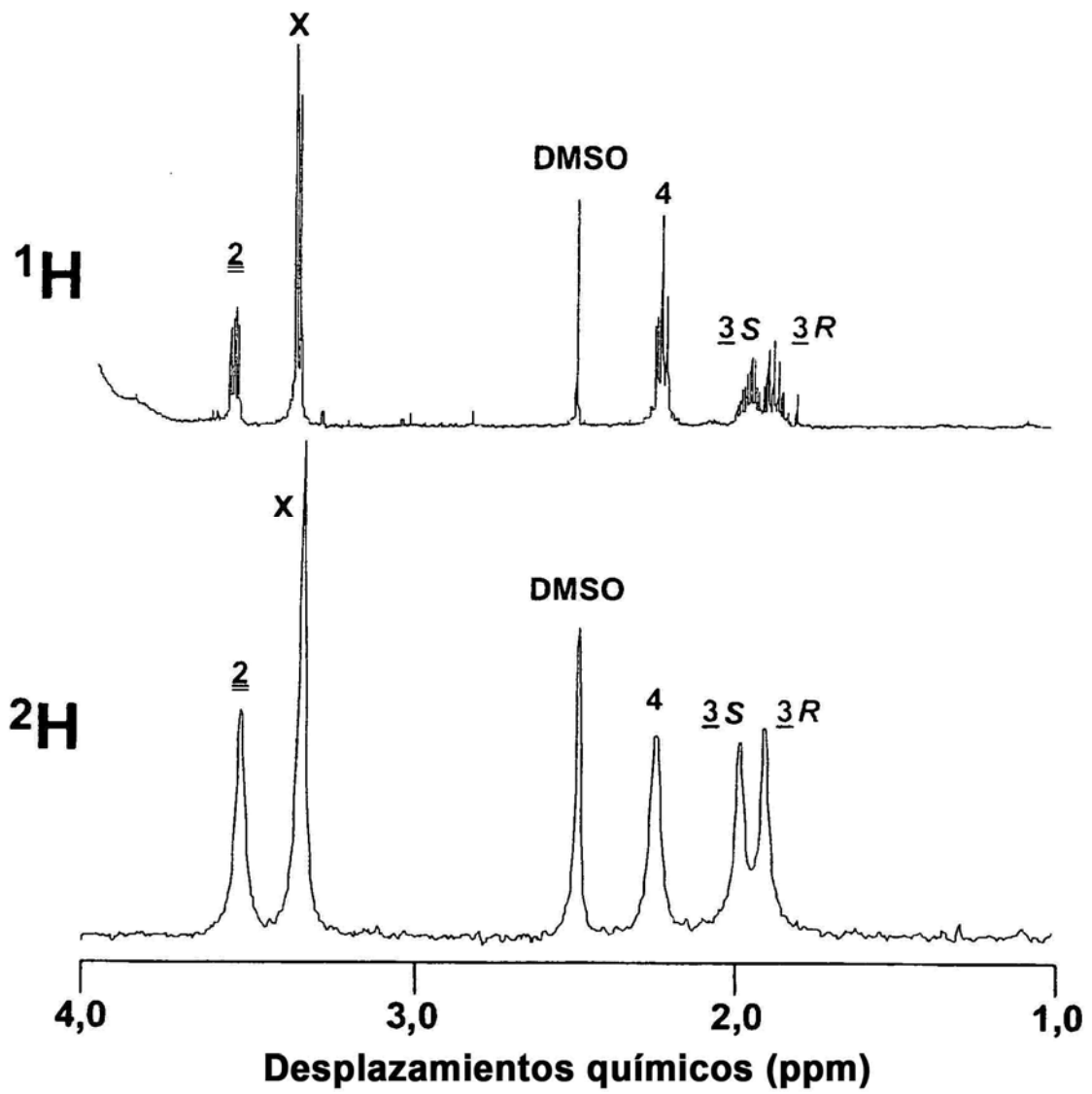


FIGURA 4

