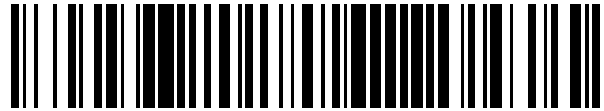


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 267**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09812381 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2334813**

54 Título: **Método para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con RyR1**

30 Prioridad:

08.09.2008 US 95055 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2014

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
1401 Rockville Pike Suite 600
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**BINA, SAID y
BUNGER, ROLF**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 511 267 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

Método para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con RyR1.

- 5 [0001] La presente invención surgió en parte de la investigación financiada por los números de subvención R080BS, R080DN y R080DS. El gobierno puede tener ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

- 10 [0002] En el músculo esquelético, el acoplamiento excitación-contracción implica una interacción física entre dos diferentes tipos de canales de Ca^{2+} : los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de receptores de dihidropiridina (DHPRs) localizados en el sarcolema y los canales de liberación de Ca^{2+} intracelular del receptor de rianodina tipo 1 (RyR1) localizados en la membrana del retículo sarcoplásmico (SR). En respuesta a la despolarización sarcolemal, los DHPRs sufren un cambio conformacional que activa los RyR1 cercanos. La liberación masiva posterior de Ca^{2+} del SR en el mioplasma activa la maquinaria contráctil. La interacción mecánica DHPR-RyR1 es bidireccional dado que las proteínas de RyR1 mejoran espectacularmente la capacidad de los DHPR para funcionar de forma eficaz como un canal de iones conductor de Ca^{2+} (Nakai *et al.*, Nature 380:72-75 (1996); Dulhunty *et al.*, Prog. Biophys. Mol. Biol. 79:45-75 (2000)).

- 20 [0003] La relajación requiere la reabsorción dependiente de ATP de Ca^{2+} citosólico en el SR o la eliminación de Ca^{2+} en el espacio extracelular por la bomba de Ca^{2+} sarcolemal. Debido a que los gradientes de Ca^{2+} a través de las membranas celulares y del SR son del orden de cuatro magnitudes, las células gastan una cantidad enorme de energía para devolver los elevados niveles de Ca^{2+} citoplásmico a niveles fisiológicos basales, es decir, para mantener el control de Ca^{2+} y la homeostasis. Este esfuerzo energético se puede revelar y cuantificar midiendo la producción de los catabolitos del ATP adenosina e inosina (Bünger, R. In: Topics and perspectives in adenosine research, pp. 223-235 (1987); Bünger, R. and S. Soboll, Eur J. Biochem 159: 203-13 (1986)), incluso cuando se usa un modelo de célula no contráctil tal como los linfocitos en una configuración *in vitro*.

- 30 [0004] Se conocen cuatro trastornos musculares y hereditarios humanos clínicamente diferentes por estar asociados a mutaciones puntuales y deleciones en el gen RyR1: hipertermia maligna (MH), enfermedad del núcleo central (CCD), enfermedad multiminicore (MmD) y miopatía de bastones nemalínica (NM) (Jurkat-Rott, *et al.*, J. Neurol. 249:1493-1502 (2002); Taratuto AL. Curr Opin. Neurol. 15:553-561 (2002)). Además, los síndromes musculares inducidos por calor, ejercicio y tensión pueden estar relacionados con defectos de RyR1 hasta cierto punto.

- 35 [0005] La hipertermia maligna (MH) es un síndrome farmacogenético del músculo esquelético cuyo síntoma principal es una respuesta anormal a los anestésicos volátiles y a los relajantes despolarizantes del músculo esquelético. La exposición a estos agentes durante la cirugía puede desencadenar una liberación descontrolada de Ca^{2+} desde el SR principalmente a través de un gen RyR1 mutado que lleva a sensibilidad anormal del receptor de RyR1. La carga intracelular aumentada de Ca^{2+} desencadena una cascada de eventos bioquímicos que produce rigidez muscular, rabdomiólisis, arritmia cardíaca, acidosis y, finalmente, hipertermia letal. Si no se trata rápidamente mediante la retirada de la anestesia y se administra dantroleno (un bloqueador de calcio intracelular), el único medicamento disponible para el tratamiento de un episodio de MH, la mortalidad es extremadamente alta (>80%). Síntomas de la MH iniciales pueden tener una aparición lenta, clínicamente ambigua, que hacen difícil reconocer un inminente episodio de MH. El calor, la tensión y el ejercicio son otras condiciones que pueden inducir los síntomas de tipo MH.

- 45 [0006] Actualmente, el diagnóstico definitivo de MH se hace mediante la prueba de contractura con halotano-cafeína (CHCT) invasiva que requiere cirugía en Norteamérica, mediante una prueba de contractura *in vitro* similar (IVCT) en Europa y por una liberación de calcio inducida por calcio técnicamente muy difícil (CICR) en Japón; todas estas pruebas usan músculo de la pierna biopsiada (*Vastus lateralis*). Otros países usan pruebas esencialmente similares a una de estas pruebas. La CHCT tiene una sensibilidad del 97% (con precisión detecta individuos susceptibles de MH) con una especificidad de sólo el 78% (produce un 22% de falsos positivos). No obstante, debido a la cirugía invasiva, los costes de la prueba y la viabilidad limitada de las muestras de músculo esquelético biopsiado, la CHCT se debe completar dentro de las 5 horas posteriores a la biopsia. Por lo tanto, las biopsias musculares se deben realizar en un centro de diagnóstico para MH certificado o en hospitales cercanos (actualmente sólo hay 6 centros de diagnóstico para MH en Estados Unidos). Debido a estas complejidades logísticas y de procedimiento, se estima que sólo aproximadamente el 10% de los individuos elegibles para someterse a la prueba de CHCT se realizan la prueba (estimado a partir de las referencias de la línea de asistencia para la hipertermia maligna en EE.UU.).

- 60 [0007] La enfermedad del núcleo central (CCD) (también llamada síndrome de Shy-Magee) es una miopatía hereditaria caracterizada por debilidad de músculo proximal y deformaciones esqueléticas de los miembros inferiores (Taratuto AL. Curr Opin Neurol 15:553-561(2002)). El diagnóstico de la CCD se establece a través de la identificación histológica de amplias zonas amorfas únicas de actividad enzimática oxidativa reducida en regiones periféricas o centrales de las fibras musculares de tipo I (es decir, núcleos centrales). No obstante, en algunos individuos con CCD, los núcleos no están localizados centralmente, sino que se encuentran en regiones periféricas de la fibra muscular. Además, los niveles de Ca^{2+} en reposo aparentemente no se elevan por mutaciones de CCD que provocan el acoplamiento excitación-

contracción, indicando que una elevación del Ca^{2+} en reposo no es un requisito en absoluto para la formación de núcleo (Avila *et al.*, J. Gen. Physiol. 118:277-290 (2001); Avila *et al.*, J. Gen. Physiol. 121:277-286 (2003)).

5 [0008] Variantes específicas de la enfermedad multiminicore (MmD) (Ferreiro *et al.*, Ann. Neurol. 51:750-759 (2002); Jungbluth *et al.*, Eurology, 59:284-287(2002)) y la miopatía de bastones nemalínica (NM) (Scacheri *et al.*, Neurology 55:1689-1696 (2000)) han mostrado recientemente que también están asociadas a mutaciones en el gen RyR1. Las biopsias de músculo esquelético de pacientes que sufren MmD muestran lesiones multifocales, mal circunscritas y de tipo núcleo corto, mientras que el músculo esquelético obtenido de individuos con NM muestra estructuras en forma de bastón cuando se visualizan utilizando la tinción con tricromo de Gomori tanto en las fibras de músculo esquelético tipo I como II.

10 [0009] Existe una coincidencia clínica significativa entre estos trastornos musculares relacionados. Por ejemplo, la CCD en fase temprana puede presentarse primero como una miopatía minicore (Ferreiro *et al.*, Ann. Neurol. 51:750-75 (2002), se han encontrado bastones nemalínicos adyacentes a los núcleos centrales en biopsias de algunos pacientes con CCD (Scacheri *et al.*, Neurology 55:1689-1696 (2000)), y pacientes con CCD se encuentra frecuentemente que son susceptibles de MH (MHS), pero los pacientes MHS es improbable que sean CCD.

15 [0010] Yoshitatsu Sei *et al.* (ANESTHESIOLOGY. vol. 97, no. 5, noviembre 2002, páginas 1052 - 1058) demostraron que los pacientes con hipertermia maligna tienen un mecanismo de control del calcio alterado en los linfocitos B. Leslie C. McKinney *et al.* (ANESTHESIOLOGY. vol. 104, no. 6, junio 2006, páginas 1191 - 1201) describen la caracterización de la liberación de calcio mediada por el receptor de rianodina en células B humanas. Saiid Bina *et al.* (FASEB J. 42 (Meeting Abstract Supplement) 991.2, 1 abril 2009) revelan que la adenosina indexa la sobrecarga de calcio inducida por un agonista de RyR1 en los linfocitos de pacientes susceptible (MHS) de hipertermia maligna (MH). Saiid Bina *et al.* (ANESTHESIOLOGY IN AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS, Annual Meeting Abstract vol. 109, 20 de octubre de 2008, página A879) divulgan una prueba diagnóstica *in vitro* mínimamente invasiva nueva para la hipertermia maligna en humanos.

20 [0011] Lo que hace falta es un método menos complejo, que dure menos, que sea menos invasivo y más económico para hacer pruebas de enfermedades relacionadas con el RyR1.

25 Resumen de la invención

[0012] Un aspecto de la presente invención se refiere a métodos para diagnosticar enfermedades relacionadas con el canal del calcio que son enfermedades relacionadas con el RyR1 en un sujeto. Por consiguiente, la invención se refiere a un método para detectar una enfermedad relacionada con el canal del calcio en un sujeto que comprende: (a) poner en contacto los linfocitos aislados del sujeto con agonista del canal de calcio, (b) medir la adenosina y la inosina producida por los linfocitos y (c) comparar los niveles medidos en la muestra con los niveles de adenosina y de inosina de un control normal, donde un aumento de los niveles de adenosina y de inosina con respecto al control es indicativo de una enfermedad relacionada con el canal del calcio.

35 [0013] La enfermedad relacionada con el canal del calcio es una enfermedad relacionada con RyR1 y el agonista del canal de calcio es un agonista de RyR1. La enfermedad relacionada con RyR1 es hipertermia maligna, enfermedad del núcleo central, enfermedad multiminicore o miopatía de bastones nemalínica. El agonista de RyR1 es 4-cloro-m-cresol, rianodina, halotano, tiopental, cafeína. En una forma de realización alternativa, el agonista de RyR1 es 4-cloro-m-cresol.

40 [0014] En una forma de realización, los linfocitos están en una muestra de sangre del sujeto. En una forma de realización alternativa, los linfocitos son linfocitos de la sangre periférica.

45 [0015] En otra forma de realización, el control normal comprende niveles de adenosina e inosina producidos por los linfocitos de un sujeto que no sufre una enfermedad relacionada con el RyR1 y el control nominal comprende niveles de adenosina e inosina producidos por los linfocitos de un sujeto que no sufre una enfermedad relacionada con el RyR1.

50 [0016] En los métodos de la invención, un aumento de los niveles de adenosina y de inosina con respecto al control es también indicativo de una eliminación o mutación en el gen RyR1. Así, en una forma de realización, la eliminación o mutación en el gen RyR1 es indicativo de un trastorno relacionado con el músculo esquelético. Además, en los métodos de la invención, un aumento en los niveles de adenosina y de inosina con respecto al control es también indicativo de una eliminación o mutación de un gen que controla la expresión y/o la función de un canal del calcio.

55 [0017] En una forma de realización, el sujeto es un humano. En otra forma de realización, el sujeto es un cerdo. En otra forma de realización, el método comprende de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM de un agonista de RyR1.

60 [0018] En una forma de realización, el método de detección de una enfermedad relacionada con el RyR1 incluye los siguientes pasos: aislamiento de los linfocitos de una muestra, tratamiento de los linfocitos aislados con un agonista de RyR1, determinación de los niveles de adenosina y de inosina en la muestra tratada y producción de un diagnóstico basado en los niveles de adenosina y de inosina de la muestra tratada. La enfermedad relacionada con el RyR1 es una

de: hipertermia maligna (MH), enfermedad del núcleo central (CCD), enfermedad multiminicore (MmD) y miopatía de bastones nemalínica (NM). En una forma de realización, la enfermedad relacionada con el RyR1 es MH. Los linfocitos aislados pueden ser linfocitos de sangre periférica. En una forma de realización, el agonista de RyR1 es uno de: 4-cloro-m-cresol (4CmC), rianodina, halotano, tiopental y cafeína. En una forma de realización alternativa, el agonista de RyR2 es 4CmC. En una forma de realización, el nivel de adenosina y/o de inosina de la muestra tratada se determina por HPLC.

[0019] En otra forma de realización, el sujeto es un humano, cerdo, caballo, perro o ratón.

[0020] Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso, tal y como se define en la reivindicación 11, de equipos para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el canal del calcio que son enfermedades relacionadas con el RyR1 en un mamífero.

[0021] El equipo para la detección de una enfermedad relacionada con RyR1 incluye un agonista de RyR1, HClO_4 y estándares para adenosina e inosina. En otra forma de realización, el equipo además incluye un tubo de recogida de sangre heparinizado. En una forma de realización alternativa, el equipo además incluye un agente de aislamiento de linfocitos de sangre periférica. En otra forma de realización relacionada, el equipo además incluye una etiqueta o una etiqueta con instrucciones.

Breve descripción de los dibujos

[0022] El resumen anteriormente mencionado, al igual que la siguiente descripción detallada de la invención, se entenderá mejor cuando se lea teniendo en cuenta las figuras anexas. Para ilustrar la invención, en las figuras se muestran las formas de realización de la presente invención. Debe entenderse, no obstante, que la invención no está limitada a las configuraciones precisas, ejemplos e instrumentos mostrados.

La figura 1 es una tabla que muestra un método de diagnóstico ejemplar para enfermedades relacionadas con el RyR1 (un ejemplo de una enfermedad relacionada de canal del calcio).

La figura 2 es una curva de dosis-respuesta para adenosina intracelular inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC) más inosina en las células linfoides de sujetos susceptibles (MHS, $n=11$), no susceptibles (MHN; $n=9$) y normales ($n=7$) de hipertermia maligna. Las células linfoides fueron tratadas con 4CmC en presencia de un inhibidor de adenosina-desaminasa (EHNA, 0,1 mM). Después de la purificación, la parte alícuota se analizó para contenido de adenosina e inosina utilizando HPLC. Los valores de adenosina más inosina en ausencia de 4CmC se representan en la función $X = 0,02$ mM para permitir mostrar de forma logarítmica la curva de dosis-respuesta entera. Los niveles de adenosina más inosina fueron normalizados para reflejar por 1 millón de células. Respuestas de 4CmC en 1, 2 y 5 mM sobre los grupos de MHS son aproximadamente 4, 4 y 6 veces superiores que los valores correspondientes en grupos MHN o normales con valores P de 6×10^{-5} , 8×10^{-5} y $5,5 \times 10^{-7}$, respectivamente. No hubo superposiciones entre el grupo MHN y el grupo MHN o el grupo normal.

La figura 3 muestra el efecto del 4-cloro-m-cresol (4CmC) en los niveles de adenosina y de inosina en las células linfoides de sujetos susceptibles para hipertermia maligna (MHS), no susceptibles para MH (MHN) y de sujetos normales. Las células linfoides de sujetos MHS ($n=11$), MHN ($n=9$) y normales ($n=7$) se suspendieron en HBSS normal más 0,1% de BSA y se trataron con inhibidor de adenosina-desaminasa (EHNA, 0,1 mM). Después de 10 minutos de incubación a 37°C , las células se trataron con HBSS, con y sin el agonista de RyR1 4CmC (5 mM) y se incubaron a 37°C durante 45 minutos más. Después de terminar y purificar las muestras, las partes alícuotas (50 μl) se evaluaron por duplicado para contenido de adenosina y de inosina utilizando HPLC. Las concentraciones se normalizaron a por 1 millón de células. La suma del nivel de adenosina más inosina es aproximadamente 6 veces superior a los valores correspondientes en las células normales y de MHN.

La figura 4 muestra una curva de dosis-respuesta de eritro-9(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) en adenosina/inosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC, 2 mM) en células B inmortalizadas de un sujeto positivo en la CHCT (MHS). Los valores de adenosina y de inosina en ausencia de EHNA se representa frente a $X=0,1$ mM para permitir una muestra logarítmica de las curvas de dosis-respuesta enteras. Las concentraciones se normalizaron a por 1 millón células.

La figura 5 muestra una curva de dosis-respuesta para adenosina intracelular inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC) en células linfoides de sujetos susceptibles de hipertermia maligna (MHS) y sujetos normales. Los datos se normalizaron por 1 millón de células. Los niveles de adenosina en el grupo de MHS fueron significativamente superiores que los valores correspondientes en el grupo normal.

La figura 6 muestra la respuesta de adenosina inducida por 4CmC (2 mM) (ADO) en células linfoides de sujetos positivos en la CHCT, negativos en la CHCT y control. Los aumentos inducidos por 4CmC en [ADO] en células linfoides fueron significativamente superiores en los grupos positivos en la CHCT (MHS) que en los negativos en la CHCT (MHN) o grupos de control ($P<0,001$). No hubo diferencias significativas en los cambios inducidos por

4CmC en ADO entre el grupo negativo en la CHCT contra el grupo de control (P=0,39). La concentración de ADO de línea de base se sustrajo de su concentración de ADO inducida por 4CmC en cada línea celular.

La Figura 7 muestra el efecto de Xestospongin C (XeC) en adenosina inducida por 4CmC. En resumen, las células B inmortalizadas (MHS; n=3) en Ca^{2+} tampón de HBSS libre se trataron con XeC (0,1 y 10 mM) y se incubaron a 37°C. Después de un periodo de incubación de 10 minutos, las células fueron tratadas con 2 mM de 4CmC como se describe en el ejemplo 3.

La figura 8 muestra el efecto de 1 mM de adenosina/inosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC) en las células de linfocitos de cerdo que portan la mutación Arg615Cys y que tienen positiva la prueba de contractura con halotano-cafeína (MHS) en presencia y ausencia del inhibidor de adenosina-desaminasa eritro-9(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA, 0,1 mM). Las concentraciones de nucleósidos de la muestra fueron normalizadas a reflejar por millón de células.

Las células de linfocitos (1 a 2 millones) de cerdos con MHS (n=4) se trataron con HBSS con y sin baño de EHNA a 37°C durante 10 minutos. Después de un periodo de incubación de 10 minutos, las muestras se trataron con 4CmC para conseguir una concentración final de 1 mM como se indica en la figura.

La figura 9 muestra el efecto de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ externo en adenosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC). Las células linfoides (1 a 2 millones) de cerdo normal (n=6) se lavaron durante 10 minutos en la solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con y sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y conteniendo inhibidor de adenosina-desaminasa (EHNA, 0,1 mM). Después de un periodo de incubación de 10 minutos, las muestras fueron tratadas con 4CmC (1 y 2 mM) como se indica en la figura. *Los niveles de adenosina inducida por 4CmC en ausencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ externo fueron significativamente inferiores en comparación con los valores correspondientes cuando el experimento se realizó en presencia de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ externo.

La figura 10 muestra la dependencia de dosis de adenosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC) en las células linfoides de puerco normal (○) y de puerco portando la mutación Arg615Cys (●). Las concentraciones de adenosina de las muestras se normalizaron para reflejar por 1 millón de células. Las células (1 a 2 millones) en suspensión en la solución salina equilibrada de Hanks normal en presencia del inhibidor de adenosina-desaminasa (EHNA, 0,1 mM) se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Tras la incubación, las muestras se trataron con diferentes concentraciones de 4CmC como se indica en la figura y se incubaron después a 37°C durante otros 30 a 45 minutos. * Las respuestas de 4CmC en 0,5, 1, 2, y 5 mM en el grupo de MHS fueron significativamente superiores a los valores correspondientes en el grupo normal con valores P de 0,0035, 0,0035, 0,0017 y 0,0008 respectivamente.

La figura 11 muestra las respuestas de adenosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC, 1 mM) en células linfoides de puerco que portan la mutación Arg615Cys (MHS, n=7) y puerco normal (n=5). No hubo diferencias significativas entre los niveles de adenosina de líneas de base en las células linfoides de puerco MHS vs. puerco normal.

La figura 12 muestra el efecto del azumoleno (0-1000 mM) en adenosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC, 1 mM). Las células linfoides (1 a 2 millones) de puerco normal (n=5) en suspensión en solución salina equilibrada de Hanks libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y en presencia de inhibidor de adenosina-desaminasa, con y sin azumoleno se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Al final del periodo de incubación, las muestras se trataron con 1 mM de 4CmC y se lavaron durante otros 30 a 45 minutos. El nivel de adenosina medido en ausencia de azumoleno (adenosina inducida por 4CmC en ausencia de azumoleno) se fijó contra X=0,1 mM para permitir la muestra logarítmica de la curva de dosis-respuesta entera. El azumoleno en el rango de concentraciones usado no afectó significativamente a la adenosina inducida por 4CmC.

La figura 13 muestra el efecto de Xestospongin C (XeC) en la adenosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC). Las células linfoides (1 a 2 millones) de puerco normal (n=5) se lavaron en solución salina equilibrada de Hanks libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en presencia de inhibidor de adenosina-desaminasa. Las muestras se trataron con XeC como se indica en la figura y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Al final del periodo de incubación, las muestras se trataron con 2 mM de 4CmC. * XeC (10 mM) significativamente (P=0,002) redujo la adenosina inducida por 4CmC (2 mM).

La figura 14 muestra el efecto del cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) en las células linfoides de puerco. La figura 14A muestra el efecto del cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) solo en las células linfoides de puerco. La figura 14B muestra el efecto del FCCP en la adenosina inducida por 4-cloro-m-cresol (4CmC) en las células linfoides de puerco. En resumen, (figura 14A) las células linfoides de puerco normal (n=5) en suspensión en solución salina equilibrado de Hanks (HBSS) libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en presencia del inhibidor de adenosina-desaminasa, con y sin FCCP se incubaron a 37°C durante 10 minutos. En otro conjunto de experimentos (figura 14B), se usaron las mismas condiciones que se usaron para los experimentos de la figura 14A, excepto que al final de un periodo de incubación de 10 minutos, las muestras se trataron con 2 mM de 4CmC y se lavaron durante otros 30 a 45 minutos. Al final del periodo de incubación, las reacciones de las muestras se terminaron como se detallada en el ejemplo 4. El número de las células usadas fue normalizado para representar por millón de células. La figura 14A: * FCCP (2 y 20 μM) aumentó significativamente

los niveles de adenosina basal. #Valores no son estadísticamente diferentes de los valores correspondientes de la figura 14B. ** En ausencia de MCPC, adenosina inducida por 4CmC (figura 14B) fue 5,8 veces mayor comparada con el nivel de adenosina basal de la figura 14A.

5 Descripción detallada

10 [0023] Esta invención se refiere a nuevas pruebas de diagnóstico *in vitro* mínimamente invasivas para enfermedades relacionadas con el canal del calcio que son enfermedades relacionadas con RyR1 (tal como por ejemplo, MH) y equipos adecuados para realizar estas pruebas. Específicamente, la invención se refiere a pruebas mínimamente invasivas y equipos para realizar estas pruebas para el diagnóstico y el seguimiento post-tratamiento de síndromes relacionados con RyR1, cuyo denominador común y etiología están relacionados con la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular con consecuencias obligatorias sobre la célula, energéticamente reflejadas en la producción alterada de catabolitos de ATP, tales como adenosina e inosina.

15 [0024] Los solicitantes han descubierto que el tratamiento de linfocitos con un agonista de RyR1 se pueden usar como un indicador para enfermedades relacionadas con RyR1.

20 [0025] Sin pretender imponer ninguna teoría. Los solicitantes postulan que la adenosina (ADO) liberada de células linfoides es una medida de la función de RyR1 y que las mutaciones en el gen RyR1 que llevan a la liberación de Ca^{2+} inducida por agonista anormal en el músculo esquelético también llevarán a la liberación de ADO irregular en las células linfoides. Además, sin pretender imponer ninguna teoría, se piensa que el gen RyR1 puede desempeñar un papel central en todos estos síndromes a través de la liberación en exceso de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SR), dando como resultado la sobrecarga celular de Ca^{2+} , pero a través de mecanismos moleculares diferentes.

25 [0026] La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de diagnóstico, bioquímica, histología, biología celular, microbiología, inmunología y biología molecular del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía.

30 [0027] Como se utiliza en este caso, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, ratas, ratones, conejos, conejillos de Indias, primates no humanos y seres humanos, así como a animales de granja y domésticos tales como gatos, perros, caballos, ganado bovino, vacas, cerdos, oveja, pollos y patos.

35 [0028] Como se utiliza en este caso, el término "enfermedad relacionada con el canal del calcio" se refiere a cualquier enfermedad que esté asociada a una disfunción de un canal del calcio. Las enfermedades relacionadas con el canal del calcio son enfermedades relacionadas con RyR1. Enfermedades relacionadas con RyR1 son hipertermia maligna (MH), enfermedad del núcleo central (CCD), enfermedad multiminicore (MmD) y miopatía de bastones nemalínica (NM).

40 [0029] Como se utiliza en este caso, la abreviatura "MH" se refiere a hipertermia maligna. Como se utiliza en este caso, la abreviatura "CCD" se refiere a enfermedad del núcleo central que también se conoce como síndrome de Shy-Magee. Además, como se utiliza en este caso, la abreviatura "MmD" se refiere a enfermedad multiminicore y la abreviatura "NM" se refiere a miopatía de bastones nemalínica. Como se utiliza en este caso, el término "enfermedad del núcleo central" también abarca el síndrome de Shy-Magee.

45 Métodos de diagnóstico

50 [0030] Un aspecto de la invención es los métodos de diagnóstico mínimamente invasivos para detectar enfermedades relacionadas con el canal del calcio que son síntomas (enfermedades) relacionados con RyR1 en un sujeto. En general, los métodos de la invención se basan en mediciones de los cambios de catabolitos de ATP (p. ej., adenosina e inosina) tras estimulación con agonista del canal de calcio en linfocitos aislados de un sujeto.

55 [0031] En una forma de realización, los métodos de la invención están basados en mediciones de los cambios de catabolitos de ATP (p. ej., adenosina e inosina) tras estimulación con agonista de RyR1 en linfocitos aislados de un sujeto. Óptimamente, en una forma de realización de la invención, los métodos sacan provecho de los descubrimientos de que RyR1 está presente en los linfocitos y las diferencias en la expresión del gen RyR1 en pacientes se compara a los controles normales.

60 [0032] En general, los métodos de la invención comprenden poner en contacto linfocitos aislados de un sujeto (es decir, un paciente que necesita los mismos) con un agonista del canal de calcio, midiendo la adenosina y la inosina producida por los linfocitos y produciendo un diagnóstico basado en los niveles de adenosina e inosina en comparación con los de las células normales, por lo cual un aumento es indicativo de una enfermedad relacionada con el canal del calcio.

65 [0033] Una forma de realización de la invención es un método para detectar una enfermedad relacionada con el canal del calcio en un sujeto, que comprende (a) poner en contacto linfocitos aislados del sujeto con un agonista del canal de calcio, (b) medir la adenosina y la inosina producida por los linfocitos y (c) comparar los niveles medidos en la muestra

con los niveles de adenosina y de inosina en un control normal, por lo cual un aumento en los niveles de adenosina y de inosina con respecto al control es indicativo de una enfermedad relacionada con el canal del calcio.

5 [0034] Otra forma de realización de la invención es un método para detectar una enfermedad relacionada con el canal del calcio en un sujeto, que comprende (a) poner en contacto linfocitos del sujeto con un agonista del canal de calcio, (b) medir la adenosina producida por los linfocitos y (c) comparar los niveles medidos en la muestra con los niveles de adenosina de un control normal, por lo cual un aumento en los niveles de adenosina con respecto al control es indicativo de una enfermedad relacionada con el canal del calcio.

10 [0035] En una forma de realización, el sujeto es un humano, perro, gato, caballo, cerdo o ratón. En otra forma de realización, el sujeto es un humano.

[0036] En otra forma de realización, los linfocitos están en una muestra de sangre del sujeto. En otra forma de realización, los linfocitos son linfocitos de sangre periférica.

15 [0037] En una forma de realización alternativa, el paso de poner en contacto comprende la incubación de la muestra de linfocitos con el agonista bajo condiciones adecuadas. Condiciones de incubación adecuadas incluyen, pero de forma no limitativa, 37°C en presencia de un tampón. En una forma de realización, el paso de poner en contacto comprende la incubación de la muestra de linfocitos con el agonista al menos durante toda la noche, preferiblemente durante al menos uno o dos días.

20 [0038] La enfermedad relacionada con el canal del calcio es una enfermedad relacionada con RyR1 y el agonista del canal de calcio es un agonista de RyR1. Así, una forma de realización de la invención es un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con RyR1 en un sujeto, que incluye las etapas de aislar linfocitos de una muestra tomada del sujeto, tratar los linfocitos aislados con un agonista de RyR1, determinar los niveles de adenosina y de inosina de los linfocitos tratados y producir un diagnóstico basado en los niveles de adenosina y de inosina. En otra forma de realización, la enfermedad relacionada con el canal del calcio es una enfermedad relacionada con RyR1 y el método para detectar la enfermedad en un sujeto comprende (a) poner en contacto linfocitos aislados del sujeto con un agonista de RyR1, (b) medir la adenosina y la inosina producida por los linfocitos y (c) comparar los niveles medidos en la muestra con los niveles de adenosina y de inosina en un control normal, por lo cual un aumento en los niveles de adenosina y de inosina con respecto al control es indicativo de una enfermedad relacionada con RyR1.

25 [0039] Enfermedades relacionadas con RyR1 son hipertermia maligna (MH), enfermedad del núcleo central (CCD), enfermedad multimicore (MmD) y miopatía de bastones nemalínica (NM). En una forma de realización, la enfermedad relacionada con RyR1 es MH. En otra forma de realización, la enfermedad relacionada con RyR1 es CCD. En otra forma de realización, la enfermedad relacionada con RyR1 es MmD. En otra forma de realización, la enfermedad relacionada con RyR1 es NM.

30 [0040] Agonistas de RyR1 son bien conocidos por un experto en la materia. Los agonistas de RyR1 son 4-cloro-m-cresol (4CmC), rianodina, cafeína, tiopental, succinilcolina y anestésicos volátiles tales como halotano, isoflurano y enflurano. En una forma de realización, el agonista de RyR1 es 4CmC. En la invención, el agonista de RyR1 es 4-cloro-m-cresol (4CmC), rianodina, halotano, tiopental, cafeína.

35 [0041] En una forma de realización, la concentración del agonista de RyR1 varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, alternativamente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, alternativamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mM, alternativamente de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mM. En una forma de realización, el agonista de RyR1 es 4CMC, que se usa en una concentración que varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 5 mM, alternativamente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, alternativamente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM. En otra forma de realización, el agonista de RyR1 es cafeína, que se usa en una concentración que varía de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, alternativamente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM. En una forma de realización alternativa, el agonista de RyR1 es rianodina, que se usa en una concentración de aproximadamente 0,5 µM a aproximadamente 5 µM.

40 [0042] En una forma de realización, la adenosina y la inosina producidas por los linfocitos aislados de un sujeto que sufre una enfermedad relacionada con RyR1 son 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces o mayores que los niveles de adenosina y de inosina del control normal. En una forma de realización, la adenosina y la inosina producidas por los linfocitos aislados de un sujeto que sufre una enfermedad relacionada con RyR1 son 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces o mayores que los niveles de adenosina y de inosina de los linfocitos de un sujeto que no sufre una enfermedad relacionada con RyR1.

45 [0043] La adenosina y la inosina producidas por los linfocitos se pueden determinar por cualquier método adecuado, incluyendo pero de forma no limitativa, cromatografía en fase líquida de alta eficacia (HPLC), método de luminiscencia, cromatografía en fase líquida-espectrometría de masa (LC-MS) y biosensor de adenosina con enzimas atrapadas de adenosina-desaminasa, nucleósido-fosforilasa y xantina-oxidasa. En una forma de realización, los niveles de adenosina y de inosina se determinan utilizando el método de luminiscencia descrito por Jabs *et al.* (Clin. Chem. 36/1, 81-87 (1990)).

5 [0044] En una forma de realización, el control normal comprende linfocitos de un sujeto que no sufre una enfermedad relacionada con RyR1. En otra forma de realización, la enfermedad relacionada con el canal del calcio es una enfermedad relacionada con RyR1 y el control normal es una base de datos de control de diagnóstico desarrollada para cada enfermedad relacionada con RyR1.

10 [0045] Opcionalmente, los métodos de la invención puede utilizar además un inhibidor de adenosina-desaminasa. Inhibidores adecuados son comúnmente conocidos en la técnica. Inhibidores adecuados a modo de ejemplo son EHNA, 2'-deoxicoformicina, FR 234938 y pentostatina. En una forma de realización, el inhibidor de adenosina-desaminasa se añade junto con el agonista del canal de calcio (p. ej., el agonista RyR1).

15 [0046] Un aumento en los niveles de adenosina y de inosina con respecto al control es indicativo de una delección o mutación en un gen que controla la expresión y/o la función de un canal de calcio. Por consiguiente, en una forma de realización de la invención, los métodos de la invención pueden utilizarse para probar una delección o mutación en un gen que controla la expresión y/o la función de un canal de calcio.

20 [0047] En otra forma de realización, un aumento en los niveles de adenosina e inosina con respecto al control es también indicativo de una delección o mutación en el gen RyR1, es decir, un defecto en RyR1. Así, los métodos de la invención pueden utilizarse para hacer pruebas para una delección o mutación en el gen RyR1. En una forma de realización, la delección o mutación en el gen RyR1 es indicativo de un trastorno relacionado con el músculo esquelético, tal como por ejemplo, rabiomiólisis.

25 [0048] En una forma de realización, el método de detección/diagnosis de la enfermedad en un sujeto comprende los pasos de: (1) extracción de una muestra de sangre venosa de un paciente, (2) aislamiento de linfocitos de la muestra de sangre, (3) tratamiento de las células con un agonista de RyR1 conocido (p. ej., 4CmC, cafeína o rianodina), (4) purificación de la muestra, (5) análisis para niveles totales de adenosina e inosina (a través de por ejemplo, HPLC) y (6) comparación de los resultados del análisis con una base de datos de control estándar o control normal (es decir, una muestra de linfocitos normales) por lo cual un aumento en los niveles de adenosina e inosina totales es indicativo de la enfermedad relacionada con RyR1.

30 [0049] Haciendo referencia ahora a la figura 1, una forma de realización de la invención es el método 100 para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con RyR1 que comprende los pasos de: aislamiento (110) de los linfocitos de un sujeto, tratamiento (120) de los linfocitos aislados con un agonista de RyR1, determinación (130) de los niveles de adenosina e inosina en la muestra de los linfocitos tratados y emisión (140) de un diagnóstico basado en los niveles de adenosina e inosina de la muestra. Los expertos en la técnica entenderán que el método 100 también puede usarse para otras enfermedades relacionadas con el canal del calcio.

35 [0050] Los linfocitos se pueden aislar del sujeto utilizando métodos bien conocidos en la técnica. En una forma de realización, los linfocitos son linfocitos de sangre periférica aislados de una muestra de sangre del sujeto. Preferiblemente, la muestra de sangre se almacena en un tubo heparinizado y los linfocitos de sangre periférica se recogen utilizando la técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque.

45 [0051] En una forma de realización, sangre anticoagulada diluida se estratifica sobre Ficoll-Hypaque y se centrifuga. Los glóbulos rojos y los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos son más densos y se centrifugan a través del Ficoll-Hypaque, mientras que las células mononucleares que consisten en linfocitos junto con algunos monocitos marcan sobre ellos y se recuperan en la interfaz seguido de lavado de las células con un tampón tal como por ejemplo, solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), y resuspensión de células en el tampón en una concentración de aproximadamente 50 a 250 x 10³ células/tubo de prueba.

50 [0052] Las células se diluyen en una concentración deseada y se tratan (paso 120) con concentraciones diferentes de agonista de RyR1 específico en presencia o ausencia de un inhibidor de adenosina-desaminasa. En una forma de realización, las células se tratan con concentraciones diferentes del agonista de RyR1 4CmC (0 a 10 mM) a 37°C en presencia y ausencia del inhibidor de adenosina-desaminasa eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA. 0,1 mM) durante aproximadamente 30 minutos.

55 [0053] Los niveles de adenosina e inosina de la muestra se pueden determinar (paso 130) usando una variedad de métodos, incluyendo, pero de forma no limitativa, cromatografía en fase líquida de alta eficacia (HPLC), método de luminiscencia, biosensor de adenosina que consiste en tres enzimas atrapadas de adenosina-desaminasa, nucleósido-fosforilasa y xantina-oxidasa y usando LC-MS en vez del sistema HPLC.

60 [0054] En unas formas de realización, la suspensión celular tratada con agonista de RyR1 (p. ej., después de una incubación de 30 minutos con el agonista de RyR1) se mezcla con un volumen igual de 6% de HClO₄ y se centrifuga a 6000 r.p.m. durante 10 minutos. Partes alícuotas de sobrenadante se analizan con HPLC para los niveles de adenosina e inosina.

65

[0055] En otra forma de realización, las células resuspendidas se cuentan utilizando un hemocitómetro. En una forma de realización alternativa, los niveles de adenosina e inosina se determinan usando una columna de microporo de fase inversa HPLC y detector de UV.

5 [0056] En otra forma de realización, los niveles de adenosina e inosina son determinados usando una columna de microporo HPLC con un detector de matriz de fotodiodos (PAD). Las muestras de microdiálisis se inyectan directamente sobre una columna de fase inversa C₁₈ microporo sin ninguna preparación de la muestra previa. El uso de un PAD en este método proporciona muchas ventajas. Primero, un PAD permite la detección simultánea de absorbancia de UV a longitudes de onda múltiples, permitiendo la detección de cada compuesto en su absorbancia de UV máxima. Además, el espectro de absorción de UV completa se registra para cada valor máximo detectado, confirmando la pureza máxima y la identidad. El uso de una columna HPLC de microporo y detección de absorbancia de UV en la absorbancia máxima para cada compuesto mejora la sensibilidad para todos los compuestos.

15 [0057] El diagnóstico (paso 140) se realiza por comparación de los niveles de adenosina e inosina en la muestra para los niveles de adenosina e inosina en un control normal. En una forma de realización, el control normal comprende linfocitos de un sujeto que no padece una enfermedad relacionada con RyR1. En otra forma de realización, el diagnóstico (paso 140) se realiza por comparación de los resultados del análisis de HPLC del sujeto con un control normal, tal como por ejemplo, base de datos de control de diagnóstico derivada de linfocitos B normales (es decir, linfocitos aislados de sujetos voluntarios normales). Un aumento significativo de los niveles de adenosina e inosina después de la estimulación con agonista de RyR1 indica enfermedades relacionadas con RyR1 de alta probabilidad, tal como por ejemplo MH.

Equipos

25 [0058] Otro aspecto de la invención se refiere a los equipos para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con RyR1, es decir, equipos para la realización de los métodos de la invención, es decir, el equipo como se describe en la reivindicación 11.

30 [0059] En otra forma de realización, el equipo además incluye un tubo de recogida de sangre heparinizado y un agente de aislamiento de linfocitos de sangre periférica. En una forma de realización alternativa, el equipo incluye además una etiqueta. En otra forma de realización relacionada, el equipo incluye además una etiqueta con instrucciones, preferiblemente, instrucciones de procedimiento.

35 [0060] Sin más descripción, se considera que un técnico en la materia puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, hacer y utilizar la presente invención y poner en práctica los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos, por lo tanto, específicamente ponen de manifiesto las formas de realización preferidas de la presente invención y no deben ser interpretadas como limitativas de manera alguna del resto de la divulgación.

Ejemplos

40 **Ejemplo 1: estudios *in vitro* para detectar susceptibilidad de hipertermia maligna en seres humanos**

45 [0061] Se llevaron a cabo estudios piloto usando muestras de sangre de sujetos humanos en los siguientes grupos: grupo 1: sujetos MHS con CHCT positiva y/o que tienen una mutación asociada a MH conocida (n=11), grupo 2: no susceptibles de MH con resultados de CHCT negativa (MHN) (n=9) y grupo 3: sujetos normales que no han sido sometidos a CHCT y sin historia familiar de MH (n=7).

50 [0062] El arco de resultados experimentales aparece en las tablas 1 y 2. La tabla 1 muestra los datos biométricos, el estado de índice y los niveles de adenosina más inosina para pre y post tratamiento con 4-cloro-m-cresol (4CmC) de células linfoides obtenidas de tres grupos de sujetos.

Tabla 1: datos biométricos, estado de índice y niveles de adenosina para pre y post tratamiento con 4-cloro-m-cresol (4CmC, 5mM) de células linfoides obtenidas de tres grupos de sujetos,

Número de sujeto	Diagnosís de CHCT	Sexo	Contracturas de resultados de CHCT*		Mutación de MH conocida	[Adenosina] Basal(µM)	[Adenosina] µM Post 5mM de 4CmC	Historia médica o familiar
			3% Hal	2 mM de Caf				
111606	Positivo	M	4,5	0,7	Sí	0,17	2,079	Rabdo
031606	Positivo	M	1,9	0,3	Sí	0,137	1,932	H
112106	Positivo	M	1,2	0	Sí	0,271	1,580	H

082207	Positivo	M	1,4	0,3	En proceso	0,425	1,725	H
102207	Positivo	F	2,1	0,4	Sí	0,262	0,949	H
031808	Positivo	F	1,3	0	En proceso	0,264	1,475	H
102507	Positivo	M	0,8	0,2	Sí	0,302	0,987	Rabdo
061708	Positivo	M	0,8	0	Sí	0,177	0,853	Rabdo
061808B	N/R	F	N/R	N/R	Sí	0,103	0,984	H
061808D	N/R	M	N/R	N/R	Sí	0,226	1,240	H
061808E	Positivo	F	---	---	Sí	0,146	1,560	H
061808C	Negativo	M	N/R	N/R	NO	0,056	0,128	H
042407	Negativo	M	0	0	N/R	0,022	0,078	H
092507	Negativo	M	0	0	N/R	0,012	0,070	Rabdo
020508	Negativo	M	0,4	0	N/R	0,040	0,074	Rabdo
120407	Negativo	M	0	0	N/R	0,043	0,249	H
042208	Negativo	M	0,4	0	N/R	0,006	0,192	Rabdo
042908	Negativo	F	0,3	0	N/R	0	0,140	Rabdo
061008	Negativo	M	0,5	0	N/R	0,093	0,237	Rabdo
071508	Negativo	M	0,2	0	N/R	0,170	0,356	H
081407	Normal	M	N/R	N/R	N/R	0,096	0,220	Ninguna
091307	Normal	F	N/R	N/R	N/R	0,078	0,144	Ninguna
013008	Normal	M	N/R	N/R	N/R	0,062	0,246	Ninguna
013108	Normal	M	N/R	N/R	N/R	0,014	0,154	Ninguna
013108K	Normal	M	N/R	N/R	N/R	0,036	0,276	Ninguna
051308RK	Normal	M	N/R	N/R	N/R	0,07	0,177	Ninguna
051308C	Normal	M	N/R	N/R	N/R	0,092	0,268	Ninguna

[0063] En la tabla 1, Rabdo se refiere a un paciente con episodio de rabdomiólisis, H se refiere a un paciente con presunto episodio de MH o con una historia familiar de MH, CHCT se refiere a una prueba de contractura con halotano-cafeína, N/R es no realizada, M es masculino, F es femenino, Caf significa cafeína, HAL significa halotano.

[0064] La tabla 2 muestra los datos biométricos, el estado de índice y los niveles de adenosina más inosina para pre y post tratamiento con 4- cloro-m-cresol (4CmC) de células linfoides han obtenidas de tres grupos de sujetos.

10

Tabla 2: datos biométricos, estado de índice y niveles de adenosina más inosina para pre y post tratamiento con 4CmC de células linfoides obtenidas de tres grupos de sujetos,

Número de sujeto	Diagnosis	Contracturas de resultados de CHCT* (g)		Mutación de MH conocida	Adenosina basal + Inosina (µM)	Adenosina + Inosina Post 5 mM de 4CmC	Historia médica o familiar	Sexo
		3% Hal	2 mM de Caf					
111606	MHS	4,5	0,7	Sí	5,8	55,6	Rabdo	M
031606	MHS	1,9	0,3	Sí	4,8	52,3	H	M
112106	MHS	1,2	0	Sí	6,2	42,5	H	M
082207	MHS	1,4	0,3	En proceso	4,1	23,9	H	M
102207	MHS	2,1	0,4	Sí	6,2	29,2	H	F
031808	MHS	1,3	0	En proceso	9,2	42,3	H	F

102507	MHS	0,9	0,2	Sí	6,1	24,9	Rabdo	M
061708	MHS	0,8	0	Sí	7,1	23,5	Rabdo	M
061808B	MHS	N/R	N/R	Sí	3,2	26,7	H	F
061808D	MHS	N/R	N/R	Sí	8,3	28,5	H	M
061808E	MHS	N/R	N/R	Sí	4,8	42	H	F
061808C	MHN	N/R	N/R	No	1,1	6,5	H	M
042407	MHN	0	0	N/R	0,9	2,4	H	M
092507	MHN	0	0	N/R	0,3	2	Rabdo	M
020508	MHN	0,4	0	N/R	1,4	6,3	Rabdo	M
120407	MHN	0	0	N/R	0,5	6	H	M
042208	MHN	0,4	0	N/R	0,7	5	Rabdo	M
042908	MHN	0,3	0	N/R	2,9	3,9	Rabdo	F
061008	MHN	0,5	0	N/R	3,5	6,7	Rabdo	M
071508	MHN	0,2	0	N/R	5,2	9,6	H	M
081407	Normal	N/R	N/R	N/R	2,7	4,4	Ninguna	M
091307	Normal	N/R	N/R	N/R	0,6	1,5	Ninguna	F
013008	Normal	N/R	N/R	N/R	2,4	6,7	Ninguna	M
013108	Normal	N/R	N/R	N/R	3,2	5,5	Ninguna	M
013108K	Normal	N/R	N/R	N/R	1,5	5,1	Ninguna	M
051308K	Normal	N/R	N/R	N/R	2,9	5,8	Ninguna	M
051308C	Normal	N/R	N/R	N/R	4,9	8,6	Ninguna	M
* 3% de las contracturas inducidas por halotano y 2 mM de cafeína es la media de contracturas de 3 bandas musculares.								

5 [0065] En la tabla 2, MHS se refiere a susceptible de hipertermia maligna, MHN significa no susceptible de hipertermia maligna, Rabdo se refiere a un paciente con episodio de rabdomiólisis, H se refiere a un paciente con presunto episodio de MH o con una historia familiar de MH, CHCT significa prueba de contractura con halotano-cafeína, N/R es no realizada, M es masculino, F es femenino, Caf significa cafeína, HAL significa halotano.

10 [0066] En resumen, muestras de sangre venosa (20 ml) se extrajeron de pacientes usando tubos de recogida de sangre heparinizados. Células linfoides de sangre periférica se aislaron de la sangre total por la técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque. En resumen, sangre anti-coagulada diluida se estratificó sobre Ficoll-Hypaque y se centrifugó. Células mononucleares que consistían en linfocitos y algunos monocitos se recuperaron en la interfaz. Las células se lavaron con el tampón de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), se resuspendieron en el tampón de HBSS y se trataron con concentración diferente de 4CmC a 37°C en presencia y/o ausencia del inhibidor de adenosina-desaminasa eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) durante aproximadamente 30 minutos. Las células se purificaron luego añadiendo un volumen igual de 6% de HClO₄ y se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 10 minutos. Partes alícuotas del sobrenadante se analizaron para contenido de adenosina y de inosina con HPLC usando un módulo de separación de Waters (modelo 2695) equipado con detector de matriz de fotodiodos de Waters y el software Empower.

20 [0067] Como se muestra en la figura 5, 4CmC estimuló la liberación de inosina de manera dosis-dependiente en concentraciones por encima de 1 mM alcanzando saturación en aproximadamente 5 mM. La formación de adenosina no se vio afectada por 4CmC bajo las mismas condiciones. La falta de respuestas de adenosina para la estimulación de RyR1 fue posible debido a desaminación de la adenosina a inosina por la adenosina-desaminasa ubicua. Para probar esta hipótesis, los linfocitos se incubaron con varias concentraciones del bloqueador de adenosina-desaminasa eritro-9(2-hidrovi-3nonil) adenina (EHNA). Como se muestra en la figura 3, la formación de inosina disminuyó en concentraciones de EHNA de 10 µM o superior y la formación de inosina disminuyó y estuvo acompañada por un aumento equimolar de adenosina, como se esperaba. Los datos de las figuras 2, 3 y combinadas muestran que la estimulación de RyR1 por 4CmC provocó una liberación dosisdependiente de adenosina más inosina en los linfocitos de sujetos humanos de MHS.

30 [0068] En las muestras de humanos de control, es decir, en ausencia de historia familiar o personal de MH, al igual que en los casos en los que se sospechaba la MHS pero no se diagnosticó utilizando la prueba de contractura con halotano-cafeína independiente y convencional (CHCT negativa, grupo MHN), la dosis efectiva máxima de 4CmC (5 mM) no

estimulo, o lo hizo mínimamente, la formación de adenosina más inosina. La figura 2 compara las respuestas de nucleósidos de controles sanos al igual que sujetos MHN con las de sujetos MHS. Es evidente que las respuestas de sujetos MHS fueron varias veces (aproximadamente de 4 a 6 veces) superiores a las respuestas de control medidas en controles sanos y sujetos MHN. En ningún caso hubo un recubrimiento entre las respuestas del control MHN o control normal y las respuestas de MHS. También se muestra en la figura 3, que indica que 4CmC tuvo sólo efectos menores en la formación de nucleósidos en muestras normales y MHN en comparación con la estimulación de casi 6 veces en las muestras MHS.

[0069] Específicamente, los niveles de adenosina de línea base más inosina fueron $2,7 \pm 0,5$ ($n=7$), $1,7 \pm 0,5$ ($n=9$) y $5,9 \pm 0,6$ ($n=11$) μM en los grupos normal, MHN y MHS, respectivamente. Después del tratamiento con 4CmC (5 mM), los niveles de nucleósidos aumentaron a $5,6 \pm 1$, $5,4 \pm 0,6$ y $35,6 \pm 3,1$ μM en los grupos normal, MHN y MHS, respectivamente. No hubo ninguna superposición entre los niveles de nucleósidos en el grupo MHS, MHN o grupos normales. Los datos se presentan como \pm SEM.

[0070] Así, los solicitantes han demostrado que, en los sujetos humanos, la estimulación con el agonista de RyR1 puede usarse para hacer pruebas de enfermedades relacionadas con RyR1, tal como por ejemplo MHS. Por consiguiente, la estimulación con el agonista de RyR1 de células linfoides y ensayo de adenosina/inosina por HPLC tiene potencial para el desarrollo de un método mínimamente invasivo, simple y relativamente económico para diagnosticar MHS en seres humanos.

Ejemplo 2: estudios *in vitro* para detectar susceptibilidad de hipertermia maligna en puercos

[0071] Resultados similares a los de estudios en humanos se obtuvieron en linfocitos aislados de puercos MHS y normales. Los cerdos MHS fueron homocigóticos con respecto al su mutación de RyR1 (a diferencia de los humanos MHS que fueron heterocigóticos con respecto a su mutación de RyR1). Así, los linfocitos de puerco estimulados con 5 mM de 4CmC sólo disminuyeron la formación de adenosina más inosina cuando las células de MHS fueron evaluadas. Como se muestra en la figura 11, la estimulación con 4CmC dio como resultado un aumento de nueve veces la producción de nucleósidos en linfocitos del grupo MHS, mientras que la misma estimulación tuvo un efecto mínimo, si hubo, en la producción de nucleótidos en linfocitos de puercos normales (figura 10).

[0072] Se aislaron las células linfoides de la muestra de sangre arterial entera (40 ml) obtenida de puercos MHS recesivos homocigóticos ($n=5$) y normales ($n=3$) por la técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque. Las células linfoides se cultivaron luego en medios RPMI-1640 suplementados con 10% de suero bovino fetal más 100 unidades/litro de penicilina a 37°C bajo 5% de CO_2 durante 2 a 3 semanas. Después del periodo de cultivo celular, las células ($5-15 \times 10^4$ células) se suspendieron en la solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) + 1% de albúmina de suero bovino y se trataron con 4-cloro-m-cresol de agonista de RyR1 específico (4CmC, 5 mM) a 37°C en presencia y ausencia del inhibidor de adenosina-desaminasa eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA, 0,1 mM) durante 30 minutos. Después de purificación usando 12% de HClO_4 seguida de centrifugación (10 minutos, 4000 r.p.m.), las partes alícuotas de la muestra (50 μl) se evaluaron para contenido de adenosina e inosina utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los datos se normalizan a por 1 millón de células, comparados usando ANOVA de sentido único y se presentan como media \pm SEM. $P < 0,05$ se considera significativo.

[0073] En este estudio, se usaron células linfoides no inmortalizadas y se realizaron tratamientos de linfocitos de agonista de RyR1 2 a 3 semanas después de la extracción y aislamiento de la sangre de células linfoides como se detalla en la sección del método. Además, estudios preliminares revelaron que el activador de RyR1, 4CmC, produjo significativamente más adenosina y/o inosina en las células linfoides 1 a 2 días después del aislamiento en cerdos normales. Parece que el periodo de tiempo de cultivo celular desempeña un papel en la formación de nucleósidos. Estas observaciones indican que la sensibilidad celular para 4CmC se correlaciona con los periodos de tiempo de cultivo.

[0074] Específicamente, los niveles de adenosina de línea base más inosina fueron $0,7 \pm 0,3$ ($n=3$) y $0,8 \pm 0,3$ ($n=5$) μM en grupos MHS y normal, respectivamente. Tras la estimulación de células linfoides con 4CmC (5 mM), los niveles de adenosina más inosina aumentaron a $1,16 \pm 0,3$ y $8,06 \pm 0,9$ μM en los grupos MHS y normal, respectivamente. Nuevamente, no hubo ninguna superposición entre los niveles de adenosina más inosina en los puercos MHS y normal.

Ejemplo 3: sobrecarga de calcio inducida por el agonista de RyR1 en los índices de adenosina en linfocitos de pacientes susceptibles de hipertermia maligna (MH) (MHS)

[0075] El diagnóstico definitivo para la susceptibilidad de hipertermia maligna (MH) (MHS) se hace actualmente mediante una prueba de contractura con halotano-cafeína (CHCT). No obstante, debido a la naturaleza invasiva de la prueba, coste y otros riesgos asociados, sólo aproximadamente el 10% de los pacientes elegibles se someten a la CHCT. Los estudios en células B humanas han mostrado que el receptor de rianodina de tipo I (RyR1) existe en células B y que la liberación de Ca^{2+} intracelular mediada por RyR1 es mayor en los sujetos MHS que en los sujetos normales.

[0076] Después de la aprobación por parte de los comités éticos apropiados para la investigación que implica seres humanos, 30 individuos en tres grupos se inscribieron en el estudio: grupo 1: sujetos MHS con una CHCT positiva

(n=11), grupo 2: pacientes sospechosos de padecer MH con resultados de CHCT negativos (MHN, n=11) y grupo 3: sujetos normales sin historia familiar de MH o trastorno neuromuscular conocido (n=8). Las células linfoides se aislaron de muestras de sangre venosa entera (20 a 40 ml) por la técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque. Las células ($1-2 \times 10^6$) se suspendieron en la solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) + 1% de albúmina de suero bovino y luego se trataron con HBSS con concentraciones diferentes de agonista de RyR1 específico 4-cloro-m- cresol (4CmC) a 37°C en presencia del inhibidor de adenosina-desaminasa eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA, 0,1 mM) durante 30 minutos. Después de los pasos de purificación, las partes alícuotas de la muestra (50µl) se evaluaron para contenido de adenosina y de inosina usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los datos fueron normalizados en 1 millón de células, analizados usando ANOVA de factor único y presentado como media \pm SEM. P <0,05 se consideró significativo.

[0077] Como resulta evidente en la figura 4, EHNA inhibió de forma efectiva la ADO desaminasa. En presencia del inhibidor de ADO desaminasa, los niveles de ADO en el control y las células de MHS fueron $0,2 \pm 0,07$ y $0,28 \pm 0,05$ µM, respectivamente. Después del tratamiento de respuesta a la dosis con 4CmC, los niveles de ADO aumentaron y se maximizaron en 2 mM de 4CmC a $0,61 \pm 0,1$ y $1,71 \pm 0,13$ µM en células normales vs. células MHS (P<0,001) (véase figura 2). No hubo ninguna superposición en los niveles de ADO entre las células MHS estimuladas con 4CmC y las células normales (véase figura 6). Xestospongín C (XeC), un inhibidor selectivo y potente del receptor de trifosfato de inositol (IP3R) fue evaluado para ADO inducida por 4CmC. XeC (1 y 10 µM) solo no produjo ningún cambio en los niveles de ADO basal (datos no mostrados). XeC no afectó a la respuesta de células B para 2 mM de 4CmC (véase figura 7).

[0078] Los resultados representados en las figuras 4 a 7 demuestran que:

- i) la liberación de calcio inducida por el agonista de RyR1 en células B produce estrés energético que es indexado por formación de ADO aumentada;
- ii) en las células de MHS, 4CmC aumenta inmensamente la formación de ADO, de acuerdo con catabolismo de ATP aumentado debido a la pérdida de control de calcio; y
- iii) el IP3 R parece no desempeñar un papel significativo en ADO inducida por 4CmC.

Así, el sistema de adenosina de las células linfoides tiene potencial clínico como prueba diagnóstica de MH mínimamente invasiva.

35 **Ejemplo 4: 4-cloro-m-cresol induce adenosina en células linfoides de puerco que porta la mutación de hipertermia maligna (MH) y normal: un estudio piloto de diagnóstico de MH.**

[0079] Una prueba de sangre mínimamente invasiva nueva para el diagnóstico de MH (que utiliza células linfoides aisladas de puerco que porta la mutación de MH, Arg615Cys (MHS) y puerco normal) se estudió. Los experimentos se diseñaron para a) examinar la hipótesis de que las mutaciones en el gen RyR1 que llevan a liberación anormal de Ca^{2+} inducida por el agonista en el músculo esquelético también llevarán a liberación de ADO irregular en células linfoides y si el ensayo de célula linfoide se puede usar como una herramienta para el diagnóstico de MH y b) determinar si la liberación de ADO está relacionada con grupos de Ca^{2+} intracelular mayores, tales como IP3, mitocondria y RyR1.

45 [0080] Se usó 4-cloro-m-cresol (4CmC) para estimular las células linfoides. 4CMC imita los efectos de la cafeína y el halotano para selectivamente inducir la liberación de Ca^{2+} intracelular en diferentes preparaciones de músculo esquelético (véase Baur *et al.*, Anesth Analog 90:200-5 (2000)) así como en vesículas de SR aisladas (véase Choisy *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 290:578-86 (1999)).

50 [0081] Modelo animal: con la aprobación de la Universidad de los Servicios Uniformados del comité de uso y cuidado de animales institucional de las Ciencias de la Salud, siete (7) cerdos normales (no sensibles a MH, de la granja Archer, Darlington, MD) y siete (7) cerdos MHS homocigóticos (granjas Boyle, Moorehead, Iowa) fueron sedados con quetamina (8-10 mg/kg, 1M), una vena cateterizada y anestesia inducida con propofol (0,2-0,4 mg/kg/min) mientras eran ventilados mecánicamente. Los puercos MHS portaban una mutación Arg615Cys (MHS) y se confirmó que eran CHCT positivos. Se hizo un esfuerzo para emparejar los dos grupos de animales experimentales con respecto a factores tales como género, edad o peso. Una cánula 20 GA se insertó por vía percutánea en la arteria femoral superficial. La presión sanguínea, el ritmo cardíaco, el índice respiratorio, $ETCO_2$ y la temperatura corporal se monitorizaron continuamente. Después de que los parámetros fisiológicos se estabilizaran, muestras de sangre arterial (40 ml) se tomaron en jeringas de 60 ml heparinizadas. Después de la recogida de las muestras de sangre, se realizó una biopsia del músculo esquelético (*Vastus lateralis*) para CHCT según un protocolo previamente descrito (véase Larach MG. Anesth Analg 69:511-5 (1989)).

65 [0082] Aislamiento de linfocitos de la sangre total: se aislaron células de linfocitos de la sangre total por la técnica de centrifugación de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (véase Boyum A., Scand. J. Clin. Lab. 97:77-89 (1968)). Las células linfoides aisladas se dispensaron en 3 volúmenes de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se centrifugaron (10 minutos a 1000 r.p.m.). El granulado fue resuspendido en HBSS para lisar los eritrocitos

contaminantes y se centrifugó. El último paso se repitió una vez más. Para mantener la simplicidad del protocolo para posibles fines de diagnóstico de MH, no se intentó más purificación. Las células linfoides se cultivaron luego en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 unidades/litro de penicilina y 2 mM de glutamina. Los cultivos de células se incubaron a 37°C en una cámara humedecida con 5% de CO₂. Todos los experimentos se completaron en los 4 días siguientes al aislamiento de las células linfoides de las muestras de sangre total.

[0083] Protocolo de ensayo de nucleósidos: en resumen, las células linfoides (1-2 x 10⁶ células/prueba) se suspendieron en HBSS con o sin Ca²⁺/Mg²⁺ (como se indicó para cada experimento) más 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA). Los experimentos fueron efectuados en presencia del inhibidor de adenosina-desaminasa eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina-HCl (EHNA, 0,1 mM) para evitar la desaminación de adenosina a inosina (Lorbar *et al.*, J Mol Cell Cardiol 31: 401-12 (1999)) y se incubó a 37°C durante 10 minutos seguido de tratamiento con diferentes concentraciones de 4CmC (0,05-10 mM). Incubación adicional a 37°C durante otros 45 minutos también se llevó a cabo. Los volúmenes finales de los tubos de ensayo se ajustaron a 0,2 ml usando tampón de HBSS. La terminación de la actividad celular y la purificación de las muestras se realizó por adición de 0,1 ml 12% de ácido perclórico seguido de centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos. Partes alícuotas del sobrenadante (50 µl) fueron evaluadas para contenido de adenosina e inosina utilizando HPLC.

[0084] Condiciones de HPLC: el sistema de HPLC consistió en una columna C₁₈ de simetría de Waters (4,6 x 250 mm) y fase móvil de 94% de KH₂PO₄ (50 mM, pH 4,6) que contenía ácido 1-heptanesulfónico (0,5 mM) y 6% de acetonitrilo. Bajo estas condiciones, los tiempos de retención para inosina y adenosina fueron 4 y 7,3 min, respectivamente. La anchura máxima de inosina y adenosina fue 18 y 36 segundos, respectivamente. Compuestos de elución fueron detectados por su absorbancia en 254 nm utilizando un detector de matriz de fotiodos de Waters (modelo 996). Concentraciones de adenosina y de inosina de muestra se obtuvieron utilizando una curva estándar calibrada de concentraciones vs. área de valor máximo.

[0085] Estadísticas: las concentraciones de nucleósidos de muestra fueron normalizados para representar por 1 millón de células y se presentaron como media ± SEM. La prueba T se aplicó para probar diferencias entre nucleósidos inducidos por el agonista en células linfoides de puerco MHS y normal. Un P <0,05 se consideró que indicaba importancia estadística.

[0086] Reactivos: HBSS que contenía Ca²⁺/Mg²⁺ (denominado HBSS normal) y HBSS libre de Ca²⁺/Mg²⁺ fueron de Invitrogen/Gibco, Carlsbad, California, EEUU. El inhibidor de adenosina-desaminasa, eritro-9(2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA, Sigma-Aldrich) se disolvió bien en el HBSS normal o HBSS libre de Ca²⁺/Mg²⁺ (Sigma-Aldrich, EEUU) y se almacenó a -20°C. KH₂PO₄, ácido 1-heptanesulfónico, albúmina de suero bovino, ADO, inosina y otros productos químicos de laboratorio convencionales fueron de Sigma-Aldrich, EEUU. Medio de cultivo RPMI-1640, suero bovino fetal y penicilina fueron de Quality Biological, Inc., EEUU. 4-cloro-m-cresol (Sigma-Aldrich; EEUU) se preparó a diario en agua destilada. Cianuro de carbonilo 4- (trifluorometoxi) fenilhidrozona (FCCP, Sigma-Aldrich) y Xestospongina C (XeC, Calbiochem, EEUU) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EEUU) y se almacenaron a -20°C. Azumoleno (donación de Dr. Jerry Parness, departamento de anestesiología, Universidad de Pensilvania) se disolvió en DMSO y se almacenó a -20°C.

Resultados

[0087] Aunque siete (7) líneas celulares de linfocitos en cada grupo de puerco MHS y normal se examinaron, el número de líneas celulares de cada protocolo fue variable debido a disponibilidad limitada de células.

[0088] La figura 8 muestra ADO/inosina inducida por 4CmC (1 mM) en presencia y ausencia de 0,1 mM EHNA. La falta de respuestas de adenosina para estimulación con 4CmC se debió a desaminación de adenosina a inosina por la adenosina-desaminasa ubicua. Para examinar esto, células linfoides se incubaron con concentraciones diferentes del bloqueador de adenosina-desaminasa EHNA. Los resultados demostraron que en concentraciones de EHNA de 20 µM o superiores, la formación de inosina disminuía y la concentración de ADO aumentaba a nivel de meseta (n=3, datos de respuesta a la dosis de EHNA no mostrados). Las diferencias en las concentraciones molares de inosina y ADO de la figura 8 fueron posibles debido a la metabolización de inosina en hipoxantina por purina-nucleósido-fosforilasa y, al menos en parte, también debido a las diferencias en el coeficiente de absorción molar (ε) de inosina comparada con ADO; en la medición de la longitud de onda de λ=254 nm para detectar los nucleósidos (ADO: λ_{max} =258 nm, λ=15,100; Inosinc: λ_{max} =248 nm, y ε=12,200 (véase índice de Merck) la absorbancia de ADO es casi un 24% superior a la de inosina.

[0089] Efecto de Ca²⁺/Mg²⁺ externo en la formación de ADO inducida por 4CmC: no hubo ninguna diferencia entre los niveles de reposo basal de ADO de las células linfoides de puerco normal (n=6) incubadas en HBSS conteniendo Ca²⁺ normal y HBSS libre de Ca²⁺/Mg²⁺: 0,023 ± 0,005 y 0,02 ± 0,004µM, P>0,05, respectivamente. No obstante, usando 1 mM de 4CmC para inducir ADO en el HBSS normal vs. HBSS libre de Ca²⁺/Mg²⁺, se midió lo siguiente: 0,326 ± 0,023 vs. 0,244 ± 0,026µM, P=0,037, respectivamente; esto reflejó un 25,2 ± 5,1% de aumento en la formación de ADO en presencia de niveles normales de Ca²⁺ extracelular. En 2 mM de 4CmC, la diferencia aumentó a 0,284 ± 0,023 en presencia y 0,167 ± 0,018µM en ausencia de Ca²⁺ extracelular reflejando un aumento de 41 ± 3,3% en la formación de ADO inducida por 4CmC (P=0,002, figura 9) en presencia de Ca²⁺ extracelular. Los datos sugirieron que la eliminación

de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ externo eliminaba el flujo de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ a través de la membrana plasmática en presencia de 4CmC y que este flujo de Ca^{2+} transmembrana contribuía a la desregulación del Ca^{2+} total durante la estimulación por 4CmC para liberar Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. La formación de ADO observada en HBSS libre de Ca^{2+} posiblemente reflejaba el estrés energético y el catabolismo de ATP debido a la liberación de Ca^{2+} exclusivamente a partir de los depósitos intracelulares, el SR en particular. Este efecto de Ca^{2+} extracelular en la formación de ADO inducida por 4CmC representó del 59% al 76% de la producción total de ADO bajo estas condiciones.

[0090] ADO inducida por 4CmC: experimentos para relaciones de respuesta a la dosis de 4CmC se efectuaron en HBSS con Ca^{2+} normal. En la figura 10 se muestran los datos de respuesta a la dosis de 4CmC para células linfoides de puerco normal (n=7) y MHS (n=7). Los niveles de ADO en los linfocitos aumentaron tras la estimulación con 4CmC de forma dependiente de la dosis y llegaron a su valor máximo en cerca de 1 mM de 4CmC, alcanzando $0,389 \pm 0,033$ y $0,199 \pm 0,005 \mu\text{M}$ en células MHS vs. células normales ($P = 0,0035$), respectivamente. Los valores estimados de EC50 para células MHS y células normales fueron $0,55 \pm 0,06$ y $0,34 \pm 0,04$ mM de 4CmC, respectivamente, que demuestran un casi 60% de aumento de la sensibilidad en la población de célula MHS. La figura 11 muestra que los niveles individuales de ADO debido a 4CmC (1 mM) de las células MHS no se solaparon con los de las células normales. La sustracción de los valores de ADO de línea de base confirmó este resultado. Los rangos para ADO basal y ADO inducida por 4CmC (1 mM) para células MHS y normales fueron 0,145-0,209 y 0,250-0,537 μM , respectivamente.

[0091] Efecto de azumoleno: el efecto del inhibidor de RyR permeable de membrana azumoleno se examinó en células tratadas con 4CmC. Según la bibliografía, el azumoleno es un antagonista de RyR más potente y más soluble que el clínicamente usado inhibidor de RyR dantroleno (véase el-Haiek *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 187:894-900 (1992)). Las células linfoides en presencia de EHNA se trataron con DMSO (concentración final de DMSO 10% V/V) con y sin concentraciones diferentes de azumoleno (0 -1000 μM), se incubaron a 37°C durante 10 minutos y posteriormente se trataron con 1 mM de 4CmC. Como se muestra en la figura 12, azumoleno en concentraciones de hasta 1 mM sólo inhibió de forma marginal la formación de ADO inducida por 4CmC. (El ajuste de curva no lineal de estos datos sugirió valores K_i aparentes cerca de 5 mM de azumoleno (observaciones no publicadas)). En un intento de aumentar la permeabilidad de azumoleno a través de la membrana plasmática, 30% (V/V) de DMSO (n=3) se evaluó como un vehículo portador. Los resultados sugirieron que la concentración de 30% de DMSO es tóxica para las células, lo que causa una reducción significativa en ADO inducida por 4CmC (datos no mostrados).

[0092] Efecto de Xestospongin C (XeC): XeC es un inhibidor selectivo y potente del receptor de trifosfato de inositol (IP3 R) acoplado a un grupo intracelular especial de Ca^{2+} (Miyamoto *et al.*, Br. J Pharmacol 130: 650-4 (2000); Ibarra *et al.*, Biol Chem 279: 7554-65 (2004); De Smet *et al.* Cell Calcium 26:9-13 (1999)). Para determinar si IP3 R contribuyó a la formación observada de ADO inducida por 4CmC, células linfoides en suspensión en HBSS libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ se trataron con DMSO (10% V/V de concentración final) con y sin XeC (1 y 10 μM). La figura 13 resume los efectos observados de XeC en ADO inducida por 4CmC. XeC (1 y 10 μM) por sí solo no afectó a los niveles de ADO basal (datos no mostrados). De forma similar, 1 μM de XeC tampoco afectó a ADO inducida por 4CmC. No obstante, 10 μM de XeC disminuyó significativamente la ADO inducida por 4CmC en un 27%, lo que sugiere que los depósitos de Ca^{2+} intracelular acoplado a IP3 R de las células linfoides porcinas puede contribuir, al menos en parte, a la desregulación de Ca^{2+} provocada por 4CmC, que a su vez se refleja indirectamente en la formación observada de ADO (véase la figura 10).

[0093] Efecto de FCCP en ADO inducida por 4CmC en células linfoides: las mitocondrias son el sitio de fosforilación oxidativa y también pueden servir como fuente de Ca^{2+} intracelular; estos orgánulos han demostrado que expresan RyRs en la membrana mitocondrial externa. FCCP es un desacoplador de fosforilación oxidativa que causa la despolarización de la membrana mitocondrial interna, que a su vez conduce a la disminución del Ca^{2+} de la matriz mitocondrial (Beutner *et al.*, J Biol Chem 276:21482-8 (2001)). FCCP (2 y 20 μM) solo aumentó significativamente los niveles de ADO basal (4,5 veces) a aproximadamente 0,1- 0,12 μM (figura 14A), pero este efecto fue pequeño en comparación con el efecto de 4CmC. FCCP fue solo el 25% efectivo en la formación de ADO inducida que 4CmC (véase figura 10). De manera interesante, ambas concentraciones de FCCP evaluadas evitaron el aumento máximo en la formación de ADO cuando 1 mM de 4CmC se usó durante (tratamiento de FCCP (véase figura 14 B). Sin pretender imponer ninguna teoría, estos datos sugieren que las irregularidades de Ca^{2+} mitocondriales podrían estar contribuyendo a la liberación de ADO inducida por 4CmC en las células linfoides de puerco (véase figura 14 B). No obstante, no está claro si tal mecanismo requeriría que 1 mM de 4CmC despolarizara la membrana mitocondrial o que la unión de 4CmC al RyRs mitocondrial putativo fuera evitada durante la despolarización mitocondrial. Debido a la disponibilidad limitada de células linfoides de MHS porcinas, los efectos de FCCP en las células de MHS y su interacción con el agonista de RyR1 4CmC no se evaluaron.

[0094] Resultados de CHCT: contracturas inducidas por halotano (3%) en las bandas musculares de puerco MHS y normal fueron $19,2 \pm 3,1$ mN (rango: 11,2 - 33,1 mN) y $1,2 \pm 1,0$ mN (rango: 0-1,8 mN), respectivamente. Contracturas inducidas por cafeína (2 mM) en bandas musculares de puerco MHS y normal fueron $10,2 \pm 1,8$ mN (rango: 4,7-17,1 mN) y 0,4mN (rango: 0-1 mN), respectivamente.

[0095] Los resultados experimentales se pueden resumir de la siguiente manera: tratamiento con 4CmC de células linfoides de puerco MHS y normal produce estrés energético que está marcado por un aumento de la formación de ADO. La liberación de ADO inducida por 4CmC en las células linfoides de puerco MHS fue significativamente mayor que

5 en las células de puerco normal, de acuerdo con un catabolismo de adenosina-5'-trifosfato (ATP) aumentado debido a la pérdida de control de calcio. No hubo ninguna superposición entre ADO inducida por 4CmC en células linfoides de puerco MHS con comparación con la de las células normales. Ca^{2+} extracelular contribuye significativamente a la liberación de ADO inducida por 4CmC en las células linfoides de puerco que es posible debido a la influencia del flujo de Ca^{2+} . Azumoleno, un potente inhibidor de RyR1, en el rango de concentraciones usado no redujo significativamente ADO inducida por 4CmC en las células linfoides de puerco normal. Tanto IP3 R como las mitocondrias parecen desempeñar un papel en la ADO inducida por 4CmC. Aunque las cantidades de las células linfoides estudiadas fueron relativamente bajas, los datos claramente se distinguieron entre puercos normales y los portadores de la mutación Arg614Cis en sus receptores RyR1, que es causante de la enfermedad de MH en el puerco.

10 [0096] Los experimentos ilustrados en los ejemplos demuestran una producción de nucleósidos sustancialmente aumentada durante la estimulación con agonistas del canal del calcio, por ejemplo, agonistas de RyR1, tanto en linfocitos humanos como porcinos. Este descubrimiento proporciona la base para una prueba diagnóstica nueva, mínimamente invasiva, relativamente simple, relativamente económica para susceptibilidad de MH, que adicionalmente
15 está libre de los efectos secundarios locales de los diagnósticos actuales que utilizan los paradigmas CHCT o IVCT invasivos. La nueva técnica también tiene potencial para diagnosticar otros trastornos relacionados con el músculo esquelético, incluyendo rabdomiólisis, como se ha mencionado anteriormente en la sección de introducción. Este descubrimiento proporciona la base para una prueba diagnóstica nueva, mínimamente invasiva, relativamente simple, relativamente económica para enfermedades relacionadas con el canal del calcio.

20 [0097] Aunque la invención se ha descrito e ilustrado aquí mediante referencias a varios materiales, procedimientos y ejemplos específicos, se entiende que la invención no se limita a las combinaciones particulares de materiales y procedimientos seleccionados para ello. Numerosas variaciones de tales detalles se pueden utilizar como así lo apreciarán los expertos en la materia. Se desea que la especificación y los ejemplos se consideren ilustrativos
25 únicamente, siendo el verdadero alcance y espíritu de la invención indicado por las siguientes reivindicaciones. Además, las formas de realización están destinadas a cubrir los componentes y los pasos en cualquier secuencia que sea eficaz para cumplir los objetivos a los que se destinan, a menos que el contexto específicamente indique lo contrario.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar una enfermedad relacionada con RyR1 seleccionada de hipertermia maligna, enfermedad del núcleo central, enfermedad multiminicore o miopatía de bastones nemalínica en un sujeto, que incluye:
- (a) el tratamiento de linfocitos aislados del sujeto con un agonista de RyR1 que es uno de 4-cloro-m-cresol, rianodina, halotano, tiopental o cafeína;
- 10 (b) la medición de los niveles de adenosina e inosina producidos por los linfocitos tratados; y,
- (c) la comparación de los niveles medidos en la muestra de linfocitos tratados con los niveles de adenosina e inosina de un control normal, donde un aumento en los niveles de adenosina e inosina con respecto al control es indicativo de una enfermedad relacionada con RyR1.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde los linfocitos están en una muestra de sangre del sujeto o donde los linfocitos son linfocitos de sangre periférica.
3. Método según la reivindicación 2, donde la muestra de sangre se almacena en un tubo heparinizado y los linfocitos de sangre periférica se recogen por la técnica de centrifugación de Ficoll-Hypaque.
- 20 4. Método según la reivindicación 1, donde una suspensión de los linfocitos tratados con el agonista de RyR1 se mezcla con un volumen igual de 6% de HClO₄ y se centrifugada a 6.000 r.p.m. durante 10 minutos y los niveles de adenosina e inosina se analizan en el sobrenadante con HPLC.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, donde los linfocitos se tratan con el agonista de RyR1 durante una incubación de 30 minutos.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde los niveles de adenosina e inosina se miden por HPLC y el control normal es una base de datos de control de diagnóstico derivada de linfocitos B normales.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el control normal es una base de datos de control de diagnóstico desarrollada para cada enfermedad relacionada con RyR1.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dicho sujeto es un humano, cerdo, caballo, perro, gato o ratón.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, donde dicho sujeto es un humano o un cerdo.
10. Uso de un equipo para la realización del método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el equipo comprende: (1) un agonista de RyR1 que es uno de 4-cloro-m-cresol, rianodina, halotano, tiopental o cafeína, (2) HClO₄ y (3) estándares para adenosina e inosina.
- 40 11. Uso del equipo según la reivindicación 10, donde el equipo comprende además un tubo de recogida de sangre heparinizado y un agente de aislamiento de linfocitos de sangre periférica.
- 45 12. Uso del equipo según la reivindicación 11, donde el equipo comprende además una etiqueta, opcionalmente con instrucciones.

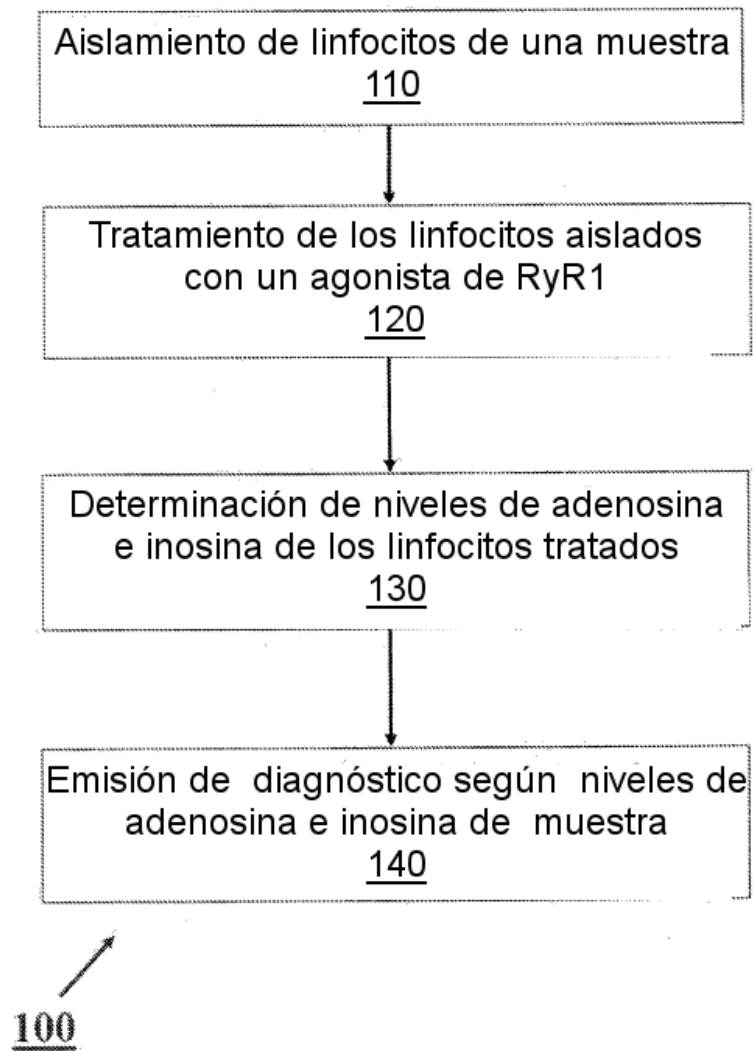


Figura 1

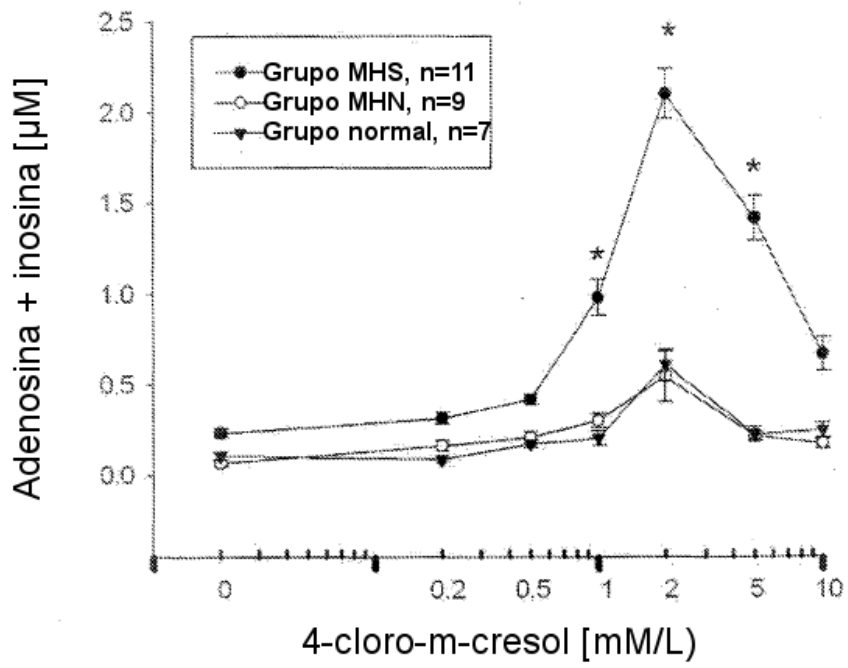


Figura 2

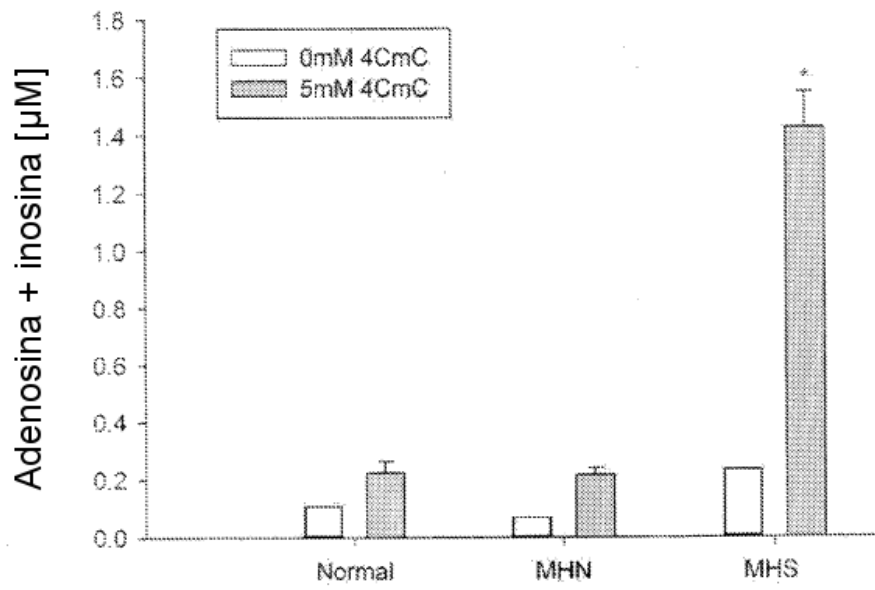


Figura 3

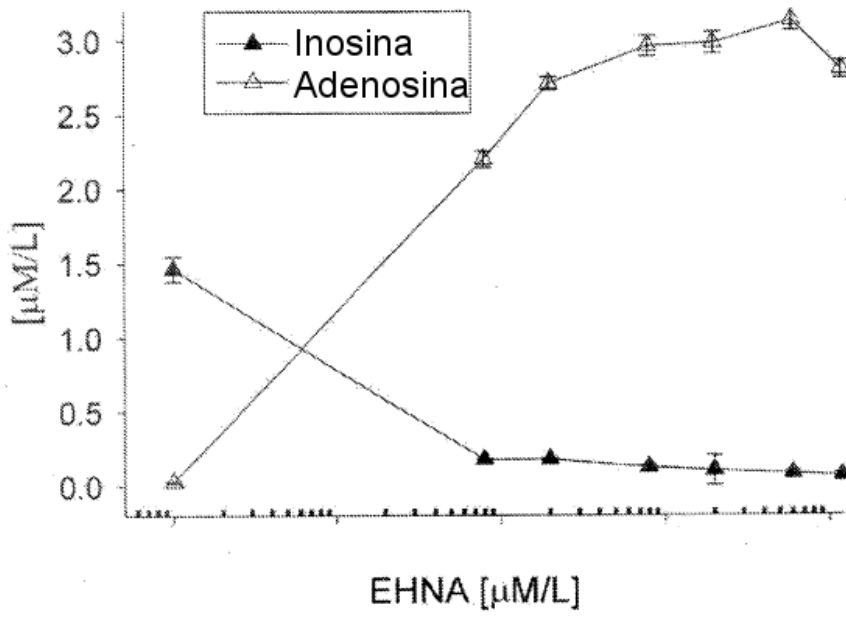


Figura 4

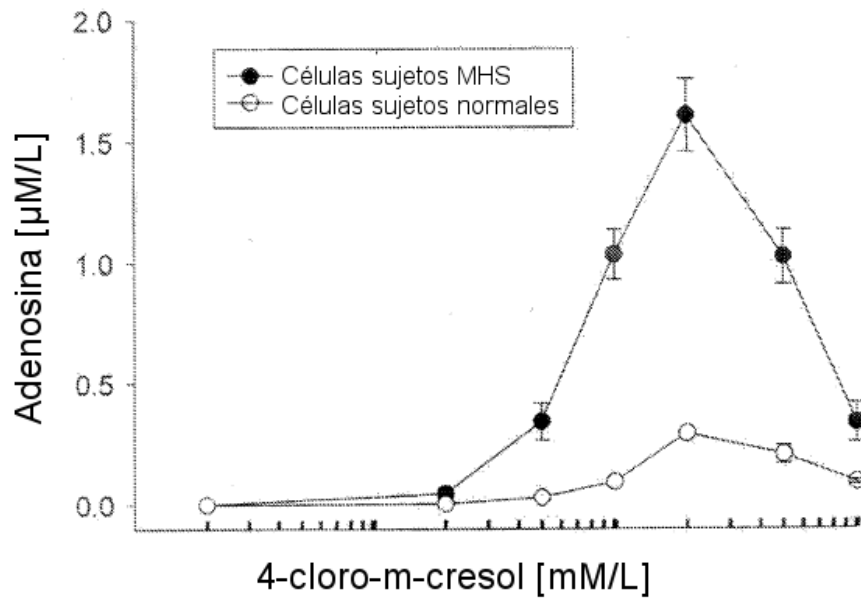


Figura 5

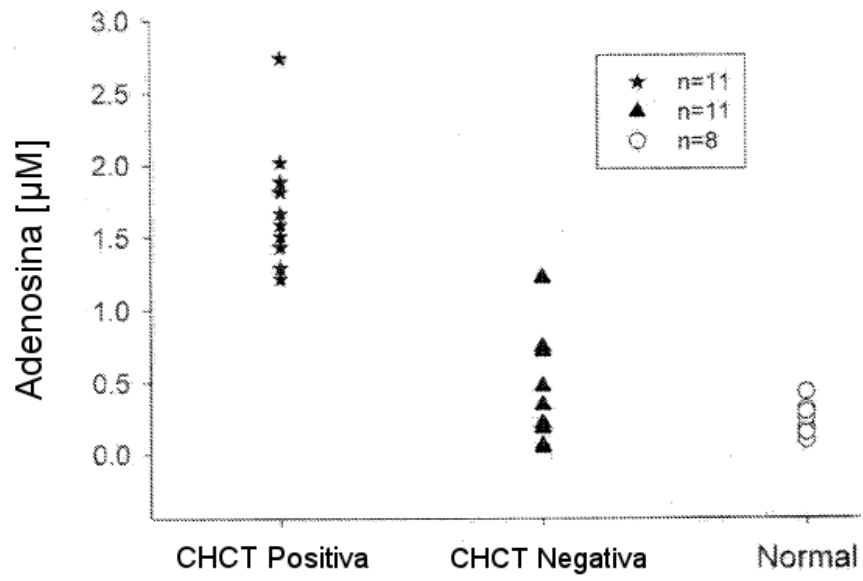


Figura 6

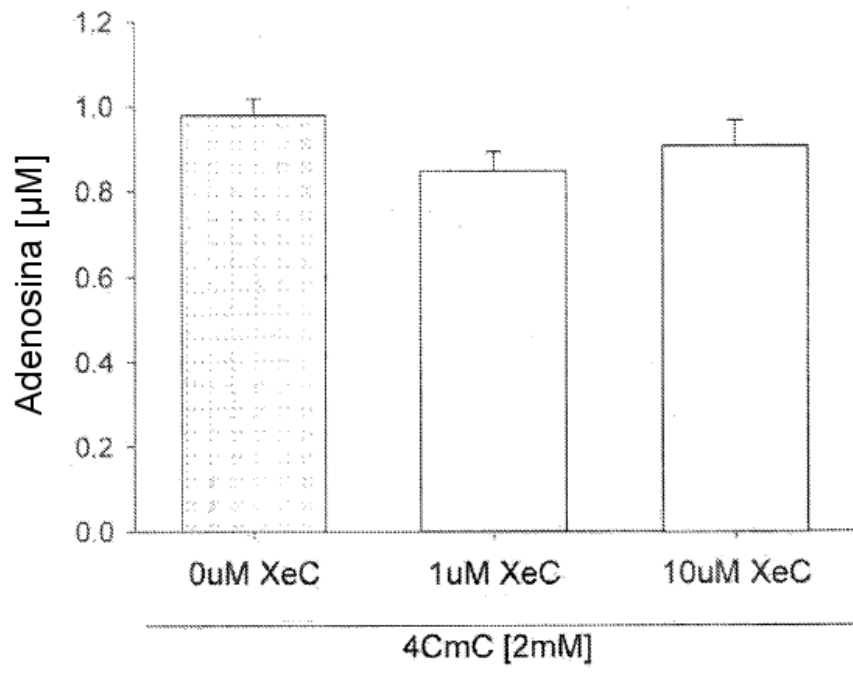


Figura 7

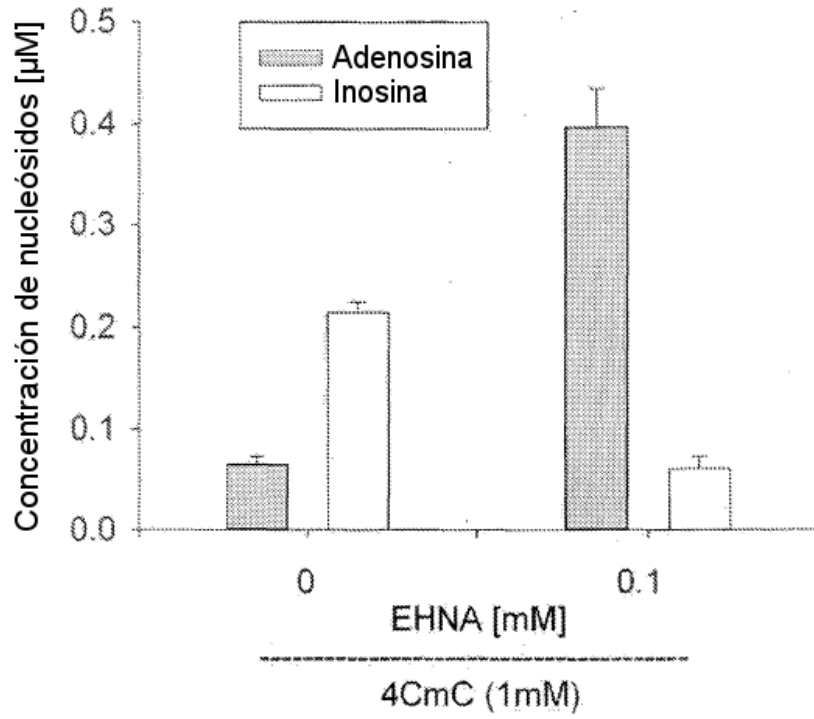


Figura 8

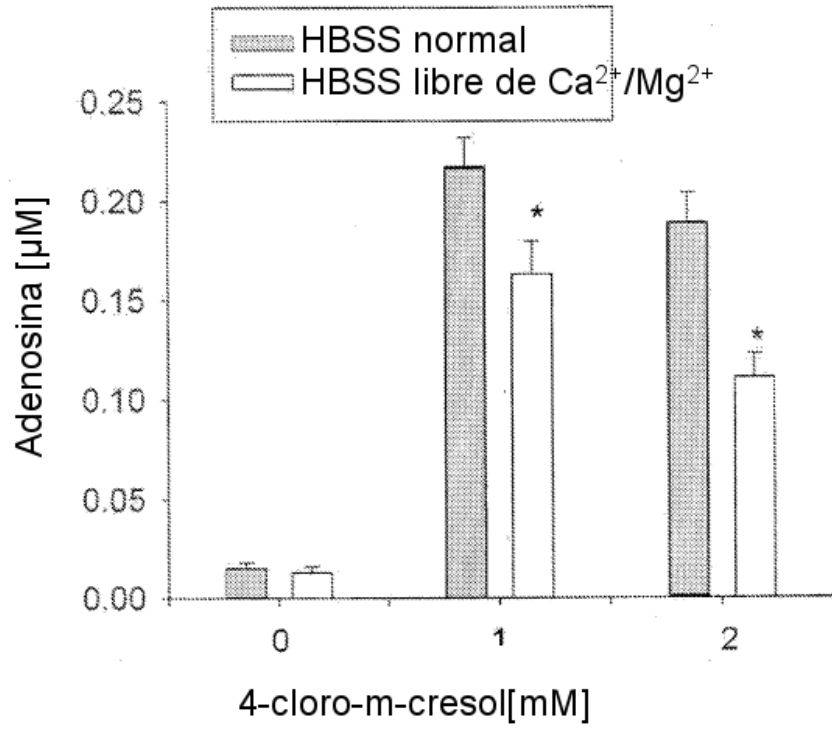


Figura 9

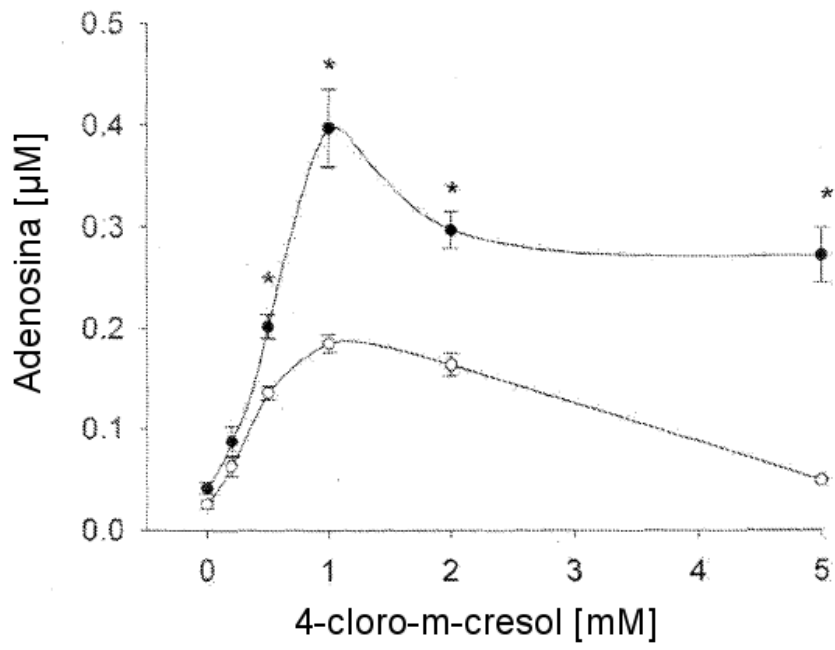


Figura 10

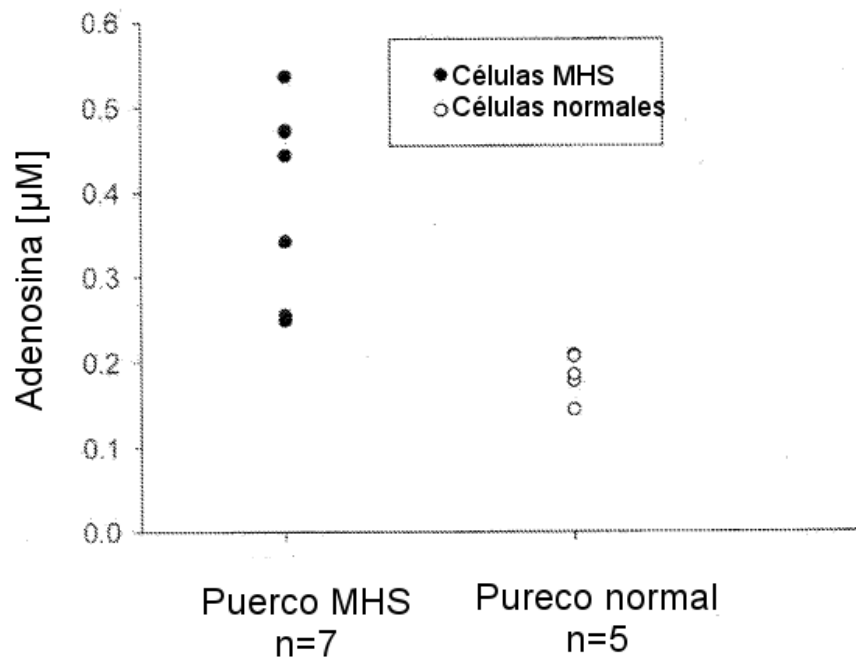


Figura 11

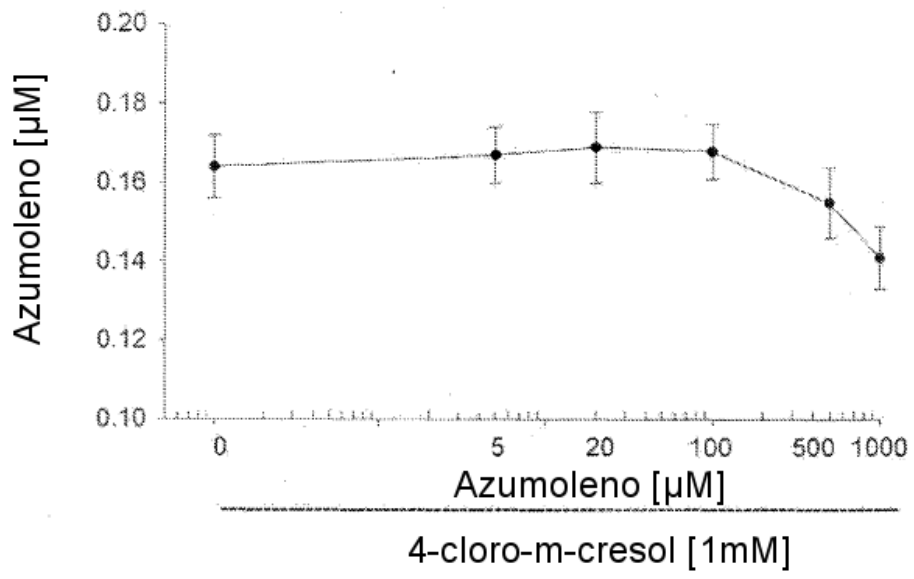


Figura 12

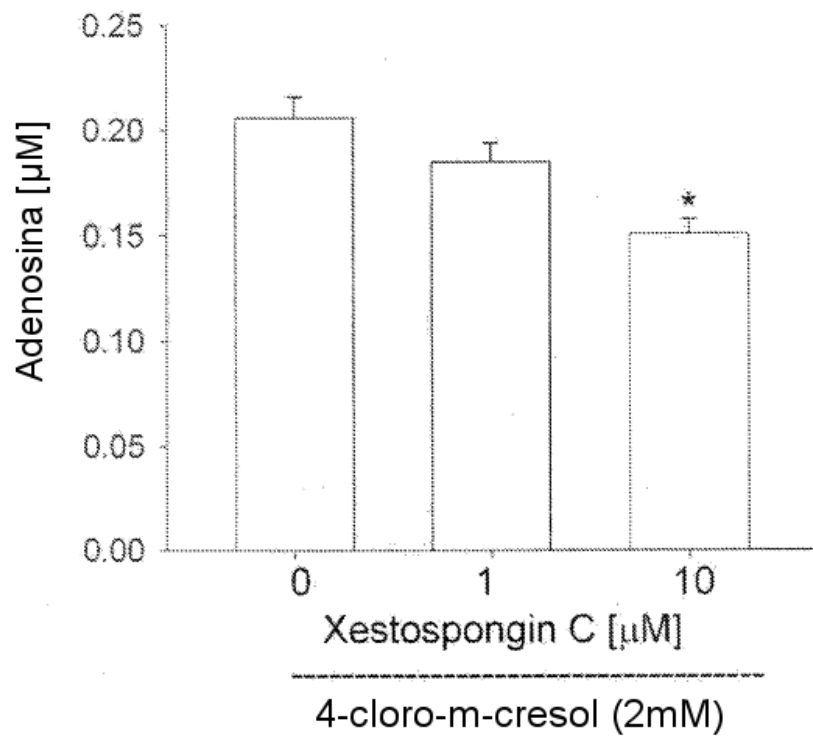


Figura 13

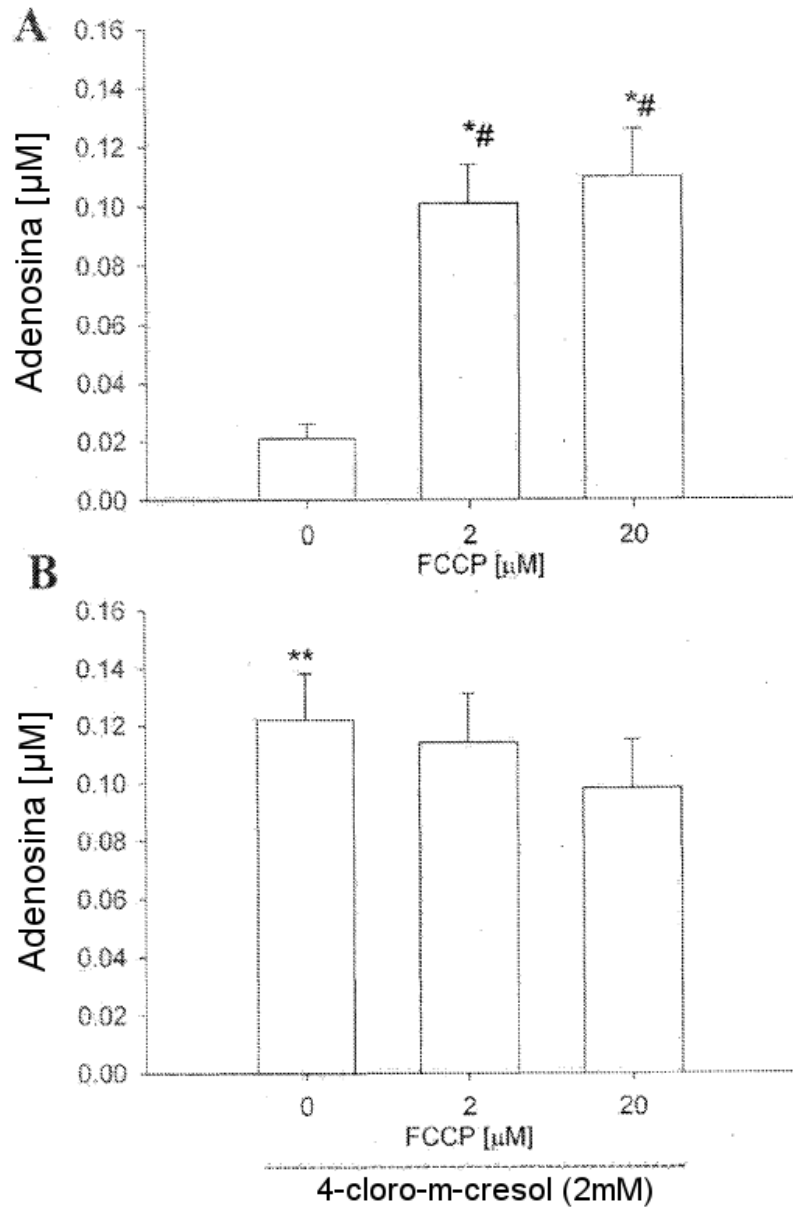


Figura 14