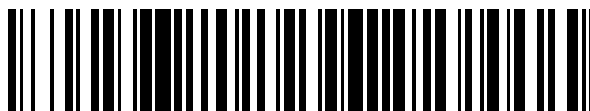


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 505**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11184669 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2508895**

54 Título: **Biomarcadores para la detección sensible de toxicidad muscular inducida por estatina**

30 Prioridad:

**08.04.2011 EP 11055569**

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

**10.11.2015**

73 Titular/es:

**ZORA BIOSCIENCES OY (100.0%)**

**Biologinkuja 1  
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**LAAKSONEN, REIJO;  
EKROOS, KIM;  
HURME, REINI;  
JÄNIS, MINNA;  
KATAINEN, RIIKKA y  
TARASOV, KIRILL**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 550 505 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

Biomarcadores para la detección sensible de toxicidad muscular inducida por estatina

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a métodos y usos que implican niveles de lípidos para predecir o diagnosticar toxicidad muscular inducida por estatina. La invención es aplicable, entre otras cosas, a determinar si un sujeto requiere ajuste del tratamiento con estatina y a la evaluación de toxicidad muscular inducida por nuevos fármacos hipolipemiantes. Los métodos incluyen analizar niveles de lípidos de una muestra biológica, y compararlos con un control.

**Antecedentes de la invención**

15 [0002] Las estatinas son actualmente los fármacos hipolipemiantes más ampliamente usados debido a que reducen del 25 % al 35 % la incidencia de criterios de valoración consistentes cardiovasculares (muerte cardiovascular, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular) en diferentes poblaciones de pacientes. Estas poblaciones incluyen aquellas con enfermedad estable o inestable de las arterias coronarias, diabéticos y pacientes hipertensores con otros factores de riesgo. En general, las estatinas son bien toleradas, aunque pueden producirse efectos secundarios musculares, hepáticos y gastrointestinales. Las estatinas pueden asociarse a una gran diversidad de efectos secundarios musculares, desde mialgias no específicas o atípicas, hasta miopatía y el síndrome de rabdomiólisis completo.

25 [0003] Las mialgias se definen como dolor muscular o enfermedades de músculos doloridos que pueden tanto ser generalizadas como localizadas. Tales síntomas se producen en hasta el 10 % de los pacientes y pueden obligar a los médicos a reducir la dosis, cambiar a otra estatina usando un enfoque de ensayo y error o detener la medicación completamente. Estos síntomas musculares también pueden contribuir a la tasa relativamente alta de pacientes que detienen la terapia con estatina dentro de los dos primeros años de tratamiento. Así, incluso los síntomas musculares más benignos pueden tener importantes consecuencias y limitar los grandes beneficios clínicos y socio-económicos posiblemente ofrecidos por estos agentes.

[0004] La miopatía, aunque es menos devastadora que la rabdomiólisis, también puede producirse después del tratamiento con estatinas y se define como dolor muscular y/o debilidad con elevados niveles de creatina cinasa (CK) al menos 10 veces del límite superior del normal. La incidencia de miopatía es aproximadamente del 1-5 %. Los factores de riesgo predisponentes conocidos para la toxicidad muscular relacionada con estatina incluyen insuficiencia renal, hipotiroidismo, enfermedades musculares hereditarias o adquiridas, historia de toxicidad muscular con otra estatina o un fibrato, uso concomitante de un derivado de ácido fibríco, alcoholismo, práctica clínica en la que podrían producirse elevados niveles en plasma de estatinas, además de antepasados asiáticos.

40 [0005] La rabdomiólisis es un evento raro (muy por debajo del 0,1 % de los usuarios de estatina), pero constituye una afección potencialmente mortal caracterizada por toxicidad muscular grave, gran aumento en los niveles de creatina cinasa (CK) en plasma (que superan 10.000 U/l) e insuficiencia renal secundaria a toxicidad por mioglobina. La rabdomiólisis ha causado varias muertes de pacientes y ha conducido a la retirada de una estatina del mercado, la cerivastatina, (Baycol, Bayer). También se mostró recientemente que la incidencia de la rabdomiólisis aumentaba con otro inhibidor de la HMG-CoA reductasa, la simvastatina (Zocor, Merck & Co.), cuando se administraba a una dosis alta (ensayo A a Z).

[0006] Actualmente se usa medición de creatina cinasa (CK) en plasma/suero como biomarcador para la toxicidad muscular inducida por estatina. Para la gran mayoría de casos, la medición de CK sigue siendo poco informativa a pesar de la presencia de síntomas. La CK en plasma/suero es un marcador inespecífico debido a que puede elevarse por muchos otros motivos, que incluyen ejercicio físico. Una limitación incluso mayor es su mala sensibilidad, ya que es indicativa solo después de un daño sustancial a células musculares que implican la fuga de CK al plasma de tejidos. Así, para este fin está bien justificado desarrollar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de toxicidad muscular inducida por estatina. Estudios previos (Phillips PS et al.: "Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels". Ann Intern Med. 1 oct 2002; 137(7):581-5) sobre especímenes de músculo obtenidos de pacientes durante dolor muscular agudo han demostrado, por ejemplo, una acumulación de células inflamatorias en estudios histopatológicos.

[0007] El número de mediadores lipídicos en el cuerpo humano es abrumador. Se han hecho intentos para facilitar su identificación y cuantificación por avances en espectrometría de masas y bioquímica de lípidos, que hoy en día permiten la identificación y cuantificación simultánea de alta resolución de cientos de especies de lípidos moleculares en varias clases de lípidos (Ejsing CS, et al: Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, 106:2136-2141; Stahlman M, et al: High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009 Hiukka A, et al: ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased

- susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan. Diabetes 2009, 58:2018-2026; Linden D, et al: Liver-directed overexpression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase results in hepatic steatosis, increased triacylglycerol secretion and reduced fatty acid oxidation. FASEB J 2006, 20:434-443) denominadas conjuntamente el lipidoma. Estudios lipidómicos han buscado identificar la distribución de lípidos celulares y describir sus mecanismos bioquímicos, interacciones y dinámicas. La lipidómica es capaz en principio de cuantificar la composición química exacta de lipidomas (Han X, Gross RW: Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. J Lipid Res 2003, 44:1071-1079).
- 10 **[0008]** La mayoría de los datos de lípidos en la materia hoy en día presenta lípidos en un formato de composición en suma, es decir, fosfatidilcolina (PC) 34:1 (Brugger B, et al: Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:2339-2344) en la que el lípido molecular y las colas de ácido graso unidas siguen sin identificar. La identificación de especies de lípidos moleculares, por ejemplo, PC 16:0/18:1 (Ekroos K, et al: Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS3 fragmentation. J Lipid Res 2003, 44:2181-2192) es la principal característica de la lipidómica avanzada, que suministra especies de lípidos moleculares altamente resueltas en vez de información sumada de ácidos grasos. Por ejemplo, se revela la información del tipo de ácidos grasos y sus posiciones de unión con respecto al esqueleto de glicerol que constituye la molécula de PC particular. Hay técnicas convencionales tales como cromatografía en capa fina combinada con cromatografía de gases, pero no solo requieren cantidades de muestra considerablemente mayores y preparación de muestras laboriosa, sino que no suministran especies de lípido molecular. A pesar de las múltiples técnicas de espectrometría de masas que pueden caracterizar entidades de lípidos, la mayoría de ellas son todavía incapaces de dar datos cuantitativos de alta calidad fiables en términos de concentraciones absolutas o próximas a absolutas.
- 25 **[0009]** Existe la necesidad de métodos específicos y fiables para la detección y diagnóstico de toxicidad muscular inducida por estatina, además de marcadores útiles a este respecto. También existe la necesidad de mejoras de las pautas de tratamiento existentes con estatinas o fármacos hipolipemiantes.

#### Sumario de la invención

- 30 **[0010]** La presente invención proporciona, entre otras cosas, novedosos marcadores lipidómicos, también denominados en el presente documento "biomarcadores", para la detección y diagnóstico de toxicidad muscular inducida por estatina, tal como toxicidad muscular inducida por estatina asociada a enfermedad muscular, distrofia muscular, mialgia, miositis, miopatía o rabdomiólisis.
- 35 **[0011]** En un aspecto de la presente invención, métodos, anticuerpos y usos de los anticuerpos o kits se reivindican en el presente documento para detectar efectos secundarios musculares asociados a estatina, desde mialgias no específicas o atípicas hasta miopatía y el síndrome de rabdomiólisis completa. Las mialgias se definen como dolor muscular o enfermedades de músculos doloridos que pueden tanto ser generalizadas como localizadas. La miopatía, aunque es menos catastrófica que la rabdomiólisis, también puede producirse después del tratamiento con estatinas y se define como dolor muscular y/o debilidad con elevados niveles de CK de al menos 10 veces el límite superior del normal.
- 40 **[0012]** Los métodos según la invención pueden, por ejemplo, comprender las etapas de: a) proporcionar una muestra biológica de un sujeto que está tratándose, que va a tratarse, o que ha sido tratado con una estatina; b) determinar la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos identificados en el presente documento como marcadores lipidómicos útiles según la invención en dicha muestra; y c) comparar dicha(s) concentración (concentraciones) de lípidos determinada(s) con concentración (concentraciones) de lípidos correspondiente(s) en un control.
- 50 **[0013]** Los marcadores lipidómicos de la presente invención permiten la detección sensible de toxicidad muscular inducida por estatina. Se apreciará que lo mismo se aplica a las complicaciones de toxicidad muscular inducida por estatina. Esto facilitará mejorar el cuidado del paciente, reducir el desarrollo de síntomas y sufrimiento, y lograr morbilidad/mortalidad reducida asociada a efectos secundarios de estatina. Así, los marcadores lipidómicos descritos y reivindicados en el presente documento permiten la adaptación individual de la intervención del fármaco con respecto a pacientes tratados, o que van a tratarse, con estatinas. Por tanto, la invención es aplicable a experimentos en animales en los que se prueban estatinas y compuestos tipo estatina. La invención permitirá, entre otras cosas, una mejor evaluación de la seguridad de novedosas medicaciones hipolipemiantes que van a prepararse.
- 60 **[0014]** Por consiguiente, la invención proporciona un método para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más complicaciones seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos, en el que (una) concentración (concentraciones) elevada(s) o reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control,
- 65

es (son) indicativa(s) de que dicho sujeto padece o está en riesgo de desarrollar dicha toxicidad muscular inducida por estatina y/o dicha(s) complicación (complicaciones), en el que el uno o más lípidos cuyo aumento en concentración se compara(n) con el control se seleccionan de: 12-HETE, 15-HETE, AA, Cer(d18:1/20:0), 12-HEPE y PGE2; y en el que el uno o más lípidos cuya disminución en concentración se compara(n) con el control se seleccionan de: 14\_15-DHET y 8\_9-DHET.

**[0015]** También se proporciona por la invención un método para determinar si el tratamiento con una estatina y/o un fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos, en el que (una) concentración (concentraciones) elevada(s) o reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de dicho tratamiento que requiere ajuste, en el que el uno o más lípidos cuyo aumento en concentración se compara(n) con el control se seleccionan de: 12-HETE, 15-HETE, AA, Cer(d18:1/20:0), 12-HEPE y PGE2; y en el que el uno o más lípidos cuya disminución en concentración se compara(n) con el control se seleccionan de: 14\_15-DHET y 8\_9-DHET.

**[0016]** Se describe en el presente documento un método para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina y/o una o más de sus complicaciones, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto una o más relación (relaciones) de concentraciones lípido-lípido, en el que (una) relación (relaciones) de concentraciones de lípido-lípido elevada(s) o reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de que dicho sujeto padece dicha toxicidad muscular inducida por estatina y/o dicha(s) complicación (complicaciones), en el que la una o más relaciones de concentración lípido-lípido cuyo aumento se controla con el control se seleccionan de: 12-HETE/15-HETrE, 12-HETE/14\_15-DHET, 12-HETE/Gb3(d18:1/16:0), 12-HETE/Glc/GalCer(d18:1/24:1), 12-HETE/Glc/GalCer(d18:1/18:0), Gb3(d18:1/24:1)/LacCer(d18:1/16:0), LacCer(d18:1/22:0)/LacCer(d18:1/24:1), Cer(d18:1/20:0)/Glc/GalCer(d18:1/24:1) (**Tabla 5**); y en el que la una o más relaciones de concentración lípido-lípido cuya disminución se compara con el control se seleccionan de LacCer(d18:1/16:0)/LacCer(d18:1/22:0), Gb3(d18:1/16:0)/Gb3(d18:1/24:1) y 11-HETE/12-HETE (**Tabla 5**)

**[0017]** En el presente documento se describe además un método para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina y/o una o más de sus complicaciones, en el que el sujeto es femenino, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos, en el que (una) concentración (concentraciones) reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de que dicho sujeto padece dicha toxicidad muscular inducida por estatina y/o dicha(s) complicación (complicaciones), en el que el uno o más lípidos cuya disminución en concentración se compara con el control se seleccionan de: LacCer total, LacCer(d18:1/16:0) y Glc/GalCer(d18:1/24:1) (véase la **Tabla 3**).

**[0018]** En el presente documento también se describe un método para determinar si el tratamiento con estatina y/o el tratamiento con un fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto una o más relaciones de concentración lípido-lípido, en el que (una) relación (relaciones) de concentración lípido-lípido elevada(s) o reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de que dicho tratamiento requiere ajuste, en el que la una o más relaciones de concentración lípido-lípido cuyo aumento se controla con el control se seleccionan de: 12-HETE/15-HETrE, 12-HETE/14\_15-DHET, 12-HETE/Gb3(d18:1/16:0), 12-HETE/Glc/GalCer(d18:1/24:1), 12-HETE/Glc/GalCer(d18:1/18:0), Gb3(d18:1/24:1)/LacCer(d18:1/16:0), LacCer(d18:1/22:0)/LacCer(d18:1/24:1), Cer(d18:1/20:0)/Glc/GalCer(d18:1/24:1) (**Tabla 5**); y en el que la una o más relaciones de concentración lípido-lípido cuya disminución se compara con el control se seleccionan de LacCer(d18:1/16:0)/LacCer(d18:1/22:0), Gb3(d18:1/16:0)/Gb3(d18:1/24:1) y 11-HETE/12-HETE (**Tabla 5**)

**[0019]** En el presente documento también se describe un método para determinar si el tratamiento con estatina y/o el tratamiento con un fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste, en el que el sujeto es femenino, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos, en el que (una) concentración (concentraciones) reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de que dicho tratamiento requiere ajuste, en el que el uno o más lípidos cuya disminución en concentración se compara con el control se seleccionan de: LacCer total, LacCer(d18:1/16:0) y Glc/GalCer(d18:1/24:1) (véase la **Tabla 3**).

**[0020]** En una realización preferida, el lípido cuyo aumento en la concentración se compara con el control es 12-HETE.

**[0021]** Con el fin del método para determinar si el tratamiento con estatina o el tratamiento con un fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste, el ajuste de dicho tratamiento con estatina puede comprender (a) una reducción de la dosis de estatina; (b) un cese del tratamiento con estatina; (c) un reinicio del tratamiento con estatina; (d) un cambio a un fármaco de estatina diferente; o (e) un cambio a un fármaco hipolipemiente diferente.

**[0022]** En otra realización, los métodos de la invención pueden usarse para evaluar el grado de toxicidad muscular inducida por una estatina novedosa o una medicación hipolipemiente novedosa en un sujeto que recibe un tratamiento con dicha estatina o medicación hipolipemiente.

5 **[0023]** Los métodos de la invención pueden usarse para determinar signos de aviso precoces de toxicidad muscular en dicho sujeto.

**[0024]** Además, o alternativamente, los métodos pueden usarse para determinar si los síntomas de toxicidad muscular encontrados en un sujeto son debidos a toxicidad muscular inducida por estatina.

10

**[0025]** Para los fines de los métodos descritos y/o reivindicados en el presente documento, al menos una concentración de lípido de las Tablas **3** o **4** o relación de concentración lípido-lípido de la **Tabla 5** puede determinarse para evaluar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina y/o una o más de sus complicaciones, o para determinar si el tratamiento con estatina o tratamiento con un

15

fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste. Sin embargo, también es posible, y puede ser ventajoso, determinar al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, o al menos 8 concentraciones de lípidos de las Tablas **3** o **4**, o al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, o al menos 8 relaciones de concentración lípido-lípido de la **Tabla 5**. Si se determina y se usa más de un marcador lipídico para la evaluación, puede ser ventajoso que, a una concentración de lípido o relación de concentración

20

**[0026]** Los métodos de la invención engloban la determinación de (una) concentración (concentraciones) de lípidos en una muestra de un sujeto que está tratándose con una o más estatinas.

25 **[0027]** Alternativamente, los métodos de la invención engloban la determinación de (una) concentración (concentraciones) de lípidos en una muestra de un sujeto que había recibido tratamiento con estatina, pero suspendió dicho tratamiento, por ejemplo, debido a la aparición de dolor muscular.

30 **[0028]** En otra alternativa, los métodos de la invención engloban la determinación de (una) concentración (concentraciones) de lípidos en una muestra de un sujeto que todavía no ha sido tratado con estatinas.

**[0029]** Los métodos de la invención pueden englobar adicionalmente la determinación de (una) concentración (concentraciones) de lípidos en una muestra de un sujeto que tiene un alto riesgo de desarrollar toxicidad muscular inducida por estatina.

35

**[0030]** Para los fines de los métodos de la invención, se hace una comparación de la muestra del sujeto con respecto a un control.

40 **[0031]** En una realización preferida, el control es, por ejemplo, una muestra de control, preferentemente una muestra de control que se corresponde con la muestra del sujeto.

**[0032]** En una realización preferida, la muestra de control es del mismo sujeto que recibe tratamiento con estatina, pero antes de la aparición de la toxicidad muscular. El control también puede ser, sin embargo, una muestra del mismo sujeto antes del tratamiento con estatina o durante la suspensión del tratamiento con estatina. En otra

45

realización preferida, también puede ser de otro sujeto sin signos o historia de toxicidad muscular inducida por estatina.

**[0033]** En otra realización preferida, el control es una muestra de control de una población de sujetos sin signos o historia de toxicidad muscular inducida por estatina.

50

**[0034]** En otra realización preferida más, sin embargo, el control no es una muestra, sino simplemente un valor de control establecido de uno o más sujetos no en tratamiento con estatina y sin signos o historia de toxicidad muscular. Alternativamente, el control puede ser ventajosamente un valor de control establecido de uno o más sujetos en tratamiento con estatina y sin signos o historia de toxicidad muscular.

55

**[0035]** Según la presente invención, la(s) concentración (concentraciones) del (de los) lípido(s) individual(es) en la muestra del sujeto se compara(n) preferentemente con la(s) concentración (concentraciones) del (de los) lípido(s) correspondiente(s) en el control, sea una muestra de control o un valor de control, para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina (o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones), o para determinar si el tratamiento con estatina o tratamiento con un fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste. Algunos ejemplos ilustrativos de las comparaciones que pueden hacerse entre una muestra del sujeto y un control se muestran en la tabla a continuación:

60

**Tabla 1.** Ejemplo de los pares de comparaciones entre una muestra del sujeto y un control.

Pares de comparaciones			
	Caso	Control	Lectura
1	Sujeto con estatina con toxicidad muscular o un sujeto en alto riesgo con estatina sin toxicidad muscular	Sujeto(s) con estatina sin toxicidad muscular	Aumento o disminución en la concentración de lípido(s) en las <b>Tablas 3 o 4</b>
2	Sujeto con estatina con toxicidad muscular	Mismo sujeto con estatina antes de la toxicidad muscular	Aumento o disminución en la concentración de lípido(s) en las <b>Tablas 3 o 4</b>
3	Sujeto con estatina con toxicidad muscular	Mismo sujeto antes de la terapia con estatina	Cambio o ausencia de cambio en la concentración de lípido(s) en las <b>Tablas 3 o 4</b> , por ejemplo, a) elevada concentración de 12-HETE, b) reducida concentración de lípidos "reducidos", c) ausencia de cambio en los lípidos restantes
4	Sujeto con estatina con toxicidad muscular	Mismo sujeto después de la retirada de estatina	Cambio o ausencia de cambio en la concentración de lípido(s) en las <b>Tablas 3 o 4</b> , por ejemplo, a) elevada concentración de 12-HETE, b) reducida concentración de lípidos "reducidos", c) ausencia de cambio en los lípidos restantes

**[0036]** Por otra parte, la comparación según la presente invención de la(s) concentración (concentraciones) del (de los) lípido(s) individual(es) en la muestra de dicho sujeto también puede hacerse con la(s) concentración (concentraciones) de otra(s) molécula(s) individual(es) en el control, de nuevo tanto muestra de control como valor de control, para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina (o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones), o para determinar si el tratamiento con estatina o tratamiento con un fármaco hipolipemiante de un sujeto necesita ajuste. Tal(es) otra(s) molécula(s) individual(es) en el control es (son) preferentemente moléculas en las que la(s) concentración (concentraciones) de las mismas es similar, o esencialmente similar, en todos o al menos la mayoría de los sujetos, de manera que la(s) concentración (concentraciones) sea(n) adecuada(s) como punto de referencia para determinar si hay un aumento o disminución en dicha muestra con respecto a los marcadores lipídicos según la invención. A este respecto se prefiere(n), por ejemplo, otro(s) lípido(s). También se prefiere(n) a este respecto, por ejemplo, (una) proteína(s). A este respecto se prefiere(n) particularmente (una) molécula(s) en el control que se mide(n) regularmente en un entorno clínico. Por ejemplo, se prefieren realizaciones en las que la comparación se hace con la concentración de apoA, apoB, albúmina o PC total en el control (de nuevo la muestra de control o valor de control), o combinaciones de los mismos.

**[0037]** En otra realización, los métodos de la invención pueden comprender además determinar o evaluar el nivel de creatina cinasa (CK) en el sujeto o en una muestra del sujeto. En una realización de la invención, el sujeto tiene elevados niveles de creatina cinasa. En otra realización de la invención, el sujeto no tiene elevados niveles de creatina cinasa.

**[0038]** Según los métodos de la invención, la muestra puede ser plasma sanguíneo, suero sanguíneo, o tejido de biopsia de músculo. La muestra también puede ser una fracción de sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo, por ejemplo, una fracción de lipoproteínas. Puede prepararse una muestra de sangre y de la misma pueden separarse plasma o suero, o fracciones de los mismos, con técnicas muy conocidas para el experto en la materia. Alternativamente, tanto la muestra del sujeto como la muestra de control también pueden ser una muestra de orina o una muestra de tejido, por ejemplo, tejido de biopsia de músculo.

**[0039]** La recogida de información sobre un marcador lipídico según los métodos de la presente invención de la muestra del sujeto, y también de la muestra de control, puede realizarse mediante diversas técnicas químicas y analíticas de alta resolución. Técnicas analíticas particularmente adecuadas incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. De hecho, cualquier técnica de alta resolución que pueda resolver lípidos individuales o clases de lípidos y proporcionar información estructural de los mismos puede usarse para determinar los marcadores lipídicos según la invención de la muestra del sujeto, y también de la muestra de control. Para los fines de los métodos de la presente invención, la concentración (concentraciones) de lípidos se determina(n) así preferentemente usando espectrometría de masas. Sin embargo, a este respecto también son útiles espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopia de fluorescencia o interferometría de doble polarización, métodos de separación de alto rendimiento tales como HPLC o UPLC, un inmunoensayo tal como un ELISA y/o el uso de un resto de unión que puede unirse específicamente al analito de lípido.

**[0040]** Como se indica anteriormente, según una realización alternativa o adicional de los métodos de la invención, un analito de lípido en una muestra puede detectarse y/o cuantificarse combinando el analito con un resto de unión que puede unirse específicamente al analito. El resto de unión puede incluir, por ejemplo, un miembro de un par de ligando-receptor, es decir, un par de moléculas que pueden tener una interacción de unión específica. El resto de unión también puede incluir, por ejemplo, un miembro de un par de unión específica, tal como anticuerpo-antígeno, enzima-sustrato, ligandos basados en ácido nucleico, otros ligandos de proteína, u otros pares de unión específica conocidos en la técnica.

**[0041]** En una realización particularmente preferida, los marcadores lipídicos de la presente invención se determinan con espectrometría de masas (EM), en el que el instrumento de EM está opcionalmente acoplado a métodos de infusión directa y/o métodos de separación de alto rendimiento tales como HPLC o UPLC. La cantidad de lípidos individuales o clases de lípidos en los marcadores lipídicos recogidos se usa cuando se compara el perfil de lípidos recogido con un control.

**[0042]** En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo que puede unirse a uno cualquiera de los lípidos en los métodos reivindicados para su uso en prevenir o tratar toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones en un sujeto seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis. Similarmente, la presente invención se refiere a un uso de un anticuerpo que puede unirse a uno cualquiera de los lípidos en los métodos reivindicados para predecir o diagnosticar toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis.

**[0043]** Por ejemplo, como los metabolitos derivados de 12/15-lipoxigenasa o ciclooxigenasa-2 pueden relacionarse con señalización del dolor (Mathie A. Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain. *J Pharm Pharmacol.* Sep 2010; 62(9):1089-95; Ma W, Quirion R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neurosci Lett.* 6 jun 2008; 437(3):165-9; Xie C, Wang DH. Inhibition of Renin Release by Arachidonic Acid Metabolites, 12(s)-HPETE and 12-HETE: Role of TRPV1 Channels. *Endocrinology.* 2011 Oct; 152(10):3811-9), la inhibición de una o ambas de estas vías metabólicas con un agente puede ofrecer (un) mecanismo(s) eficaz (eficaces) para tratar o prevenir toxicidad muscular inducida por estatina o dolor muscular producido por toxicidad muscular inducida por estatina.

**[0044]** Las ceramidas son conocidas por activar la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2), que conduce a elevados niveles de 12-HETE mediante la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos (Pettus BJ, Bielawska A, Subramanian P, Wijesinghe DS, Maceyka M, Leslie CC, Evans JH, Freiberg J, Roddy P, Hannun YA, Chalfant CE. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem.* 19 mar 2004; 279(12):11320-6. Epub 2003 Dec 15; Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist.* Jun 2006; 12(3):245-60; Nanda BL, Nataraju A, Rajesh R, Rangappa KS, Shekar MA, Vishwanath BS. PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants--a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7(8):765-77). Como la presente invención muestra que las ceramidas y 12-HETE están regulados por incremento en toxicidad muscular inducida por estatina, la inhibición de la síntesis de ceramidas y/o la producción de ácido araquidónico con un agente también puede ser útil en el tratamiento o prevención de toxicidad muscular inducida por estatina o dolor muscular producido por toxicidad muscular inducida por estatina. Por ejemplo, como los eicosanoides participan en el metabolismo del ácido araquidónico (Zeldin, DC. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *JBC.* 2001. 276 (39):36059-36062), pueden ser una diana apropiada para un agente para inhibir toxicidad muscular inducida por estatina.

**[0045]** También se describe en el presente documento un agente para su uso en prevenir o tratar toxicidad muscular inducida por estatina y/o una o más de sus complicaciones en un sujeto, en el que el agente afecta la actividad, funcionalidad o concentración de una enzima, en el que dicha enzima cataliza una reacción que produce o degrada uno cualquiera de los lípidos en las Tablas 3, 4 o 5.

**[0046]** También se describe en el presente documento un método para prevenir o tratar toxicidad muscular inducida por estatina y/o una o más de sus complicaciones en un sujeto usando, o administrando un agente, en el que el agente afecta la actividad, funcionalidad o concentración de una enzima, en el que dicha enzima cataliza una reacción que produce o degrada uno cualquiera de los lípidos en las Tablas 3, 4 o 5.

**[0047]** En el presente documento se describe además un kit para predecir la toxicidad muscular inducida por estatina y/o una o más de sus complicaciones, o para realizar los métodos o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento, en el que el kit comprende reactivos y compuestos de referencia. Los compuestos de referencia pueden ser uno o más de los siguientes, pero no se limitan a: (a) un patrón (o patrones) de lípidos seleccionados de los lípidos de las Tablas 3, 4 o 5, (b) uno o más marcadores de control (por ejemplo, un lípido o lípidos, preferentemente un lípido correspondiente a cualquiera de los marcadores lipídicos descritos y/o reivindicados en el presente documento, u otro lípido (o lípidos), por ejemplo, PC total, u otra molécula, por ejemplo, una proteína; c) controles positivos y/o negativos; d) patrones internos y/o externos; e) controles de la línea de

calibración; (f) un anticuerpo u otro resto de unión que pueda unirse a cualquiera de los lípidos en las Tablas 3, 4 o 5. Los reactivos son disolución (disoluciones), disolvente(s) y/o tampón (tampones) útiles para realizar dichos métodos o usos.

5 **[0048]** También se engloba por la presente invención un uso de un kit para (i) predecir toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis, en el que el uso de dicho kit es para analizar el nivel de dicho uno o más de los lípidos definidos en los métodos reivindicados en una muestra biológica, y compararlo con un control; o para (ii) realizar los métodos reivindicados; en el que el kit comprende :

10

(a) un patrón (o patrones) de lípidos seleccionados de los lípidos definidos en los métodos reivindicados; y opcionalmente uno o más compuestos de referencia adicionales seleccionados de:

(b) uno o más marcadores de control, tales como un lípido o lípidos, por ejemplo, un lípido como se define en los métodos reivindicados, o una proteína;

15

(c) controles positivos y/o negativos;

(d) patrones internos y/o externos;

(e) controles de la línea de calibración; y

(f) un agente, opcionalmente un anticuerpo, que puede unirse a uno cualquiera de los lípidos definidos en los métodos reivindicados; y

20

(g) (un) reactivo(s) para realizar dichos métodos o usos.

**[0049]** Los kits descritos en el presente documento pueden comprender, por ejemplo, las siguientes combinaciones de los constituyentes anteriormente enumerados: (a) y (b), y opcionalmente (g); (a) y (c), y opcionalmente (g); (a) y (d), y opcionalmente (g); (a) y (e), y opcionalmente (g); (a) y (f), y opcionalmente (g); (a), (b) y (c), y opcionalmente (g); (a), (c) y (d), y opcionalmente (g); (a), (d) y (e), y opcionalmente (g); o (a), (e) y (f), y opcionalmente (g).

**[0050]** En una realización preferida, el uno o más marcadores de control del kit según el uso reivindicado de un kit es/son (una) molécula(s) que se mide(n) regularmente en un entorno clínico. Por ejemplo, se prefieren realizaciones en las que el uno o más de dichos marcadores de control es CK.

**[0051]** En una realización preferida, el uso del kit es para predecir toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones, o para realizar cualquiera de los métodos englobados por la presente invención, en el que la concentración (concentraciones) de lípidos en una muestra de un sujeto se determina(n) usando espectrometría de masas. La muestra puede someterse a una purificación y/u otra(s) etapa(s) previa(s) a la preparación de muestras antes del análisis por espectrometría de masas. La etapa de purificación puede ser, pero no se limita a, cromatografía, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y/o cromatografía líquida de resolución ultra-alta (UHPLC). La etapa previa a la preparación de muestras puede ser, pero no se limita a, extracción en fase sólida (SPE), derivatización y/o extracción líquido-líquido. Dicha determinación por espectrometría de masas puede hacerse por espectrometría de masas en tándem.

**[0052]** También se describe en el presente documento una estatina o un fármaco hipolipemiente para su uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones, en el que dicho sujeto se identificaría como que está en riesgo de desarrollar o como que padece toxicidad muscular inducida por estatina cuando se aplica cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento. También se describe en el presente documento un método para tratar un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones con una estatina o un fármaco hipolipemiente, en el que dicho sujeto se identificaría como que está en riesgo de desarrollar o como que padece toxicidad muscular inducida por estatina cuando se aplica cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento.

**[0053]** También se describe en el presente documento una estatina o un fármaco hipolipemiente para su uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones, en el que dicho sujeto ha sido identificado en realidad como que está en riesgo de desarrollar o como que padece toxicidad muscular inducida por estatina por cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento. También se describe en el presente documento un método para tratar un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones con una estatina o un fármaco hipolipemiente, en el que dicho sujeto ha sido identificado en realidad como que está en riesgo de desarrollar o como que padece toxicidad muscular inducida por estatina por cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento.

**[0054]** También se describe en el presente documento una estatina o un fármaco hipolipemiente para su uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD)



- y/o una o más de sus complicaciones, en el que dicho sujeto se identificaría como que no está en riesgo de desarrollar o como que no padece toxicidad muscular inducida por estatina cuando se aplica cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento. También se describe en el presente documento un método para tratar un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones con una estatina o un fármaco hipolipemiente, en el que dicho sujeto se identificaría como que no está en riesgo de desarrollar o como que no padece toxicidad muscular inducida por estatina cuando se aplica cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento.
- 10 **[0055]** También se describe en el presente documento una estatina o un fármaco hipolipemiente para su uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones, en el que dicho sujeto ha sido identificado en realidad como que no está en riesgo de desarrollar o como que no padece toxicidad muscular inducida por estatina por cualquiera de los métodos, agentes, kits o usos descritos y/o reivindicados en el presente documento.
- 15 **[0056]** También se describe en el presente documento una estatina o un fármaco hipolipemiente para su uso en el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones, en el que dicho tratamiento es, o ha sido, evaluado usando cualquiera de los métodos para determinar la necesidad de ajuste del tratamiento descrito y/o reivindicado en el presente documento, y en el que dicho tratamiento es, o ha sido, ajustado consecuentemente. También se describe en el presente documento un método para tratar un sujeto en riesgo de desarrollar o que padece aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (CVD) y/o una o más de sus complicaciones con una estatina o un fármaco hipolipemiente, en el que dicho tratamiento es, o ha sido, evaluado usando cualquiera de los métodos para determinar la necesidad de ajuste del tratamiento descrito y/o reivindicado en el presente documento, y en el que, opcionalmente, dicho tratamiento es, o ha sido, ajustado consecuentemente. Tal ajuste puede comprender adecuadamente, pero no se limita a: (a) una reducción de la dosis de estatina; (b) un cese del tratamiento con estatina; (c) un reinicio del tratamiento con estatina; (d) un cambio a un fármaco de estatina diferente; (e) un cambio a un fármaco hipolipemiente diferente; o (f) un cese de otro tratamiento con fármaco que condujo a toxicidad muscular debido a su interacción con una o más estatinas.
- 30 **[0057]** En el contexto de todos los aspectos y realizaciones de la invención, una estatina puede ser una seleccionada de, pero no se limitan a, el grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, fluvastatina XL, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y/o simvastatina.
- 35 **[0058]** En el contexto de todos los aspectos y realizaciones de la invención, la determinación de la concentración (concentraciones) de lípidos o relación (relaciones) de concentraciones de lípido-lípido normalmente se realiza usando un ensayo.
- 40 **[0059]** En el contexto de todos los aspectos y realizaciones de la invención, la toxicidad muscular puede asociarse a una enfermedad muscular, por ejemplo, una distrofia muscular.
- 45

**[0060]** En el contexto de todos los aspectos y realizaciones de la invención, las complicaciones de la toxicidad muscular inducida por estatina incluyen en particular aquellas seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabiomiólisis. La miopatía o miositis por estatina normalmente se caracteriza por dolor muscular (mialgia), debilidad muscular, dolor de articulaciones o rabiomiólisis.

50

### Descripción detallada de la invención

**[0061]** La presente invención es el resultado de aplicar lipidómica a la identificación de biomarcadores indicativos de toxicidad muscular inducida por estatina. Facilitará la misión de asegurar que el individuo adecuado recibe la estatina adecuada o fármaco hipocolesterolemiente en el momento adecuado y dosis, abriendo así este área terapéutica hacia personalizar medicinas y/o pautas de tratamiento hasta ahora más generalmente aplicadas.

55

**[0062]** Debido a tanto la alta sensibilidad como especificidad de la lipidómica, pueden analizarse incluso las cantidades de muestra más pequeñas.

60

**[0063]** Según la presente invención, los lípidos pueden analizarse mediante una variedad de técnicas. En el contexto de la presente invención, la lipidómica basada en espectrometría de masas de ionización por electropulverización es la tecnología preferida. La calidad y especificidad superior de los métodos de análisis aleatorio y dirigido cumplirán patrones reguladores rigurosos, tales como normas de buenas prácticas de laboratorio

65

(GLP) cuando se establecen en el entorno adecuado.

**[0064]** Como se usa en el presente documento, *toxicidad muscular* es un cambio adverso en la(s) célula(s) de músculo y/o tejido de músculo inducido por un fármaco.

**[0065]** Como se usa en el presente documento, *miopatía* es un término general con referencia a cualquier enfermedad de los músculos; las miopatías pueden ser adquiridas o heredadas y pueden producirse al nacer o después en la vida (Fuente: Página de NINDS Myopathy-[http://accessible.ninds.nih.gov/health\\_and\\_medical/disorders/myopathy.htm](http://accessible.ninds.nih.gov/health_and_medical/disorders/myopathy.htm)).

**[0066]** Como se usa en el presente documento, *mialgia* es un término que describe dolor o debilidad muscular sin elevación de creatina cinasa (CK).

**[0067]** Como se usa en el presente documento, *miositis* es un término para describir síntomas musculares con elevados niveles de CK.

**[0068]** *Rabdomiólisis*, como se usa en el presente documento, se caracteriza por síntomas musculares con marcada elevación de CK (normalmente sustancialmente superior a 10 veces el límite superior del normal [ULN]) y con elevación de creatinina (normalmente con orina marrón y mioglobina urinaria).

**[0069]** Una *enfermedad muscular*, como se usa en el presente documento, es cualquier enfermedad o trastorno que afecte el sistema muscular.

**[0070]** Una *distrofia muscular*, como se usa en el presente documento, es una enfermedad muscular hereditaria que debilita los músculos. Las distrofias musculares se caracterizan por debilidad progresiva de músculo esquelético, defectos en proteínas musculares y la muerte de células musculares y tejido. Las distrofias musculares pueden incluir enfermedades de Duchenne, Becker, de cinturas, congénita, facioescapulohumeral, miotónica, oculofaríngea, distal y/o de Emery-Dreifuss.

**[0071]** Como se usa en el presente documento, una *complicación de aterosclerosis o CVD* incluye en particular una complicación seleccionada de infarto de miocardio (IM), IMA, angina de pecho, ataque isquémico transitorio (AIT), accidente cerebrovascular y muerte.

**[0072]** Algunas abreviaturas usadas en el presente documento tienen el siguiente significado: *CK* es creatina cinasa, *ADR* es reacción adversa al fármaco, *EM* es espectrometría de masas, *HPLC* es cromatografía líquida de alta resolución y *UPLC* es cromatografía líquida de resolución ultra-alta, *ROC* es características operativas del receptor, y *ABC* es área bajo la curva.

**[0073]** Elevaciones de creatina cinasa de moderadas a graves son aquellas consideradas superiores a 10 veces ULN o superiores a 10.000 UI/l. La elevación de CK leve se considera que es superior a ULN, pero inferior a 10 veces el ULN (Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700; Joy TR and Hegele RA, Narrative review: statin-related myopathy. Ann Intern Med. 16 Jun 2009; 150(12):858-68).

**[0074]** Una *estatina* y un *tratamiento con estatina*, respectivamente, según la presente invención, serán preferentemente las siguientes estatinas y tratamientos con las mismas, respectivamente: cerivastatina (0,4 mg/d, Phillips PS et al: Statin-Associated Myopathy with Normal Creatine Kinase Levels. Ann Intern Med. 2002;137:581-585; Evans M and Rees A: The myotoxicity of statins. Current Opinion in Lipidology. 2002, 13:415-420); fluvastatina (80 mg/d, Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700); fluvastatina XL (80 mg/d, Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700); lovastatina (40 mg/d, Phillips PS et al: Statin-Associated Myopathy with Normal Creatine Kinase Levels. Ann Intern Med. 2002;137:581-585); pravastatina (40 mg/d, Phillips PS et al: Statin-Associated Myopathy with Normal Creatine Kinase Levels. Ann Intern Med. 2002;137:581-585; Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700); rosuvastatina (2,5 a 20 mg, 1 a 7 veces a la semana, con una realización preferida de 5 o 10 mg por día, Joy TR and Hegele RA, Narrative review: statin-related myopathy. Ann Intern Med. 16 jun 2009; 150(12):858-68); Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700); atorvastatina (10 o 20 mg/d, Phillips PS et al: Statin-Associated Myopathy with Normal Creatine Kinase Levels. Ann Intern Med. 2002; 137:581-585); 40 mg/d (Laaksonen R, et al: A Systems Biology Strategy Reveals Biological Pathways and Plasma Biomarker Candidates for Potentially Toxic Statin-Induced Changes in Muscle. PLoS ONE. Diciembre 2006, Issue 1, e97: 1-9); 40 u 80 mg/d (Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700); y/o simvastatina (40 u 80 mg/d, Phillips PS et al: Statin-Associated Myopathy with Normal Creatine Kinase Levels. Ann Intern Med. 2002;137:581-585); 80 mg/d

(Laaksonen R, et al: A Systems Biology Strategy Reveals Biological Pathways and Plasma Biomarker Candidates for Potentially Toxic Statin-Induced Changes in Muscle. PLoS ONE. December 2006, Issue 1, e97: 1-9; Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700). Alternativamente, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina, atorvastatina y/o simvastatina pueden administrarse a 40 mg/d (Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free" Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700). Este tratamiento también puede comprender o puede no comprender la administración de un fibrato o ezetimiba (10 mg/d, Jacobson TA, et al: Toward "Pain-Free Statin Prescribing: Clinical Algorithm for Diagnosis and Management of Myalgia. Mayo Clin Proc. June 2008; 83(6):687-700). Colesevelam puede administrarse adicionalmente con ezetimiba a una dosis de 3,75 g/d (Joy TR and Hegele RA, Narrative review: statin-related myopathy. Ann Intern Med. 16 jun 2009; 150(12):858-68).

**[0075]** Para los fines de la presente invención, un *fármaco hipolipemiante* o medicación es preferentemente un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, niacina (ácido nicotínico), un inhibidor de la absorción de colesterol, un inhibidor de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), un secuestrante de ácidos biliares; un fibrato o un fitosterol.

**[0076]** Para los fines de la presente invención, un *inhibidor de la absorción de colesterol* es preferentemente ezetimiba o SCH-48461; un *inhibidor de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)* es preferentemente torcetrapib, anacetrapib o dalcetrapib; un *secuestrante de ácidos biliares* es preferentemente colesevelam, colestiramina o colestipol; y un fibrato es preferentemente fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato o bezafibrato.

**[0077]** Como se usa en el presente documento, un *sujeto* incluye todos los mamíferos, que incluyen sin limitación seres humanos, pero también primates no humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, conejos, cerdos y roedores. Un sujeto particularmente preferido según la presente invención es un ser humano.

**[0078]** Como se usa en el presente documento, un *sujeto en alto riesgo* normalmente es un sujeto, particularmente un ser humano, con alta dosis de estatina y/o con múltiples medicaciones (que causan un riesgo de interacciones de fármacos), que tiene una enfermedad muscular conocida, o que tiene una enfermedad que puede aumentar el riesgo de acontecimientos adversos (por ejemplo, hipotiroidismo, insuficiencia renal o una enfermedad hepática).

**[0079]** Como se usa en el presente documento, un *control* puede ser una muestra de control o simplemente un valor de control. En caso de que sea un valor de control, se apreciará que ya puede haber sido determinado, calculado o extrapolado antes de iniciar los métodos de la invención. Alternativamente, el valor de control puede determinarse, calcularse o extrapolarse después de realizar la determinación de la(s) concentración (concentraciones) de dicho uno o más lípidos, según los métodos de la presente invención. Así, se apreciará que un valor de control adecuado según la presente invención puede ser adecuadamente uno que se toma de la bibliografía.

**[0080]** Una *muestra*, como se usa en el presente documento, se define como cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto o un grupo o población de sujetos. Para los fines de la presente invención, la muestra biológica puede ser sangre completa, suero sanguíneo o plasma sanguíneo, prefiriéndose suero sanguíneo y plasma sanguíneo. La muestra también puede ser orina. El tomar una muestra de sangre y/o de orina de un paciente es una parte de la práctica clínica normal. La muestra de sangre puede tomarse a propósito de, por ejemplo, medir los niveles de colesterol en los pacientes. Puede prepararse la muestra de sangre recogida y pueden separarse suero o plasma con técnicas muy conocidas para un experto en la materia. Pueden recogerse muestras de sangre venosa de pacientes usando una aguja y tubos de plástico BD Vacutainer® o tubos de plástico Vacutainer® Plus (los tubos BD Vacutainer® SST™ contienen sílice recubierta por pulverización y un gel de polímero para la separación de suero). El suero puede separarse por centrifugación a 1300 RCF durante 10 min a temperatura ambiente y guardarse en pequeños tubos de plástico a -80 °C. La muestra de orina puede recogerse y prepararse con técnicas bien conocidas para un experto en la materia. La muestra también puede ser una fracción de sangre completa, plasma sanguíneo o suero sanguíneo, por ejemplo, una fracción de lipoproteínas. En otra realización preferida, la muestra también puede ser una muestra de tejido, por ejemplo, tejido de biopsia de músculo.

**[0081]** Los lípidos u otras moléculas en el control con el que se hace la comparación según la presente invención también se denominan en el presente documento *marcadores de control*.

**[0082]** Como se usa en el presente documento, la referencia a una muestra de control *del mismo sujeto o de otro sujeto* puede significar que la muestra de control se ha obtenido directamente de dicho sujeto. Alternativamente, sin embargo, también puede significar que se ha obtenido como resultado de un tratamiento físico o químico de una muestra directamente obtenida o tomada de dicho sujeto, tal como centrifugación, fraccionamiento, digestión enzimática, precipitación y similares. Lo mismo se aplica a cualquier referencia en el presente documento a una muestra de control *de un grupo de sujetos o de una población de sujetos*.

65

**[0083]** Las expresiones *muestra de control de un grupo de sujetos* o *muestra de control de una población de sujetos*, como se usan en el presente documento, conllevan además preferentemente que la muestra de control es representativa de dicho grupo o población. En este contexto, *representativa* debe significar que la(s) concentración (concentraciones) del uno o más lípidos en dicha muestra de control con la que se hace una comparación en el contexto de la presente invención se corresponde con la concentración (concentraciones) promedio de dicho(s) lípido(s) en muestras individuales correspondientes de los sujetos de dicho grupo o población. Preferentemente, las concentraciones de todos los lípidos en dicha muestra de control se corresponden con las concentraciones promedio de dichos lípidos en muestras individuales correspondientes de los sujetos de dicho grupo o población. Asimismo, si se hace una comparación en el contexto de la presente invención con una o varias de otras moléculas, por ejemplo, otros lípidos o proteínas, tales como PC total, o apoA, apoB, o albúmina, respectivamente, una muestra de control *representativa* es una en la que la(s) concentración (concentraciones) de esta(s) molécula(s) se corresponde(n) con la(s) concentración (concentraciones) promedio de dicha(s) molécula(s) en muestras individuales correspondientes de los sujetos de dicho grupo o población. En una realización preferida, una muestra *de control de un grupo de sujetos* o una *muestra de control de una población de sujetos* en el sentido de la presente invención se obtiene mezclando cantidades iguales de muestras directamente obtenidas o tomadas de los sujetos de dicho grupo o población, o mezclando cantidades iguales de fracciones, constituyentes o productos de reacción (por ejemplo, productos de reacción enzimática o precipitados) de los mismos.

**[0084]** Como se usa en el presente documento, una muestra de control se corresponde con la muestra del sujeto si se ha obtenido del mismo tipo de tejido biológico o fuente del mismo, o esencialmente del mismo, modo. Por ejemplo, si la muestra del sujeto es una muestra de sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, o una fracción de la misma, una muestra de control correspondientes será asimismo una muestra de sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, o una fracción de la misma, respectivamente. Se apreciará que tal muestra de control correspondiente incluiría muestras de sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, o una fracción de las mismas, obtenidas mezclando las muestras de sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, o ciertas fracciones de las mismas, de un grupo o población de sujetos (véanse también las explicaciones adicionales en el presente documento y las reivindicaciones referentes a muestras de control adecuadas según la invención). Los mismos se aplica, cambiando lo que se deba cambiar, a, por ejemplo, muestras de tejido.

**[0085]** Un *lípid*o, como se usa en el presente documento, se define como una molécula pequeña hidrófoba o anfífila.

**[0086]** Para los fines de la presente invención, los lípidos se denominan según la siguiente nomenclatura: CE es éster de colesterilo, Cer es ceramida, DAG es diacilglicerol, PC O es PC enlazado por éter, Gb es globotriaosilceramida, GD es disialogangliósidos, Glc/GalCer es galactosil- o glucosilceramidas, GM es monosialogangliósidos, LacCer es lactosilceramidas, LPC es lisofosfatidilcolina, PC es fosfatidilcolina, PE es fosfatidiletanolamina, PI es fosfatidilinositol, SM es esfingomielina, SIP es esfingosin-1-fosfato, HETE es ácido hidroxieicosatetraenoico, HEPE es ácido hidroxieicosapentaenoico, DHET es ácido dihidroxieicosatrienoico, PGE es prostaglandina E y AA es ácido araquidónico.

**[0087]** La nomenclatura X:Y indica X número de átomos de carbono totales en las porciones de ácido(s) graso(s) de la molécula e Y el número total de dobles enlaces en las porciones de ácido(s) graso(s) de la molécula.

**[0088]** La nomenclatura A/B indica, para una molécula de DAG y PC, tipos A y B de restos de ácidos grasos unidos al esqueleto de glicerol de la molécula.

**[0089]** La nomenclatura (dC/A) indica, para una molécula de Cer, Gb, GlcCer, LacCer y SM, C el tipo de base de cadena larga con un resto de ácido graso enlazado a amida, A.

**[0090]** 15-HETE se conoce formalmente como ácido ( $\pm$ )15-hidroxi-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoico (CAS: 73836-87-0) y se hace referencia en Lehmann, W.D., Metzger, K., Stephan, M., et al. Quantitative lipoxigenase product profiling by gas chromatographs negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 224 227-234 (1995) y Zijlstra, F.J., van Dijk, A.P.M., Wilson, J.H.P., et al. 15-HETE, es el principal eicosanoide formado por la mucosa colónica humana. *Agents Actions* C53-C59 (1992). 12-HETE se conoce formalmente como ácido ( $\pm$ )12-hidroxi-5Z,8Z,10E,14Z-eicosatetraenoico (CAS: 71030-37-0) y se hace referencia en Lehmann, W.D., Metzger, K., Stephan, M., et al. Quantitative lipoxigenase product profiling by gas chromatographs negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 224 227-234 (1995). O'Flaherty, J.T., Thomas, M.J., Lees, C.J., et al. Neutrophil-aggregating activity of monohydroxyeicosatetraenoic acids. *Am J Pathol* 104 55-62 (1981). LacCer(d18:1/22:0) se conoce formalmente como N-(docosanoil)-1-b-lactosil-esfing-4-enina y pertenece a la misma familia que LacCer(d18:1/24:0) (el número CAS es 105087-85-2). Gb3 se conoce formalmente como ceramida trihexósido (CAS: 71965-57-6) y se hace referencia en Groener JE, Poorthuis BJ, Kuiper S, Helmond MT, Hollak CE, Aerts JM. HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside concentrations in plasma. *Clin Chem*. Abr 2007; 53(4):742-7 y Mills K., Johnson A., Winchester B. Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem

mass spectrometry. FEBS Lett. 27 mar 2002; 515 (1-3):171-6. 12-HEPE se conoce formalmente como ácido ( $\pm$ )-12-hidroxi-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-eicosapentaenoico (CAS: 81187-21-5) y se hace referencia en Karanian, J.W., Kim, H.Y., and Salem, N. Inhibitory effects of n-6 and n-3 hydroxy fatty acids on thromboxane (U46619)-induced smooth muscle contraction. J Pharmacol Exp Ther 270 1105-1109 (1994) y Takenaga, M., Hirai, A., Terano, T., et al. Comparison of the in vitro effect of eicosapentaenoic acid (EPA)-derived lipoxigenase metabolites on human platelet function with those of arachidonic acid. Thromb Res 37 373-384 (1986).

**[0091]** Como se describe en el presente documento, un agente que puede unirse a una cualquiera de los marcadores lipídicos de la invención puede ser una molécula pequeña (es decir, una molécula que tiene un peso molecular inferior a 5 kDa, y más normalmente inferior a 1 kDa, que puede ser una proteína o una secuencia de péptidos, o un miembro de cualquiera de una amplia variedad de extractos orgánicos, por ejemplo, un hidrato de carbono, un azúcar, un fármaco, un alcohol, un ácido carboxílico, una amina, un aldehído o una cetona, un tiol, un compuesto cíclico o acíclico), un ácido nucleico (por ejemplo, un aptámero), un hidrato de carbono, una proteína o péptido, o un proteoglicano.

**[0092]** Como se usa en el presente documento, el término *anticuerpo* incluye anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos y sub-fragmentos de anticuerpo que presentan unión específica a dicho lípido. Así, *anticuerpos* adecuados pueden ser inmunoglobulinas completas de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidades dobles o múltiples por antígeno o epítipo, o fragmentos, por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab y similares, que incluyen fragmentos híbridos, y adicionalmente incluye cualquier inmunoglobulina o cualquier proteína natural, sintética o genéticamente manipulada que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. El término *anticuerpo* engloba fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fd, un fragmento Fv y fragmentos dAb), además de anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden expresarse y ensamblarse moléculas de Fab en un huésped genéticamente transformado como *E. coli*. Está disponible un sistema de vector lambda para así expresar una población de Fab con una posible diversidad igual a o que supera la del sujeto que genera el anticuerpo predecesor. Véase Huse WD, et al., Science 1989, 246:1275-81. Tales Fab están incluidos en la definición de *anticuerpo*. La capacidad de una molécula dada, que incluye un fragmento de anticuerpo o sub-fragmento, para actuar como un anticuerpo y unirse específicamente a un antígeno específico puede determinarse por ensayos de unión conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el antígeno de interés como componente de unión.

**[0093]** Pueden prepararse anticuerpos contra lípidos según los métodos y usos de la presente invención por métodos muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden inmunizarse ratones con un lípido con adyuvante. Se recogen los esplenocitos como un conjunto de los ratones a los que se administraron 3 inmunizaciones a intervalos de 2 semanas con extracciones de sangre realizadas en semanas alternas para títulos de anticuerpos en suero. Los esplenocitos se preparan como 3 alícuotas que tanto se usan inmediatamente en experimentos de fusión como se guardan en nitrógeno líquido para su uso en futuras fusiones.

**[0094]** Entonces se realizan experimentos de fusión según el procedimiento de Stewart & Fuller, J. Immunol. Methods 1989, 123:45-53. Se criban los sobrenadantes de pocillos con híbridos en crecimiento por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) para secretores de anticuerpo monoclonal (mAb) sobre placas de 96 pocillos de ELISA recubiertas con dicho lípido. Se clonan cultivos de ELISA positivos por diluciones limitantes, normalmente produciendo hibridomas que se establecen a partir de colonias individuales después de 2 experimentos de clonación en serie.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

**[0095]** Para este estudio, los sujetos se seleccionaron de una cohorte de pacientes que presentaban claros fenotipos de intolerancia muscular determinados según estrictos criterios.

**[0096]** Los criterios de inclusión para los sujetos fueron los siguientes:

- Consentimiento informado por escrito para participar en el estudio;
- Hombres o mujeres de 18 años de edad o mayores;
- Documentación de toxicidad muscular relacionada con estatina manifestada por cualquiera de:
  - o dolor muscular que se produce durante el tratamiento con estatina y se detiene después de la retirada o reducción en la dosificación; o
  - o dolor muscular que empieza después del inicio del tratamiento con estatina y que persiste siendo todavía tratado en pacientes en los que se considera que no es posible detener la administración de estatina; o

- o dolor muscular que se produce mientras que el paciente está tratándose con una estatina y claramente parece estar relacionado con la estatina en opinión de su médico; o
- o paciente en el que el régimen hipolipemiante se cambia de una estatina a ezetimiba debido a intolerancia a las estatinas debido a dolor o debilidad muscular, miopatía o rabdomiólisis; o
- 5 o elevación en el nivel de CK en plasma superior a 1,5 veces el límite superior del normal mientras que está tratándose con una estatina, en ausencia de otras causas para explicar la anomalía; o
- o presencia de mioglobinuria o mioglobinemia mientras que está tratándose con una estatina, en ausencia de otras causas para explicar la anomalía;
- o diagnóstico clínico de rabdomiólisis mientras que está tratándose con una estatina, en ausencia de otras
- 10 causas responsables.

**[0097]** Los criterios de exclusión para los sujetos fueron los siguientes:

- Paciente en el que el dolor muscular no está claramente asociado al uso de una estatina a criterio del médico;
- 15 - Hipotiroidismo que no se controla con una dosis estable de suplemento durante al menos los 3 últimos meses y que se produjo durante la toxicidad muscular;
- Hipertiroidismo conocido en el último año y que se produjo durante la toxicidad muscular;
- Historia de alcoholismo o drogadicción en el último año y que se produjo durante la toxicidad muscular;
- Insuficiencia renal conocida (no secundaria a rabdomiólisis) con nivel de creatinina en suero de 200 µmol/l o más
- 20 en el momento de la toxicidad muscular;
- Enfermedad hepática grave conocida con cirrosis, obstrucción biliar, hepatitis infecciosa aguda o crónica en el momento de la toxicidad muscular;
- Enfermedad muscular hereditaria o adquirida conocida;
- Cualquier afección médica o psiquiátrica que pueda hacer que el paciente sea un candidato inadecuado para el
- 25 estudio en opinión del médico;
- Participación en cualquier otro estudio de fármaco en investigación en el plazo de 30 días desde el reclutamiento.

**[0098]** Los criterios de inclusión para los controles fueron los siguientes:

- 30 - Consentimiento informado por escrito para participar en el estudio
- Hombres o mujeres de 18 años de edad o mayores;
- Dislipidemia conocida tratada con una dosis estable de una estatina durante al menos 3 meses;
- Ausencia de efectos secundarios relacionados con estatina actuales o pasados.

35 **[0099]** Los criterios de exclusión para los controles fueron los siguientes:

- Hipotiroidismo que no se controla con una dosis estable de suplemento durante al menos los 3 últimos meses, a menos que la ausencia de toxicidad muscular debida a estatinas haya sido confirmada antes de la afección;
- Hipertiroidismo conocido en el último año, a menos que la ausencia de toxicidad muscular debida a estatinas
- 40 haya sido confirmada antes de la afección;
- Historia de alcoholismo o drogadicción en el último año, a menos que la ausencia de toxicidad muscular debida a estatinas haya sido confirmada antes de la afección;
- Insuficiencia renal conocida con nivel de creatinina en suero de 200 µmol/l o más en el momento del reclutamiento, a menos que la ausencia de toxicidad muscular debida a estatinas haya sido confirmada antes de
- 45 la afección;
- Enfermedad hepática grave conocida con cirrosis, obstrucción biliar, hepatitis infecciosa aguda o crónica en el momento del reclutamiento, a menos que la ausencia de toxicidad muscular debida a estatinas haya sido confirmada antes de la afección;
- Enfermedad muscular hereditaria o adquirida conocida;
- 50 - Cualquier afección médica o psiquiátrica que pueda hacer que el paciente sea un candidato inadecuado para el estudio en opinión del médico;
- Participación en cualquier otro estudio de fármaco en investigación en el plazo de 30 días desde el reclutamiento.

**Tabla 2.** Características del nivel inicial para pacientes con miopatía por estatina analizadas con lipidómica

	N=	Dosis equivalentes de atorvastatina	Edad	CK
Controles masculinos	92	35	63,5	96,3
Controles femeninos	58	28	64,3	87,8
Casos masculinos, CK < 200 U/l	50	28	64,1	98,5
Casos masculinos, CK > 200 U/l	42	37	60	271
Casos femeninos, CK < 200 U/l	50	25	62	76
Casos femeninos, CK > 200 U/l	8	26	64	267
Número total de sujetos	300			

55

## Métodos analíticos

### Lipidómica realizada por espectrometría de masas

5 **[0100]** Se usaron infusión directa acoplada a espectrometría de masas en tándem, es decir, lipidómica aleatoria, y dos enfoques de espectrometría de masas en tándem con cromatografía de líquidos (EM-CL/EM), es decir, lipidómica de ceramidas y cerebrósidos y lipidómica de eicosanoides, para identificar toxicidad muscular inducida por estatina analizando especies de lípidos moleculares en plasma humano. Los métodos aplicados se optimizaron especialmente para la cuantificación de ésteres de colesterol moleculares (CE), fosfatidilcolinas (PC),  
10 lisofosfatidilcolinas (LPC) y otros lisofosfolípidos (LPL), fosfatidilcolinas enlazadas con éter (PC O) y otros fosfolípidos enlazados con éter (PL O), fosfatidilserinas (PS), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), ácidos fosfatídicos (PA), diacilglicerol (DAG), ceramidas (Cer), glucosilceramidas (GlcCer), lactosilceramidas (LacCer), globotriaosilceramidas (Gb), ácidos grasos libres (FFA) y eicosanoides.

15 **[0101]** Se usaron los siguientes materiales según los métodos. Se compraron cloroformo, metanol, agua, acetonitrilo, ácido fórmico, metanol, isopropanol, acetato de amonio, ácido acético, cloruro de potasio e hidroxitolueno butilado (BHT) de calidad para HPLC o EM-CL de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

**[0102]** La columna de HPLC (Acquity BEH C18, 2,1 × 50 mm id. 1,7 μm) se compró de Waters (Milford, MA, EE.UU.). La pre-columna de HPLC (Widopore C18 4 × 2,0 mm) se compró de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.).  
20 Todo el material de laboratorio usado para la extracción fue resistente al cloroformo. Se compraron puntas de filtro resistentes a aerosoles (Molecular BioProducts) y tubos Eppendorf Safe-lock de 2 ml, placas de PCR 96-well twin.tec y láminas de termosellado Pierce-it-lite de VWR International (West Chester, PA, EE.UU.). Se compraron puntas de filtro CO-RE y Uniplates Whatman de 2 ml y 96 pocillos de Hamilton Robotics (Bonaduz, Suiza). Se compraron patrones de lípidos sintéticos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EE.UU.), Matreya (Pleasant Gap, PA, EE.UU.) y Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.).

**[0103]** Los lípidos se extrajeron en cloroformo:metanol según los siguientes protocolos. Las muestras se enriquecieron con cantidades conocidas de patrones internos sintéticos no endógenos para la normalización de  
30 datos y cuantificación de lípidos endógenos. Se usaron patrones externos sintéticos no endógenos enriquecidos después del extracto para el control de calidad. Se prepararon disoluciones madre de patrones disolviendo apropiadamente cantidades pesadas de cada patrón en cloroformo:metanol (2:1, v/v) para lograr una concentración final de 500 μM. Se creó una mezcla de patrón interno que contenía cada una de la disolución madre patrón y se usó en extracción de lípidos.

35 **[0104]** Se usaron 5 μl de plasma para lipidómica aleatoria y 10 μl de plasma para lipidómica de ceramidas y cerebrósidos. Las extracciones de lípidos se llevaron a cabo en un modo automático usando un sistema Hamilton MICROLAB STAR (Hamilton Robotics, Suiza). Se tomaron en alícuotas muestras bien mezcladas en una Uniplate Whatman de 2 ml de 96 pocillos que contenía metanol frío en hielo y 0,1 % de BHT. Las muestras se mezclaron  
40 minuciosamente después de cada etapa en el protocolo de extracción. La extracción avanzó a temperatura ambiente añadiendo un volumen apropiado de mezcla de patrón interno y cloroformo y metanol. En lipidómica aleatoria y de ceramidas y cerebrósidos, la separación de la fase orgánica se facilitó añadiendo ácido acético 20 mM y centrifugando la placa durante 5 min a 500 × g. La fase orgánica se transfirió a una nueva Uniplate Whatman de 2 ml de 96 pocillos. La fase restante que contenía agua se lavó añadiendo un volumen apropiado de cloroformo, seguido  
45 por centrifugación. Se reunieron las dos fases orgánicas y se evaporaron bajo N<sub>2</sub> hasta sequedad. Entonces, los extractos de lípidos se re-disolvieron en cloroformo:metanol (1:2, v/v), que incluye la adición del patrón externo sintético. Los extractos se almacenaron en tubos Safe-lock Eppendorf de 2 ml a -20 °C antes del análisis por EM. Se tomaron en alícuotas los volúmenes requeridos de extractos de lípido en una placa de PCR Eppendorf 96-well twin.tec y la placa se termoselló con lámina de aluminio para evitar la evaporación.

50 **[0105]** En lipidómica aleatoria, se analizaron extractos de lípidos en un espectrómetro de masas híbrido de trampa de iones de cuadrupolo triple/lineal (QTRAP 5500, AB Sciex) equipado con una fuente de iones de nanoflujo robótica (NanoMate HD, Advion Biosciences). Los instrumentos se operaron en modos de ión positivo y negativo. En ión positivo, el voltaje de pulverización se estableció a 1,0 a 1,4 kV y en modo de ión negativo a -1,0 a -1,4 kV. Se usó  
55 una presión de gas de 0,3-0,8 psi y el calentador interfacial se estableció a 60 °C. La energía de colisión (CE) y el potencial de desolvatación (DP) se optimizó para cada clase de lípido usando patrones sintéticos. El espectrómetro de masas se operó en modo de resolución unitaria usando una velocidad de barrido de 200 Da/s. Se analizaron lípidos moleculares en tanto modos de ión positivo como negativo usando barrido de múltiples iones precursores (MPIS) y barrido de pérdida neutra (NLS) como se describe por Stahlman y colaboradores (Stahlman M, et al: High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009).  
60

**[0106]** En lipidómica de ceramidas y cerebrósidos, los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizaron del siguiente modo. El aparato cromatográfico consistió en un inyector automático CTC HTC PAL (CTC  
65 Analytics AG, Suiza), una bomba de UHPLC Rheos Allegro (Flux Instruments AG, Suiza), un calentador de columna

- externo establecido a 60 °C para lipidómica de ceramidas y cerebrosidos y la columna Acquity BEH C18 con una pre-columna en línea. Las muestras extraídas, 10 µl de cada una, se inyectaron en la pre-columna, seguido de la columna analítica y se suministraron al espectrómetro de masas a una velocidad de flujo de 500 µl/min. En lipidómica de ceramidas y cerebrosidos se usó un gradiente para la separación del analito de lípido con disolvente A que comprendía acetato de amonio 10 mM en agua de calidad para HPLC que contenía 0,1 % de ácido fórmico y disolvente B de acetato de amonio 10 mM en acetonitrilo:isopropanol (4:3, v/v) que contenía 0,1 % de ácido fórmico. El gradiente se construyó del siguiente modo: 0 min - 65 % de B; 2 min - 65 % de B; 2,5 min - 75 % de B; 17,5 min - 100 % de B; 22,5 min - 100 % de B; 22,6 min - 65 % de B; 25 min - 65 % de B.
- 10 **[0107]** Los extractos de lípidos se analizaron por EM-HPLC/EM. El análisis de EM se realizó en un espectrómetro de masas híbrido de trampa de iones de cuadrupolo triple/lineal equipado con la fuente de iones Turbo V™ (4000 QTRAP, AB Sciex). El instrumento estuvo operando en modo de ión positivo. El voltaje de la fuente de iones se estableció a 5500V para lipidómica de ceramidas y cerebrosidos y a -4500V para lipidómica de gangliosidos, y temperatura de la fuente a 400 °C. La energía de colisión (CE) y el potencial de desolvatación (DP) se optimizaron para cada clase de lípido usando patrones sintéticos. Se aplicó un tiempo de muestreo de 20 s para cada barrido. Se aplicó modo de barrido de monitorización de reacción múltiple (MRM) y se basó en la descripción por Sullards y colaboradores (Sullards MC, et al: Structure-specific, quantitative methods for analysis of sphingolipids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: "inside-out" sphingolipidomics. *Methods Enzymol* 2007).
- 15 **[0108]** Se extrajeron eicosanoides usando extracción en fase sólida (SPE). Se extrajeron 150 µl de plasma con 10 % de metanol que contenía 0,1 % de hidroxitolueno butilado (BHT). Las muestras se enriquecieron con cantidades conocidas de patrones internos sintéticos no endógenos para la normalización de datos y la cuantificación de lípidos endógenos. Se creó una mezcla de patrón interno que contenía cada una de la disolución madre estándar y se usó en extracción de lípidos. Se acondicionaron cartuchos Strata-X 33µm SPE con metanol de calidad para HPLC, seguido de una etapa de acondicionamiento con agua ultra-pura (UPW). Las muestras se cargaron sobre SPE seguido de una etapa de lavado usando 35 % de metanol. Se eluyeron eicosanoides con acetonitrilo y los eluatos de muestra se secaron bajo nitrógeno. Los extractos de muestra finales se reconstituyeron en metanol y se analizaron directamente por espectrometría de masas.
- 20 **[0109]** En el análisis para eicosanoides, se realizaron análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del siguiente modo: El aparato cromatográfico consistió en un inyector automático CTC HTC PAL (CTC Analytics AG, Suiza), una bomba de UHPLC Rheos Allegro (Flux Instruments AG, Suiza), un calentador de columna externo establecido a 45 °C y válvula de conmutación (Valco Instruments Co. Inc. y VICI AG, Huston, EE.UU.). La separación se llevó a cabo usando una columna de HPLC Phenomenex Jupiter, 250 × 2,0 mm id. 5 µm (Phenomenex, Inc, Torrance, CA). Las muestras extraídas, 10 µl de cada una, se inyectaron en la columna analítica y se suministraron al espectrómetro de masas a una velocidad de flujo de 300 µl/min. Se usó un gradiente para la separación del analito de lípido con disolvente A que comprende acetonitrilo:agua (63:37 (v/v)) que contenía 0,1 % de ácido fórmico y disolvente B de acetonitrilo:isopropanol (50:50 (v/v)). El gradiente se construyó del siguiente modo: 0 min - 0 % de B; 6 min - 20 % de B; 6,50 min - 55 % de B; 10,0 min - 55 % de B; 12,0 min - 100 % de B; 14,0 min - 100 % de B; 14,50 min - 0 % de B; 18,0 min - 0 % de B.
- 30 **[0110]** Los extractos de lípidos se analizaron por EM-HPLC/EM. El análisis de EM se realizó en un espectrómetro de masas híbrido de trampa de iones de cuadrupolo triple/lineal equipado con la fuente de iones Turbo V™ (4000 QTRAP, AB Sciex). El instrumento estuvo operando en modo de ión negativo y el voltaje de la fuente de iones se estableció a -4500V. La energía de colisión (CE) y el potencial de desolvatación (DP) se optimizaron para cada clase de lípido usando patrones sintéticos, si estaban disponible. Se aplicó modo de barrido de monitorización de reacción múltiple (MRM) y se basó en la descripción por Deems y colaboradores (Deems, R., et al: Detection and quantitation of eicosanoids via high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 2007).
- 35 **[0111]** El procesamiento de datos se hizo del siguiente modo: Inicialmente, el tiempo de retención (en modo CL) y la identificación de cada pico se hizo usando patrones endógenos y por experimentos de adquisición dependiente de la información (IDA), si procede. Los datos sin procesar se procesaron según pico detectado y tiempo de retención (en modo CL) en modo automático. Se aplicó un corte riguroso para separar el ruido de fondo de los picos de lípidos reales. Se controló cada muestra y solo se aceptó cuando cumplió los rigurosos criterios de aceptación. Los recuentos de área del pico (cps) de picos detectados se convirtieron en una lista de nombres de lípidos correspondientes. Los lípidos se normalizaron a su patrón interno y volumen de muestra respectivo para recuperar sus concentraciones.
- 40 **[0112]** La relación de patrones internos (IS) sintéticos con respecto a patrones externos (ES) enriquecidos después del extracto correspondientes, y análisis de EM de matriz extraída y disolventes sirvieron de controles de calidad (QC) del análisis. Además, se analizaron muestras de plasma de referencia extraídas para monitorizar el rendimiento del instrumento, es decir, la variación intra- e interanalítica.
- 45 **[0113]** Se obtuvo una línea de calibración usando patrones sintéticos o aislados antes del análisis de muestras. Se



eligieron patrones sintéticos basándose en la aplicación y tuvieron propiedades similares a los lípidos endógenos o analito(s) de interés. La recta de calibración consistió en un mínimo de cinco puntos de patrón que cubrían el intervalo de cuantificación esperado. La recta de calibración se usó para determinar el intervalo de cuantificación dinámica para cada clase de lípido monitorizada, por ejemplo, los límites de cuantificación lineal. Como los patrones internos usados se comportan de la misma forma que los lípidos endógenos, se usaron para cuantificar especies de lípidos endógenos. Las rectas de calibración se basaron en los mismos patrones internos que se usaron para la cuantificación de los lípidos endógenos.

[0114] Para cada plataforma, se aplicó un corte riguroso para separar el ruido de fondo de los picos de lípidos reales. Cada muestra se controló y solo se aceptó cuando cumplió los criterios de aceptación. Las masas y recuentos de picos detectados se convirtieron en una lista de nombres de lípidos correspondientes. Los lípidos se normalizaron a su patrón interno y volumen de muestra respectivo para recuperar sus concentraciones.

### Análisis estadísticos

[0115] El porcentaje de cambios en las concentraciones de lípidos entre grupos de control y de casos se calculó del siguiente modo:

$$100 * (\text{AVG}[C] \text{ en el grupo de casos} - \text{AVG}[C] \text{ en el grupo de control}) / \text{AVG}[C] \text{ en el grupo de control}$$

La significación estadística se asignó basándose en dos valores de p de la prueba de la t para muestras independientes y de la prueba de la U de Mann-Whitney.

[0116] Además, se usaron curvas de ROC para encontrar moléculas de lípido y los cortes de concentración que separan los mejores casos de los controles. La sensibilidad se calcula como varios casos correctamente identificados dividido entre el número total de casos. La especificidad se calcula como varios controles correctamente identificados dividido entre el número total de controles. La sensibilidad y especificidad se calcularon para cada concentración de lípido. Se definieron biomarcadores significativos como aquellas moléculas que tienen un valor de p basado en la prueba de la t de 0,05 o sensibilidad  $\geq 60\%$  y especificidad  $\geq 40\%$ . También se analizaron por separado los grupos por sexo con el fin de evitar cualquier resultado inesperado específico del sexo ya que los hombres son generalmente más musculosos y físicamente activos.

### Resultados

[0117] En el grupo de muestras del estudio, los niveles de creatina cinasa fueron prácticamente idénticos en controles y casos, por tanto este marcador de enzima tradicionalmente usado no fue predictivo o diagnóstico para miopatía inducida por estatina.

[0118] Por otra parte, los biomarcadores lipídicos aparecieron como biomarcadores significativos de la miopatía inducida por estatina. Se cuantificaron un total de 290 lípidos moleculares en este estudio como se ha descrito anteriormente. De aquellos, 20 lípidos moleculares fueron biomarcadores significativos basándose en criterios estadísticos establecidos. Los candidatos a biomarcador significativo basándose en concentraciones de lípidos moleculares se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Biomarcadores significativos basándose en la medición de lípido o ácido graso individual. Se presentan nombres de especies, valores de p, porcentaje de cambio, valores de ABC; y especificidad y sensibilidad.

Nombre de la medición	Cambio de porcentaje	Valor de p	ABC	Sensibilidad	Especificidad
<b>Elevada</b>					
12-HETE	460,03	0,0001	0,77	71,43	62,79
LacCer(d18:1/22:0)	65,01	0,0002	0,72	69,39	60,42
15-HETE	49,64	0,0150	0,63	63,64	60,61
Gb3(d18:1/24:1)	43,93	$4,18 \times 10^{-6}$	0,78	85,71	61,90
Gb3(d18:1/22:0)	43,21	0,0378	0,78	87,50	62,50
Gb3(d18:1/24:0)	40,21	0,0295	0,80	87,50	62,50
LacCer(d18:1/24:0)	31,81	0,0110	0,61		
AA	30,59	0,0005	0,72	77,55	60,00
Eicosanoides totales	24,18	0,0023	0,70	73,47	60,00
Gb3 total	23,40	0,0006	0,69	64,29	71,43
Cer(d18:1/20:0)	20,96	0,0145	0,62		
Gb3(d18:1/20:0)	20,22	0,0219	0,65	66,67	61,29
LacCer(d18:1/24:1)	14,52	0,0213	0,62		
<b>Reducida</b>					
Gb3(d18:1/16:0)	-7,73	0,0220	0,61		
LacCer* total	-10,10	0,0347	0,64	64,00	68,00

Nombre de la medición	Cambio de porcentaje	Valor de p	ABC	Sensibilidad	Especificidad
LacCer(d18:1/16:0)*	-11,70	0,0168	0,66	66,00	60,00
Gb3(d18:1/18:0)	-14,34	0,0145	0,65	67,35	60,42
14_15-DHET	-16,24	0,0468	0,60		
Glc/GalCer(d18:1/24:1)*	-17,09	0,0050	0,66	70,00	68,00
8_9-DHET	-22,67	0,0394	0,64	60,00	68,18

\*Los marcadores son específicos para mujeres. Otros marcadores no son específicos de sexo.

[0119] Las mediciones de lípidos que estuvieron por debajo de un límite de detección en al menos el 25 % de las muestras de control o de casos se convirtieron en variables dicotómicas en la que 0 indica que un lípido está ausente y 1 indica que un lípido está presente en una muestra. A continuación, los presentes inventores contaron 5 cuántas veces estuvo presente un lípido dado en controles y casos y se evaluó la significancia del hecho de que los lípidos estuvieran ausentes/presentes en controles comparando con casos usando la prueba exacta de Fisher. La Tabla 4 muestra los posibles biomarcadores generados con la prueba de Fisher.

Tabla 4. Marcadores significativos generados con la prueba de Fisher

NOMBRE_LÍPIDO	Control		Caso		Valor de p de Fisher	Dirección de cambio
	ausente	presente	ausente	presente		
LacCer(d18:1/20:0)	32	18	20	30	0,02718	Aumento
12-HEPE	36	14	13	37	7,70E-06	Aumento
PGE2	47	3	37	13	0,01222	Aumento
12-OXOETE	28	12	12	28	0,000695	Aumento
17-HDoHE	31	9	19	21	0,010492	Aumento
PGD2	39	1	29	11	0,003255	Aumento
TXB3	38	2	19	21	0,000003	Aumento
PS 18:0/18:1	34	6	25	15	0,040609	Aumento
SM (d18:1/24:2)	30	10	20	20	0,036835	Aumento

10

[0120] Además, se investigó la significancia de las relaciones de concentración lípido-lípido para identificar la miopatía inducida por estatina. Las relaciones de concentración lípido-lípido que mostraron valores de ABC mejorados con respecto a los lípidos individuales se muestran en la Tabla 5. La Tabla 5 muestra que, además de las mediciones de lípidos individuales, las relaciones de concentración lípido-lípido pueden usarse como biomarcadores 15 para identificar la miopatía inducida por estatina o para determinar si el tratamiento con estatina o el tratamiento con un fármaco hipolipemiente de un sujeto necesita ajuste.

Tabla 5. Ejemplo de las relaciones de concentración lípido-lípido y su significancia

Nombre de la medición	ABC	Sensibilidad	Especificidad	Valor de p	Porcentaje de cambio
<b>Elevada</b>					
12-HETE/15-HETrE	0,83	83,3	61,9	0,0000195733	635,0
12-HETE/14-15-DHET	0,79	73,5	62,8	0,0000278151	587,8
12-HETE/Gb3(d18:1/16:0)	0,80	70,8	71,4	0,0002342687	494,8
12-HETE/Glc/GalCer(d18:1/24:1)	0,78	70,8	71,4	0,0003976485	484,5
12-HETE/Glc/GalCer(d18:1/18:0)	0,78	70,8	76,2	0,0002044722	477,8
Gb3(d18:1/24:1)/LacCer (d18:1/16:0)	0,82	83,3	61,9	0,0000042133	54,4
LacCer(d18:1/22:0)/ Lac Cer(d18:1/24:1)	0,71	74,0	60,0	0,0004157530	26,1
Cer(d18:1/20:0)/Glc /Ga Cer(d18:1/24:1)	0,72	74,0	62,0	0,0006147547	25,8
<b>Reducida</b>					
LacCer(d18:1/16:0)/Lac Cer(d18:1/22:0)	0,69	74,0	66,0	0,0009722258	-20,9
Gb3(d18:1/16:0)/Gb3(d 18:1/24:1)	0,80	83,3	61,9	0,0000005500	-23,9
11-HETE/12-HETE	0,85	87,8	65,1	0,0000000008	-59,1

20 [0121] En resumen, este estudio proporciona novedosos marcadores de lípidos de toxicidad muscular inducida por estatina. Como los niveles de creatina cinasa en el grupo de muestras del estudio fueron prácticamente idénticos en controles y casos (Tabla 2), los biomarcadores lipídicos fueron marcadores más específicos y sensibles de la toxicidad muscular inducida por estatina.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar, o está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más complicaciones seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos, en el que una concentración (concentraciones) elevada(s) o reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de que dicho sujeto padece o está en riesgo de desarrollar dicha toxicidad muscular inducida por estatina y/o dicha(s) complicación (complicaciones), en el que el uno o más lípidos cuyo aumento en concentración se compara con el control se selecciona de: 12-HETE, 15-HETE, AA, Cer(d18:1/20:0), 12-HEPE y PGE2; y en el que el uno o más lípidos cuya disminución en concentración se compara con el control se seleccionan de: 14\_15-DHET y 8\_9-DHET.
2. Un método para determinar si el tratamiento con una estatina y/o un fármaco hipolipemiente a un sujeto que necesita ajuste, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la(s) concentración (concentraciones) de uno o más lípidos, en el que (una) concentración (concentraciones) elevada(s) o reducida(s) en dicha muestra, cuando se compara(n) con un control, es (son) indicativa(s) de que dicho tratamiento requiere un ajuste, en el que el uno o más lípidos cuyo aumento en concentración se compara con el control se selecciona(n) de: 12-HETE, 15-HETE, AA, Cer(d18:1/20:0), 12-HEPE y PGE2; y en el que el uno o más lípidos cuya disminución en concentración se compara con el control se selecciona(n) de: 14\_15-DHET y 8\_9-DHET.
3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el lípido cuyo aumento en concentración se compara con el control es 12-HETE.
4. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que el ajuste de dicho tratamiento con una estatina y/o un fármaco hipolipemiente comprende
- (a) una reducción de la dosis de estatina;
  - (b) un cese del tratamiento con estatina;
  - (c) un reinicio del tratamiento con estatina;
  - (d) un cambio a un fármaco de estatina diferente; o
  - (e) un cambio a un fármaco hipolipemiente diferente.
5. El método de la reivindicación 1 ó 3, en el que el método para determinar si un sujeto está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina es específicamente para evaluar el grado de toxicidad muscular inducida por una nueva estatina o una nueva medicación hipolipemiente en un sujeto que recibe tratamiento con dicha estatina o medicación hipolipemiente.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que
- (a) el método para determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar miopatía inducida por estatina es específicamente para determinar signos de aviso precoces de toxicidad muscular en dicho sujeto, y/o
  - (b) el método para determinar si un sujeto está sufriendo toxicidad muscular inducida por estatina es específicamente para determinar si los síntomas de toxicidad muscular encontrados en un sujeto se deben a toxicidad muscular inducida por estatina.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende determinar al menos 2, al menos 3, al menos 4, o al menos 5, de dichas concentraciones de lípidos.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que
- (a) dicho sujeto está siendo tratado con una o más estatinas;
  - (b) dicho sujeto había recibido tratamiento con estatina, pero suspendió dicho tratamiento debido a la aparición de dolor muscular; o
  - (c) dicho sujeto todavía no ha sido tratado con estatinas.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto tiene un alto riesgo de desarrollar toxicidad muscular inducida por estatina.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho control con el que se hace la comparación es:
- (a) una muestra de control del mismo sujeto que recibe tratamiento con estatina antes de la aparición de toxicidad muscular;
  - (b) una muestra de control del mismo sujeto antes del tratamiento con estatina o durante la suspensión del tratamiento con estatina;

- (c) una muestra de control de un sujeto sin signos o historia de toxicidad muscular inducida por estatina;  
 (d) una muestra de control de una población de sujetos sin signos o historia de toxicidad muscular inducida por estatina;  
 (e) un valor de control establecido de uno o más sujetos no en tratamiento con estatina y sin signos o historia de toxicidad muscular; o  
 (f) un valor de control establecido de uno o más sujetos en tratamiento con estatina y sin signos o historia de toxicidad muscular.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además determinar o evaluar el nivel de creatina quinasa en una muestra de dicho sujeto, opcionalmente en el que el sujeto tiene o no tiene niveles de creatina quinasa elevados.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que
- (a) la muestra es sangre, plasma, suero, una fracción de lipoproteína de sangre, orina o tejido de biopsia de músculo; y/o  
 (b) la(s) concentración (concentraciones) de lípidos se determina(n) usando espectrometría de masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía de fluorescencia o interferometría de doble polarización, un método de separación de alto rendimiento tal como HPLC o UPLC, un inmunoensayo tal como un ELISA y/o con una porción de unión capaz de unirse específicamente al analito.
13. Uso de un anticuerpo que puede unirse a cualquiera de los lípidos definidos en las reivindicaciones 1 ó 2 para predecir o diagnosticar toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis en un sujeto, en el que el uso de dicho anticuerpo es para analizar el nivel de dicho uno o más de los lípidos definidos en las reivindicaciones 1 ó 2 en una muestra biológica, y compararlo con un control.
14. Uso de un kit para (i) predecir toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis, en el que el uso de dicho kit es para analizar el nivel de dicho uno o más de los lípidos definidos en las reivindicaciones 1 ó 2 en una muestra biológica, y compararlo con un control; o para (ii) realizar los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12; en el que el kit comprende:
- (a) un patrón (o patrones) de lípidos seleccionado(s) de los lípidos definidos en las reivindicaciones 1 ó 2; y opcionalmente uno o más compuestos de referencia adicionales seleccionados de:  
 (b) uno o más marcadores de control, tales como un lípido o lípidos, por ejemplo, un lípido como se define en las reivindicaciones 1 ó 2, o una proteína;  
 (c) controles positivos y/o negativos;  
 (d) patrones internos y/o externos;  
 (e) controles de la línea de calibración; y  
 (f) un agente, opcionalmente un anticuerpo, capaz de unirse a cualquiera de los lípidos definidos en las reivindicaciones 1 ó 2; y  
 (g) un reactivo (o reactivos) para realizar dichos métodos o usos.
15. El uso de la reivindicación 14(ii), en el que la(s) concentración (concentraciones) de lípidos en una muestra de un sujeto se determina(n) usando espectrometría de masas.
16. El método o uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- (a) dicha estatina se selecciona del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, fluvastatina XL, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y/o simvastatina;  
 (b) dicho fármaco hipolipemiente puede seleccionarse de cualquiera de los siguientes: un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, niacina (ácido nicotínico), un inhibidor de la absorción de colesterol, un inhibidor de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), un secuestrante de ácidos biliares; un fibrato o un fitosterol; en el que opcionalmente dicho inhibidor de la absorción de colesterol es ezetimiba o SCH-48461; dicho inhibidor de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) es torcetrapib, anacetrapib o dalcetrapib; dicho secuestrante de ácidos biliares es colestevlam, colestiramina o colestipol; y dicho fibrato es fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato o bezafibrato; o  
 (c) la toxicidad muscular está asociada a una enfermedad muscular, por ejemplo, una distrofia muscular.
17. Un anticuerpo capaz de unirse a cualquiera de los lípidos definidos en las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso en la prevención o tratamiento de la toxicidad muscular inducida por estatina o toxicidad muscular inducida por estatina y una o más de sus complicaciones en un sujeto seleccionadas de mialgia, miositis, miopatía y rabdomiólisis.