

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 228**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12720852 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2705362**

54 Título: **Uso de SS-dimetil-gliotoxina como marcador diagnóstico de patologías causadas por hongos productores de gliotoxina o de sus derivados**

30 Prioridad:

04.05.2011 ES 201130711

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

28.04.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (33.3%)
Campus Plaza San Francisco Edif.
Interfacultades C/ Pedro Cerbuna 12
50009 Zaragoza, ES;
FUNDACIÓN AGENCIA ARAGONESA PARA LA
INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO (ARAID)
(33.3%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PARDO JIMENO, JULIÁN;
GÁLVEZ BUERBA, EVA M. y
DOMINGO REGIDOR, M. PILAR**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 568 228 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).

DESCRIPCION

5 Uso de SS'-dimetil-gliotoxina como marcador diagnóstico de patologías causadas por hongos productores de gliotoxina o de sus derivados

La presente invención se refiere al uso de un derivado de la gliotoxina como marcador para el diagnóstico de patologías causadas por hongos productores de gliotoxina, preferentemente del género *Aspergillus*. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la medicina.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Los hongos (mohos y levaduras) producen una gran variedad de compuestos denominados metabolitos secundarios (antibióticos, alcaloides, etc.) que no son necesarios para el crecimiento, pero puede mejorar la supervivencia en competencia con otros organismos. La gliotoxina (GT) es uno de tales metabolitos y es producida por hongos y levaduras de diferentes especies, tales como especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. GT es un compuesto de la familia de epipolitiiodioxopiperazinas (ETP), con actividad inmunomoduladora, que se caracteriza por la presencia de un puente disulfuro en el anillo de piperazina. La presencia del puente disulfuro en la GT es clave para su actividad biológica. El bloqueo del puente disulfuro por metilación inactiva la toxina que resulta en la formación de SS'-dimetil-gliotoxina (bmGT). La bmGT es biológicamente inactiva (Mullbacher A *et al.* 1986 Mol Immunol 23(2)231-235).

25 Se han descrito infecciones oportunistas causadas por hongos, entre las que destacan las infecciones de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, tanto en animales como en humanos, las llamadas aspergilosis y penicilosis. En clínica se ha visto un aumento de las infecciones causadas por estos hongos en pacientes inmunodeprimidos, por ejemplo, en enfermos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes con cáncer o pacientes con tratamientos o enfermedades que afectan al sistema inmune (Maschmeyer G *et al.* 2007 Drugs 67(11):1567-1601; Sternberg S. 1994. Science 266 (5191):1632-1634).

30 Entre las distintas modalidades de aspergilosis destaca la conocida como aspergilosis invasiva (o aspergilosis pulmonar invasiva, AI) que es una infección oportunista causada por mohos del género *Aspergillus* (principalmente *Aspergillus fumigatus*), la cual presenta un elevado índice de mortalidad en pacientes inmunodeprimidos (superior al 80% de mortalidad). Este género es el de mayor presencia dentro de los patógenos fúngicos medioambientales y se ha observado un gran aumento durante los últimos años del número de infecciones causada por este género. Este hecho se debe en gran parte al desarrollo de terapias cada vez más efectivas, pero también más inmunosupresoras, frente a cáncer o durante los trasplantes. Además, se ha sugerido que el cambio climático asociado a una variación tanto en la temperatura como la humedad de los nichos ecológicos donde habita *Aspergillus*, puede favorecer el incremento en el número de esporas de este moho en el medioambiente y, por tanto, el riesgo a este tipo de infección. Pese al incremento en el número de infecciones hospitalarias y de pacientes fallecidos, todavía no se dispone de marcadores que permitan un diagnóstico rápido y fiable de esta infección. Las técnicas actuales de diagnóstico no son muy específicas, lo cual supone que muchos pacientes sin infección por *Aspergillus* son tratados con fármacos antifúngicos de alto coste.

45 *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) es un patógeno oportunista humano con una alta presencia en el aire que causa un número importante de infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (Tekaia F *et al.* 2005 Curr Opin Microbiol 8(4):385-392). *A. fumigatus* es responsable de más del 90% de la aspergilosis invasiva (AI) en pacientes infectados por el VIH, con tuberculosis, con cáncer o que están sometidos a trasplantes de órganos, pudiendo resultar en un índice de mortalidad superior al 80%. Uno de los principales problemas relacionados con la AI es que la enfermedad sólo es identificada de manera concluyente en una etapa tardía, cuando ya es demasiado grave y los tratamientos se han vuelto ineficaces.

50 Dentro de las diferentes toxinas producidas por *A. fumigatus*, GT ha captado un interés especial ya que ejerce actividad inmunosupresora *in vitro* e *in vivo*, al interferir con diversas respuestas inmunológicas y tener actividad citotóxica. Además, se ha demostrado que la GT es capaz de inducir apoptosis en varios tipos de células, incluidos macrófagos, fibroblastos y células de hígado entre otras. Recientemente, GT fue identificada como un factor de virulencia de *A. fumigatus*, en un modelo de ratón de AI tras una inmunodepresión inducida por corticosteroides. La GT se produce en la fase inicial de la AI y su actividad inmunosupresora contribuye y agrava los efectos patológicos observados en el huésped infectado. La GT ha sido detectada en muestras de pacientes con aspergilosis (Lewis RE *et al.* 2005 Infect Immun 73(1):635-637) y se ha postulado como marcador precoz de diagnóstico para la detección y pronóstico de la AI. Sin embargo, GT se elimina rápidamente de sobrenadantes de cultivo durante la incubación *in vitro* con una variedad de tipos de células (Waring P *et al.* 1994 Toxicon 32(4):491-504). En el caso de que la GT biológicamente activa también pueda ser convertida rápidamente *in vivo*, podría ser retirada de los líquidos corporales por los tejidos adyacentes y por las células circulantes y, por tanto, puede no ser detectable en los mismos, haciendo que la GT no sea un buen marcador de infección por *Aspergillus*.

Uno de los principales inconvenientes de la aspergilosis invasiva radica en los métodos de detección, ya que normalmente cuando dicha infección es detectada, el moho ya ha causado daños irreversibles y de ahí su alto grado de mortalidad. Las técnicas de diagnóstico actuales son muy poco específicas, de elevado coste y tardías, por lo que cuando se ha detectado la infección los tratamientos ya no son efectivos. Los métodos de diagnóstico de aspergilosis utilizados hasta la fecha son por ejemplo, observación microscópica de una muestra, cultivo, detección de galactomanano, detección de (1-3) β -D-glucano o detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) fúngico (Rubio MC *et al.* 2007. Enferm Infecc Microbiol Clin 25 Suplm 3:45-51). En la actualidad, el diagnóstico de aspergilosis sólo se clasifica como posible o probable y únicamente se puede dar un diagnóstico confirmado tras el fallecimiento o a través de métodos altamente invasivos como la biopsia pulmonar.

En consecuencia, existe la necesidad de una herramienta rápida, precisa y sensible para la detección de este tipo de enfermedades, con el fin de mejorar el diagnóstico precoz, pronóstico y seguimiento de la aspergilosis en seres humanos para la elaboración de un tratamiento personalizado del paciente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe un método *in vitro* sensible, rápido y preciso para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de patologías causadas por hongos productores de gliotoxina o de derivados de gliotoxina, caracterizado por la detección y cuantificación de SS'-dimetil-gliotoxina (bmGT) en una muestra biológica. La muestra biológica puede ser entre otras, muestra de suero, plasma, sangre o lavado broncoalveolar. La presente invención muestra la utilidad de la bmGT como marcador para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de patologías causadas por un hongo productor de gliotoxina o de sus derivados en un sujeto.

El método de la invención se basa en la detección y cuantificación de bmGT mediante separación con cromatografía, preferentemente cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) y detección mediante espectroscopía ultravioleta (UV). Con este método se puede detectar tanto bmGT como GT y diferenciar ambas entre sí. La presente invención demuestra el uso de la bmGT para detectar hongos productores de GT o de sus derivados. Se muestran resultados que indican que la bmGT es un marcador más sensible que la GT en el diagnóstico de aspergilosis. La invención muestra resultados de detección de bmGT en muestras biológicas de pacientes inmunodeprimidos con una alta fiabilidad, sensibilidad y especificidad en la detección.

La presente invención también se refiere al uso de la bmGT como un nuevo marcador de diagnóstico de patologías causadas por hongos productores de gliotoxina o de sus derivados que ofrece una sensibilidad mayor a los métodos de diagnóstico de enfermedades fúngicas actuales, lo cual hace de este un método muy útil para el diagnóstico precoz de dichas enfermedades. En relación a la aspergilosis, la invención proporciona un método útil en la detección precoz de la enfermedad, confirmación de la misma y en el pronóstico y/o seguimiento del paciente. Además, la detección de este marcador mediante el método descrito en la presente invención es más rápida y más económica que otros métodos, lo que supone un coste económico mucho más bajo que los marcadores actuales, lo que favorecería la reducción en los gastos de los organismos públicos de los sistema de sanidad, así como su implantación en zonas desfavorecidas. La utilización de la bmGT como marcador de aspergilosis, supondría un gran avance para reducir los altos índices de mortalidad de esta infección.

Por lo aquí descrito, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de patologías causadas por hongos productores gliotoxina o de sus derivados caracterizado por la detección de SS'-dimetil-gliotoxina en la muestra biológica de un sujeto.

El término "*in vitro*" se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

El término "diagnóstico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de detectar el hongo productor de gliotoxina o de sus derivados, así como de discriminar entre muestras procedentes de pacientes y de individuos sanos.

El término "pronóstico" en la presente invención se refiere a la capacidad de detectar pacientes o sujetos asintomáticos que presentan una alta probabilidad de padecer infección por hongos productores de gliotoxina o de sus derivados, aún cuando en el momento del diagnóstico no presenten dicha patología. El término "pronóstico" también se refiere a la capacidad de detectar sujetos previamente diagnosticados de infección por hongos productores de gliotoxina o de sus derivados, con una alta probabilidad de sufrir un empeoramiento o mejoría de la enfermedad.

El término "seguimiento" se refiere a la evaluación de la infección en pacientes, por ejemplo, pacientes que hayan recibido tratamiento con antifúngicos.

Se entiende por “patología”, en la presente invención, como aquella enfermedad causada por la infección o presencia de un hongo productor de gliotoxina o de sus derivados. Esta patología puede ser localizada en diversas partes del cuerpo del sujeto, por ejemplo en el tracto respiratorio, por ejemplo en el pulmón.

5 Los “hongos productores de gliotoxina”, en la presente invención son aquellos organismos eucariotas del reino *Fungi* que producen gliotoxina como metabolito secundario. El término “gliotoxina” (GT) se refiere a un compuesto de la familia de epipolítiodioxopiperazinas que se caracteriza por la presencia de un puente disulfuro en el anillo de piperazina y que presenta actividad inmunomoduladora, también denominada “gliotoxina activa” (Gardiner DM, 2005. *Microbiology* 151 (Pt 4):1021-1032; Waring P, 1988, *Medicinal Research Reviews*, 4: 499-524; Gordon W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1980, 119-121). En la presente invención el término “derivados” se refiere a los compuestos que se seleccionan de la lista que comprende: gliotoxina E, gliotoxina G, S-metilgliotoxina o SS'-dimetilgliotoxina.

15 La SS'-dimetil-gliotoxina, también denominada dimetil-gliotoxina, bis(ditio)bis(metiltio)gliotoxina, bis(metiltio)gliotoxina (bmGT) o según la nomenclatura IUPAC (3R,5aS,6S,10aR)-6-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metil-3,10a-bis(metilsulfonil)-6,10-dihidro-5aH-pirazino[1,2-a]indol-1,4-diona, (Waring P, 1988, *Medicinal Research Reviews*, 4: 499-524) (Gordon W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1980, 119-121) es un derivado dimetilado de la gliotoxina que carece del puente disulfuro y que no tiene actividad biológica.

20 El término “muestra biológica” incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, un tejido o una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, lavado broncoalveolar, linfa o fluido ascítico. Asimismo, la muestra biológica puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

25 Se entiende por “sujeto” aquel individuo susceptible de infección por un hongo productor de GT o de sus derivados.

Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde la detección se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:

30 a) separación de SS'-dimetil-gliotoxina en la muestra, mediante cromatografía;
b) detección y/o cuantificación del compuesto separado en (a) mediante espectroscopia ultravioleta.

35 En adelante nos referiremos a esta realización preferida como el “método primero de la invención”.

Se entiende por cromatografía la técnica analítica destinada a la separación de una mezcla compleja a través de la utilización de una fase estacionaria y una fase móvil. Esta separación se basa en una diferencia en el comportamiento de los compuestos de la mezcla tanto debida a sus propiedades físico-químicas como a su capacidad de interaccionar con moléculas específicas. Esta cromatografía se puede realizar tanto en columnas como en placas y la separación se puede llevar a cabo mediante disoluciones con propiedades específicas que permitan separar dichos compuestos. En la presente invención podría llevarse a cabo mediante cromatografía líquida (“high-performance liquid chromatography”, HPLC) o de capa fina (“high-performance thin layer chromatography”, HPTLC). También podría llevarse a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando moléculas que se unan específicamente a la SS'-dimetil-gliotoxina. Otra realización aún más preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde la detección del paso (a) se realiza mediante cromatografía en capa fina (HPTLC), en adelante “método segundo de la invención”.

50 Se entiende por HPTLC la cromatografía que se lleva a cabo utilizando un soporte sólido formado por un material adsorbente (fase estacionaria) que podría ser sin excluir otros gel de sílice, óxido de aluminio, tierra silíceo, celulosas o poliamidas que se fija sobre un soporte sólido que podría ser sin excluir otros vidrio, plástico o metales como aluminio. En este caso las muestras que se han extraído de los fluidos indicados anteriormente con un disolvente o una mezcla de disolventes orgánicos como diclorometano, cloroformo, metanol u otros, se aplican sobre la placa y tras la evaporación del disolvente, se separan utilizando una disolución compuesta por mezclas de compuestos puros como por ejemplo n-heptano (C7), tetrahidrofurano (THF) y acetonitrilo (ACN), por ejemplo en proporción 40:58:2 (v: v: v). La separación se lleva a cabo en función de las diferentes polaridades que presentan los compuestos de la mezcla.

60 Una realización preferida del método primero y segundo de la invención se refiere al método donde la detección del paso (b) se realiza entre 220 y 400 nm. Una realización aún más preferida se refiere al método donde la detección del paso (b) se realiza a 280nm.

Para la cuantificación del compuesto separado en el paso (a) de los métodos de la invención, se puede comparar con una muestra control.

El término “muestras control” tal como se entiende en la presente invención se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a una muestra de concentración conocida del compuesto que se quiere cuantificar o también se puede referir a una muestra obtenida de un individuo que esté infectado con un hongo productor de GT o de sus derivados. Este tipo de muestra control, es un muestra control positiva.

La determinación del diagnóstico de infección por hongos productores de GT o de sus derivados puede determinarse mediante la detección de un valor límite a partir del cuál se considera la muestra como positiva y por lo tanto, diagnosticable como infectada. El pronóstico y el seguimiento de las patologías causadas por estos hongos pueden realizarse comparando con una muestra control y si la diferencia entre el valor obtenido para la muestra y el valor de la muestra control es estadísticamente significativa, determinar el pronóstico favorable o desfavorable o la efectividad de un tratamiento antifúngico.

En la presente invención “diferencia estadísticamente significativa” se refiere a que existen diferencias estadísticas entre los valores comparados, siendo la probabilidad estadística al menos mayor que 0,05 ($p > 0,05$) o mayor que 0.005 ($p > 0.005$) y obteniéndose ésta según el test estadístico aplicable a cada caso.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde el hongo es un moho o una levadura, preferentemente es un moho, más preferentemente es un moho del género *Aspergillus* o *Penicillium*. Una realización aún más preferida se refiere a un moho del género *Aspergillus*, y una realización aún más preferida al método donde el moho es *Aspergillus fumigatus*.

Se entiende como “moho” a un hongo provisto de un micelio filamentoso y ramificado del cual sale un vástago que termina en un esporangio esférico, a manera de cabezuela, que vive en medio orgánico rico en materias nutritivas. En la presente invención se entiende como moho aquél hongo que causa una micosis, una infección, en un sujeto, preferentemente se refiere al moho del género *Aspergillus*, que produce aspergilosis, o del género *Penicillium*, que produce penicilosis.

El término *Aspergillus* en la presente invención puede referirse a cualquier especie del género *Aspergillus*, por ejemplo *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. defletus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. penicillioides*, *A. restrictus*, *A. sojae*, *A. sydowi*, *A. terreus*, *A. ustus*, o *A. versicolor*. Preferentemente se refiere a *A. fumigatus*.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método donde la patología es aspergilosis.

Se entiende por “aspergilosis” aquella enfermedad causada por un hongo del género *Aspergillus*. La aspergilosis puede producir aspergilosis pulmonar invasiva, aspergilosis pulmonar crónica recidivante, aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergilomas, traqueobronquitis invasiva, sinusitis, meningitis, otitis externa maligna, endocarditis, miocarditis u osteomielitis, entre otras. La enfermedad generalmente se produce por inhalación de las esporas del hongo.

La presente invención también se refiere al método donde la patología es penicilosis. Se entiende como “penicilosis” aquella enfermedad causada por un hongo del género *Penicillium*, por ejemplo por *P. marneffeii*.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde el sujeto es humano. Otra realización preferida se refiere al método donde el sujeto es un sujeto inmunodeprimido.

Se entiende por “inmunodeprimido”, también denominado inmunosuprimido, inmunocomprometido o inmunodeficiente, aquel sujeto que tiene disminuida la respuesta inmune, donde dicha inmunosupresión se puede deber a diversas causas tales como, por ejemplo, tratamiento quimioterápico o inmunodepresión química, debida a infección por algún patógeno tales como hongos, virus o bacterias, debido a un factor genético como la mutación o delección de un gen específico, o puede ser un sujeto recién nacido.

La muestra biológica en la que se detecta *in vitro* la bmGT puede ser seleccionada entre varias muestras biológicas. Por lo que una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde la muestra biológica se selecciona entre suero, plasma, sangre o lavado broncoalveolar. La obtención y procesamiento de las muestras biológicas se pueden realizar utilizando los medios conocidos por cualquier experto en la materia.

La detección de la bmGT podría ser combinada con la detección de otros componentes biológicos o metabolitos de hongos. Por esto, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método donde además comprende la detección de componentes biológicos o de metabolitos de hongos, donde dichos componentes o metabolitos se seleccionan de la lista que comprende: galactomanano, (1-3)beta-D-glucano, ADN, antígenos, gliotoxina, gliotoxina E, Gliotoxina G, S-metilgliotoxina, ácido helvólico, esporidesmina, esterigmatocistina, aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o cualquiera de sus combinaciones. También podría ser utilizado cualquier otro metabolito o componente biológico de hongos no presente en la lista que en combinación con la bmGT sea útil en el

método del primer aspecto de la invención.

Una realización más preferida se refiere al método que además comprende la detección de gliotoxina. Una realización aún más preferida se refiere al método donde la detección de gliotoxina se realiza mediante los siguientes pasos:

- a) separación de gliotoxina en la muestra, mediante cromatografía;
- b) detección y/o cuantificación del compuesto separado en (a) mediante espectroscopia UV, preferentemente se realiza entre 220-400 nm, más preferentemente se realiza a 280 y 367 nm.

Además, los métodos de la invención también podrían ser combinados con otros métodos tales como ELISA o biosensores basados en secuencias de ácidos nucleicos (aptámero) diseñadas de forma que permitan detectar y cuantificar específicamente la SS'-dimetil-gliotoxina. Por otro lado, podrían utilizarse proteínas que reconocieran específicamente este marcador (anticuerpos, enzimas u otras) como elementos de reconocimiento en el diseño de biosensores específicos de la SS'-dimetil-gliotoxina.

En base a los resultados mostrados en la presente invención, un segundo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de SS'-dimetil-gliotoxina como marcador para el diagnóstico, pronóstico y/o de seguimiento de patologías causadas por un hongo productor de gliotoxina o de sus derivados en un sujeto.

Dado que la detección de la bmGT podría ser combinada con la detección de otros componentes biológicos o metabolitos de hongos, una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de SS'-dimetil-gliotoxina combinado con al menos un componente biológico o metabolito de hongos productores de gliotoxina, seleccionado de la lista que comprende galactomanano, (1-3)beta-D-glucano, ADN, antígenos, gliotoxina gliotoxina E, Gliotoxina G, S-metilgliotoxina, ácido helvólico, esporidesmina, esterigmatocistina, aflatoxinas, ocratoxinas, sirodesminas, aranotina, emestrina, ditiosilvatina, fumonisinas o cualquiera de sus combinaciones. Una realización más preferida se refiere al uso donde el otro marcador (componente biológico o metabolito de hongos productores de gliotoxina) es gliotoxina. También podría ser utilizado cualquier otro metabolito o componente biológico de hongos no presente en la lista que en combinación con la bmGT sea útil para el diagnóstico, pronóstico y/o de seguimiento de patologías causadas por un hongo productor de gliotoxina o de sus derivados en un sujeto.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso donde el hongo es del género *Aspergillus* o *Penicillium*. Otra realización preferida se refiere al uso donde el hongo es *Aspergillus*, preferentemente es *Aspergillus fumigatus*.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso donde la patología es aspergilosis. La presente invención también se refiere al uso donde la patología es penicilosis.

Otra realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso donde el sujeto es un humano. Otra realización más preferida se refiere al uso donde el sujeto es un sujeto inmunodeprimido.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Cromatogramas de HPTLC de GT y BMGT tras su extracción de sueros humanos a los que se había añadido concentraciones conocidas de dichas toxinas. Cantidad de cada toxina añadida al suero: 0,068 µg; Condiciones: Desarrollo horizontal utilizando una mezcla THF/C7/ACN (40:58:2 % en volumen, v) durante 3 min. **A**, Detección por UV-VIS a 280nm. **B**, Detección por UV-VIS (ultravioleta-visible) a 367nm. El pico 1 corresponde a bmGT y el 2 a GT. Curva negra: GT y bmGT extraídas de suero. Curva gris: Compuestos puros. AU, unidades arbitrarias; mm, distancia en milímetros.

FIG. 2. Espectro UV-VIS de GT y bmGT tras su separación mediante HPTLC. **A**, espectro UV-VIS correspondiente al pico de la GT (gris) a 22.9 mm y al pico de la bmGT (negro punteado) a 17.6 mm tras la inyección de compuestos puros y separación mediante HPTLC. **B**, espectro UV-VIS correspondiente al pico de la GT (gris) y al pico de la bmGT (negro punteado) tras la adición a suero, posterior extracción con DCM y separación por HPTLC como se describe en los métodos. AU, unidades arbitrarias; nm, nanómetros.

FIG. 3. Espectros de masas de GT y bmGT extraídos del suero. GT y bmGT se extrajeron a partir de suero humano al que se había añadido concentraciones conocidas de las toxinas y se separaron por HPTLC. Posteriormente, los compuestos se extrajeron de las placas mediante una Interfase-MS con MeOH. **A**, Espectro

MS2 de masa del ión molecular m/z 327 correspondiente a la GT extraída de una placa de HPTLC (pico en 22,9 mm). **B**, Espectro MS2 de masa del ión molecular m/z 357 correspondiente a la BMGT extraída de una placa de HPTLC (condiciones de desarrollo de la figura 1; pico en 17,6 mm). I cps (intensidad en cuentas por segundo). M/z Da (cociente masa/carga, masa molecular en Dalton).

5 **FIG. 4. Curvas de calibración de GT y bmGT en suero humano. A y B**, curvas de concentraciones bajas (A) y altas (B) de bmGT detectadas por absorción UV a 280 nm (concentración baja: $3394,5 x + 7,1114$, $R2 = 0,982$; concentración alta: $1514,1x + 1238$, $R2 = 0,9927$). **C y D**, curvas de concentraciones bajas (C) y altas (D) de GT detectadas por absorción UV a 280 nm en gris (concentración baja: $5386,4 x - 6,0911$, $R2 = 0,9967$; concentración alta: $2183,9x + 5144,3$, $R2 = 0,9964$) y a 367 nm en negro (concentración baja: $5861,6 x - 17,388$, $R2 = 0,9868$; concentración alta: $1794,7x + 7362,7$, $R2 = 0,9936$). Ambas toxinas se añadieron a suero humano, se extrajeron con DCM y se separaron por HPTLC. AU, unidades arbitrarias; μ g, microgramos).

15 **FIG. 5. Separación y detección de GT y bmGT en muestras de *A. fumigatus* aisladas de pacientes o en suero de pacientes con riesgo de AI. A**, cromatograma HPTLC de GT y bmGT extraídos a partir de suero humano a los que se habían añadido concentraciones conocidas de toxinas (estándar, std) o a partir de un cultivo de una cepa de *A. fumigatus* aislada de un paciente (cultivo). **B**, cromatograma HPTLC de los productos extraídos a partir de muestras de suero humano de pacientes con riesgo de AI (suero 1 y 2) o de donantes sanos (suero -). Condiciones: Desarrollo horizontal con THF/C7/ACN (40:58:2 v%) durante 3 minutos. La identidad de los picos correspondientes a GT y bmGT (señalados) fue determinada mediante el análisis del espectro UV-Visible a 280 nm y 367 nm. AU, unidades arbitrarias; mm, distancia en milímetros).

20 **FIG. 6. Análisis de la presencia de GT y bmGT en una serie secuencial de suero de pacientes con riesgo de aspergillosis invasiva. A: paciente con leucemia mieloide aguda. B: paciente con leucemia linfática aguda.** La concentración de bmGT (eje izquierdo) se indica por círculos abiertos y el índice de GMN (galatomanano; eje derecho) por triángulos cerrados. El LD (límite de detección) de bmGT y positividad de GMN (0,5) están representados por líneas continuas y discontinuas, respectivamente. Las barras horizontales superiores indican los períodos de tiempo en el que los pacientes habían sido tratados con quimioterapia (A: idarubicina más citarabina; B: ciclofosfamida / metotrexato / citarabina / hidrocortisona) así como con terapia antifúngica (A: anfotericina liposomal; B: caspofungina y voriconazol). En ningún caso se detectó GT activa.

EJEMPLOS

35 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

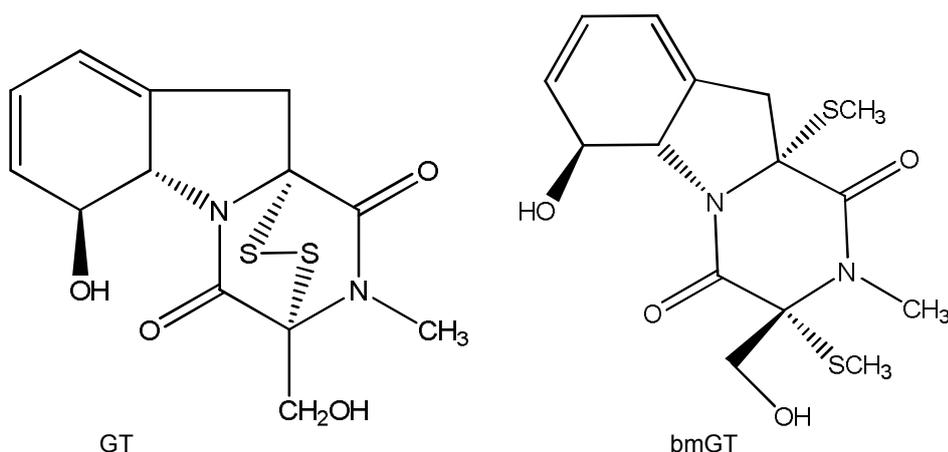
40 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad de que la bmGT es un mejor marcador de la presencia de hongos que GT, y por tanto, mejor marcador del diagnóstico de patologías causadas por hongos productores de gliotoxinas o de sus derivados, entre ellos, *Aspergillus*.

Ejemplo 1:

Materiales y métodos

Reactivos y mohos:

50 Gliotoxina (GT) y bis(metil)gliotoxina (SS'-dimetilgliotoxina -bmGT-) (pureza: 99%) se obtuvieron de Enzo Life Sciences. Sus estructuras químicas se muestran a continuación:



5 El suero humano AB fue de Invitrogen. La cepa de *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) B5233 (Sugui JA *et al.* 2007 Eukaryot Cell 6(9):1562-1569) fue proporcionada por June-Kwon-Chung (NIH / NIAID, EE.UU.).

Muestras humanas:

10 Suero, plasma y sangre de donantes sanos se obtuvieron del Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, Zaragoza, España. Lavados broncoalveolares y sueros fueron obtenidos de pacientes con riesgo de aspergilosis invasiva (AI) en el Servicio de Microbiología del Hospital Miguel Servet, Zaragoza. AI se clasificó como posible / probable o probada de acuerdo a las directrices EORTC / MSG para la clasificación de las infecciones por hongos (Ascioglu S *et al.* 2002 Clin Infec Dis 34:7-14).

15 La determinación del índice de galactomanano en muestras humanas se realizó de modo rutinario en el Servicio de Microbiología (Hospital Miguel Servet, Zaragoza) mediante la prueba Platelia *Aspergillus*®, Bio-Rad. Todos los protocolos fueron supervisados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

Cromatografía en capa fina (HPTLC):

20 Placas: las placas de gel de sílice de alto rendimiento (placas de HPTLC, en vidrio de 10 cm × 10 cm; tamaño de partícula de 4.8 micras; tamaño de poro de 60Å; capa gruesa de 0,2 mm) fueron de Merck (Darmstadt, Alemania) y Macherey Nagel (Düren, Alemania).

25 Preparación de la muestra y aplicación:

1 - Estándares: GT y bmGT se disolvieron en MeOH, y se aplicaron sobre las placas HPTLC usando un aplicador de muestras Linomat IV (Camag, Muttentz, Suiza), como bandas de 4 mm.

30 2 - Adición *in vitro* sobre suero y plasma: Los compuestos puros o mezclas se disolvieron en suero o plasma humano, se extrajeron con diclorometano (DCM) (grado HPLC, Scharlau, Barcelona, España) (1:1 (v: v)) y se aplicaron sobre las placas. Posteriormente fueron separados por HPTLC tal y como se describe a continuación. La eficiencia de la extracción (precisión y exactitud) se determinó después de la adición de cantidades conocidas de GT y bmGT de suero o plasma humano y la posterior cuantificación de los compuestos extraídos.

35 3 - Adición *in vitro* sobre sangre: Los compuestos puros o mezclas de ellos fueron disueltos en la sangre humana y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, la sangre se centrifugó a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, el suero fue recuperado y GT y bmGT fueron extraídas y analizadas como se describe anteriormente.

40 4 - Filtrados de cultivos de mohos: Los filtrados de cultivos del moho fueron preparados como se describió previamente (Sugui JA *et al.* 2007 Eukaryot Cell 6(9):1562-1569). Brevemente, las esporas se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) a una densidad de 1x10⁵ esporas / ml. Después de 72 horas a 37 ° C, la suspensión se filtró a través de filtros de 0,2 μm (BD) y se almacenaron a -80 ° C. GT y bmGT fueron extraídas y analizadas como se describe anteriormente.

45 Desarrollo cromatográfico:

50 Las muestras se separaron usando una cámara de desarrollo horizontal (Camag) mediante la colocación de las placas hacia abajo. n-heptano (C7), MeOH, tetrahidrofurano (THF) y acetonitrilo (ACN) (grado HPLC, Scharlau,

Barcelona, España) se utilizaron como disolventes. La separación y cuantificación de GT y bmGT se realizó con una mezcla de THF: C7: ACN (40:58:2) (v: v: v) durante 3 min.

5 Detección y cuantificación mediante espectroscopía UV se utilizó un escáner TLC3 (Camag) en el modo UV con el que se llevó a cabo densitometría de barrido UV para la determinación de GT y bmGT (longitud de onda (λ) = 280 y 367 nm). Un barrido lineal con un haz de 4 mm \times 0,2 mm se utilizó en ambos casos. El área bajo los picos fue cuantificada y guardada utilizando el software de Camag.

10 Espectrometría de masas (MS):

Para la extracción de la GT y bmGT de las placas de HPTLC se utilizó un interfaz HPTLC-MS de Camag, utilizando MeOH como disolvente.

15 Para la identificación de GT y bmGT se utilizó un sistema de MS Sciex MDS, 3200 Q TRAMPA LC / MS / MS (Applied Biosystems) equipado con una fuente de ionización de electrospray (ESI).

Resultados

20 Aunque la GT fue aislada y caracterizada originalmente por cromatografía en capa fina (TLC) (Mullbacher A *et al.* 1985. *J Gen Microbiol* 131(5):1251-1258; Mullbacher A *et al.* 1984 *Proc Natl Acad Sci USA* 81(12):3835-3837), los métodos de detección habituales se basan actualmente en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS) (Sulyok *et al.* 2007 *Anal Bioanal Chem* 389(5):1505-1523; Vishwanath V *et al.* 2009 *Anal Bioanal Chem* 395(5):1355-1372). Aquí hemos empleado un método basado en HPTLC para separar, detectar y cuantificar GT y bmGT más sensible que los descritos en el estado del arte. Las ventajas principales del uso de HPTLC frente a HPLC son que las operaciones son más baratas, los resultados más rápidos y la posibilidad de analizar varias muestras al mismo tiempo para el análisis comparativo. Además, pueden ser ejecutados por personal del laboratorio no especializado. Por ejemplo, hemos sido capaces de analizar (detección, separación y cuantificación) 10 muestras en menos de 10 minutos, incluyendo la recuperación de la muestra.

30 En primer lugar se establecieron las condiciones óptimas para la extracción y separación de la GT y bmGT. Para ello hemos utilizado mezclas de compuestos puros o suero comercial humano al que se han añadido cantidades conocidas de estas mezclas. La separación óptima se obtuvo con la mezcla de disolventes C7: THF: ACN (58:40:2) (FIG. 2). Este protocolo de elución se utilizó en todos los estudios posteriores.

35 A continuación se determinó el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de las diferentes técnicas. Con este objetivo se realizaron mezclas de GT y bmGT y suero comercial humano en el rango de 1 a 75 ng/punto aplicación para cada toxina. Las muestras se aplicaron a la placa HPTLC, se desarrollaron los cromatogramas y la señal obtenida de las muestras se comparó con las muestras del blanco (suero humano sin toxinas) aplicadas al mismo tiempo. La muestra que originaba una relación señal-ruido de 3 fue seleccionada como LOD y de 10 como LOQ.

40 Detección por UV:

45 En primer lugar, se analizaron los espectros de absorción de GT y bmGT después de su elución a partir de mezclas de compuestos puros. Los espectros presentaban dos máximos de absorción a 280 y 367 nm para la GT, mientras que sólo un máximo se observaba a 280 nm para la bmGT (FIG 1A). Es importante destacar que estas diferencias entre los espectros son útiles para diferenciar y cuantificar los compuestos. Con el fin de evaluar si los componentes del suero inducían cambios en el espectro UV de GT y bmGT, se analizó el efecto del suero humano. Se añadió GT o bmGT a suero humano comercial, y posteriormente los compuestos se extrajeron, se aplicaron sobre las placas, se separaron y los espectros de UV se analizaron. Como se muestra en la FIG 2B los espectros de GT y bmGT eran idénticos a los de los compuestos puros (FIG 2A). Mediante el uso de la detección UV, hemos sido capaces de detectar 5 y 10 ng de GT y bmGT, respectivamente. Los límites de detección obtenidos son mejores que con otros métodos más complejos que los empleados en la presente invención. La cantidad más pequeña de GT utilizada en métodos como HPLC-MS fue de 15 ng en muestras de alimentos (Sulyok M *et al.* *Anal Bioanal Chem* 389(5):1505-1523) y 20 ng en cultivos de *A. fumigatus* (Kupfahl C *et al.* 2008 *Int J Med Microbiol* 298(3-4):319-327) o en muestras de suero humano (Lewis RE *et al.* 2005 *Infect Immun* 73(1):635-637. Un problema importante para este tipo de técnicas (HPCL-MS) podría ser un efecto matriz que produce una supresión de la señal, lo que reduce la sensibilidad de la detección. Otros métodos de HPLC necesitaban más 45ng de GT pura (Kupfahl C *et al.* 2008 *Int J Med Microbiol* 298(3-4):319-327; Kupfahl C *et al.* *FEMS Yeast Res* 7(6):986-992; Richard JL *et al.* *Mycopathologia* 107(2-3):145-151) añadida a muestras de alimentos o biológicas. La comparación con otros métodos que utilizan TLC indica que más de 100 ng / punto de aplicación eran requeridos para detectar la GT (Puri A *et al.* 2010 *Biomed Chromatogr* 24 (8):887-892; Wilhite S *et al.* 1994 *Phytopathology* 84(8):816-821). El método descrito en la presente invención permite detectar cantidades de GT y bmGT incluso más bajas que bioensayos específicos que necesitaban más de 18 ng de compuesto (Grovel O *et al.* 2006 *J Microbiol Methods* 66(2):286-293). Este método de detección (UV) fue elegido para la detección y cuantificación de GT y bmGT en muestras humanas. Recientemente,

Puri et al. (Puri A *et al.* 2010 Biomed Chromatogr 24 (8):887-892) describió un método, utilizando HPTLC, para la determinación cuantitativa de GT en el suero de pacientes con aspergilosis pero en dicho trabajo, el límite de detección fue de 25 ng / ml de GT y el rango de la muestra que se aplicó 100-1000ng/punto de aplicación. Estas cantidades son significativamente superiores a la cantidad detectada en la presente invención y por lo tanto, el método de la invención es más sensible y por lo tanto más útil para la detección precoz de enfermedades causadas por hongos productores de GT.

Precisión y exactitud de la detección de GT y bmGT:

Para definir la sensibilidad y la precisión de nuestro método, hemos analizado los porcentajes de recuperación de GT y bmGT de suero y plasma humanos, así como la desviación estándar relativa (RSD) de cuatro mediciones independientes realizadas en cuatro días diferentes (Tabla 1). Para ello diferentes cantidades de GT y bmGT se añadieron al suero o plasma de donantes sanos. Posteriormente, GT y bmGT se extrajeron, separaron y cuantificaron como se describe anteriormente.

Tabla 1. Eficiencia de la recuperación de GT y bmGT a partir suero humano, plasma y sangre.

Muestra	Masa ¹	% Gliotoxina (GT) ²			% Bis-metil-Gliotoxina (bmGT) ²		
		media	sd	RSD	media	sd	RSD
Suero	0,05 µg	77,97	14,63	18,77	75,95	11,71	15,42
	0,5 µg	94,34	7,20	7,63	96,10	8,19	8,53
	5 µg	91,79	9,10	9,91	94,65	6,09	6,43
Plasma	0,05 µg	80,09	6,30	7,87	85,28	4,22	4,94
	0,5 µg	98,14	4,23	4,31	94,96	2,07	2,18
	5 µg	95,99	5,55	5,78	96,33	8,18	8,49
Sangre	5 µg	8,44	0,34	16,08	73,21	2,31	12,85
	20 µg	6,56	0,17	10,42	87,24	2,01	9,23

¹ Masa de GT o bmGT añadida a 1 ml de suero, plasma o sangre total. Antes de la extracción, la sangre se centrifugó para eliminar la fracción celular.

² El porcentaje (%) de recuperación se calculó como la media y desviación estándar (SD) de 4 extracciones independientes.

Como se muestra en la tabla 1, la recuperación de GT y bmGT del suero y el plasma fue similar, siendo superior al 90% en la mayoría de los casos. Sólo cuando cantidades bajas de compuestos fueron añadidas (50 ng), la recuperación fue ligeramente menor, pero todavía alrededor del 80% en la mayoría de los casos. Los valores de RSD variaban entre el 2 y el 18%, lo que indica un nivel aceptable de reproducibilidad del método. Recuperación de GT y bmGT de sangre humana:

Paralelamente, se analizó la influencia de la presencia de células sanguíneas en la recuperación de GT y bmGT. En contraste con el suero y el plasma, se recuperó menos del 10% de GT de la sangre entera, incluso cuando se añadieron grandes cantidades de GT (20 ug) (Tabla 1). Por el contrario, el porcentaje de bmGT recuperado todavía era muy alto y comparable al de suero y plasma. La precisión de esta determinación era tan alta como en el suero o plasma con valores de RSD de entre el 9-16%. Alícuotas de sangre y plasma procedentes de la misma unidad de sangre se usaron simultáneamente para realizar estas determinaciones, por lo tanto, la única, pero crucial diferencia entre ambos fluidos es la presencia de glóbulos rojos y blancos en la sangre. Este resultado confirma que la GT, pero no la bmGT, se elimina rápidamente por las células *in vitro* y, por tanto, puede no ser detectada en los fluidos de los pacientes con AI. A pesar de que GT se ha detectado en muestras de suero de pacientes infectados, nuestros resultados sugieren que bmGT es un mejor para controlar la presencia de hongos en pacientes inmunodeprimidos ya que los resultados aquí mostrados muestran que no se elimina por las células del paciente.

Especificidad de la detección de GT y bmGT:

Nuestros datos sugieren que es posible detectar selectivamente GT si la absorción se mide a 367 nm. Trabajos anteriores han utilizado siempre las mediciones a 254 nm (Puri A *et al.* 2010 Biomed Chromatogr 24(8):887-892; Richard JL *et al.* 1989 Mycopathologia 107(2-3): 145-151). Nuestros resultados indican que la combinación de medidas tanto a 280 y 367 nm es la manera más precisa para evaluar la presencia de GT biológicamente activa, así como la relación de bmGT y GT. Esto es muy importante para establecer un diagnóstico más preciso y un pronóstico

de AI, ya que como se indicó anteriormente, GT puede ser incorporada por las células, enmascarando su detección (Tabla 1) y originando falsos negativos en el diagnóstico de AI.

5 Una de las ventajas del método de la invención es que la presencia de GT y bmGT puede evaluarse sin necesidad de utilizar el análisis de MS. Para validar esta afirmación, se decidió confirmar la identidad de GT y bmGT por MS. Después de la separación GT y bmGT partir de suero humano por HPTLC, ambas muestras se extrajeron en MeOH mediante un interfaz HPTLC-MS, con el fin de confirmar la identidad de los dos picos mediante MS tal y como se muestra en la Figura 3. Las muestras se infundieron directamente en la sonda ESI con una jeringa automática. Un análisis completo de MS mostró un ión más abundante a m/z 349 para GT y 380 para bmGT, correspondientes a los respectivos aductos de sodio $[M + Na]^+$. También se encontró el ión molecular $[M]^+$ a m/z 327,2 y 357,4, en cada caso, correspondiente al peso molecular calculado a partir de la fórmula molecular de GT y bmGT.

15 En ambos casos, el ión molecular $[M]^+$ fue seleccionado para la fragmentación en modo de Registro de Reacciones Múltiples (MRM). La fragmentación del compuesto con m/z 327,2 resultó en cuatro fragmentos mayoritarios con m/z 263,2, 245,2, 227,2 y 217,2 con una energía de colisión (CE) de 50. En el caso del compuesto con m/z 357,4 la colisión con el CE de 50, dio lugar a fragmentos de m/z 309,2, 273,2 y 261,2. El patrón de fragmentación que se manifiesta en el espectro de GT indica una pérdida de 64 unidades m/z , lo que corresponde a un puente disulfuro $[M-S_2]^+$. En el caso de su análogo ditiometilado se muestra la falta de 47 m/z unidades correspondientes a un grupo -SMe $[M-SMe]^+$. Estos datos confirman que estas moléculas corresponden a GT y bmGT, respectivamente.

20 Cuantificación de GT y bmGT:

25 Una vez que las condiciones óptimas para extraer, separar y detectar GT y bmGT se establecieron y la precisión, sensibilidad y especificidad se determinó, se procedió a utilizar este método para cuantificar GT y bmGT en suero, plasma y sangre humana. *A priori* no sabíamos la cantidad de GT y/o bmGT que puede estar presente en los fluidos de pacientes con AI. Por lo tanto, se analizó la linealidad de nuestro sistema de detección en un rango amplio de concentraciones. Se calcularon dos rectas de calibración representando concentraciones altas y bajas para cada compuesto mediante la adición de cantidades decrecientes de GT y bmGT a suero humano (Figura 4).

30 Las rectas se calcularon a las longitudes de onda en las que se habían observado los máximos de absorción UV para estos compuestos (FIG 2A). 280 nm y 367 nm en el caso de la GT y 280 nm en el caso de bmGT. En todos los casos la linealidad fue muy buena con valores de R^2 superiores a 0,98.

35 Detección de GT y bmGT en muestras de pacientes:

Por último, se analizó si la técnica descrita era capaz de detectar GT y/o bmGT en fluidos de seres humanos con AI posible / probable o probada. La mayoría de las muestras analizadas se tomaron de pacientes inmunodeprimidos con riesgo de AI (posible / probable), porque el número de muestras de casos de AI identificados positivamente (autopsia) era muy pequeña.

40 En primer lugar, se analizó si podíamos detectar GT y bmGT en un filtrado preparado a partir de un cultivo de una cepa de *A. fumigatus* aislada de un paciente. Como se muestra en la figura 5A, hemos sido capaces de detectar ambos compuestos. Al igual que en este aislado, de un total de 50 aislados clínicos analizados, hemos sido capaces de encontrar bmGT el 95% mientras que GT fue detectada en el 70% de los casos, lo que sugiere que la mayoría de los aislados clínicos de *A. fumigatus* producen el marcador bmGT.

50 A continuación las muestras de suero humanas fueron procesadas y después de la elución de las placas de HPTLC, la concentración de GT y/o bmGT se calculó mediante la extrapolación de los valores en la recta de calibración correspondiente. Un ejemplo del perfil de elución de las muestras de suero se muestra en la figura 5B. En todos los casos estudiados, la concentración de GT fue notablemente más baja que la de bmGT, lo que sugiere una vez más que bmGT permanece más tiempo en los fluidos humanos que el compuesto activo.

Tabla 2. Detección de GT y bmGT en muestras de pacientes en riesgo de o con AI posible / probable o probada.

Muestra ¹	Enfermedad ²	AI ³	Indice Galactomanano ⁴	GT (µg/ml)	bmGT (µg/ml)
1	ALL	Posible	0,5	-	5
2	EPOC	Probable	2,06	2,02	-
3	ALL	Probable	1,8	-	0,46
4	AML	Probable	0,5	-	1,56
5	AML	posible	-	-	-
6	AML	posible	-	-	49,84
7	ALL	posible	-	-	3,17
8	MS	posible	-	0.19	+

ES 2 568 228 T3

9	CLL-B	posible	-	-	2,04
10	AML	posible	-	-	2,17
11	AML	posible	-	-	-
12	CLL-B	posible	-	-	-
13	AML	posible	-	-	-
14	MM	posible	-	-	-
15	Sarcoma Ewing	posible	-	-	-
16	Leucemia aguda	posible	-	-	-
17	Tronbocitopenia	riesgo	-	-	-
18	Mieloproliferación	posible	-	-	-
19	Trasplante cardiaco	posible	-	-	-
20	ALL	probable	7.1	-	+
21	MG	probable	1.4	0.25	+
22	ALL	posible	-	-	-
23	Linfoma cerebral	posible	-	-	-
24	MM	posible	-	-	0.83
25	AML	posible	-	-	0.40
26	AML	posible	-	-	-
27	Transplante médula ósea	posible	-	-	-
28	Oncología	posible	-	-	5.05
29	AML	posible	-	-	0.47
30	Trasplante cardiaco	probable	1.22	-	3.52
31	AML	posible	-	-	-
32	Oncología hematológica	posible	-	-	14.26
33	MS	posible	-	-	-
34	Linfoma B	posible	-	-	-
35	Pancitopenia.	posible	-	-	19.99
36	sano	-	-	-	-
37	sano	-	-	-	-
38	sano	-	-	-	-
39	sano	-	-	-	-
40	sano	-	-	-	-
41	sano	-	-	-	-
42	sano	-	-	-	-
43	sano	-	-	-	-
44	sano	-	-	-	-
45	AML	- neutropenia ^o	-	-	-
46	AML	- neutropenia ^o	-	-	-
47	ALL	- neutropenia ^o	-	-	-
48	AML	- neutropenia ^o	-	-	-
49	AML	- neutropenia ^o	-	-	-
50	BMT	- neutropenia ^o	-	-	-
51	BMT	- neutropenia ^o	-	-	-
52	BMT	- neutropenia ^o	-	-	-

¹ todas las muestras son suero excepto la 20 y la 21 que son lavados broncoalveolares. Para la obtención del suero la sangre se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos y se recolectó la fracción soluble. Los lavados broncoalveolares se filtraron con un filtro de 0,2 µm. La extracción se realizó con diclorometano tal y como se describe anteriormente.

² enfermedad subyacente a la AI. ALL: Leucemia linfoblástica aguda; AML: Leucemia mieloide aguda; MG: Gammopatía Monoclonal; CLL: Leucemia linfática crónica; MS: síndrome mielodisplásico; MM: Mieloma múltiple

³ según las directrices EORTC/MSG para la clasificación de infecciones fúngicas

⁴ Índice superior a 0,5 es considerado como positivo

+ muestra positiva por debajo del límite de cuantificación (10 ng/ml)

⁵ muestras control procedentes de pacientes con neutropenia pero sin ninguna evidencia de infección micológica. Junto con las muestras de pacientes sanos indican que el marcador bmGT no se detecta en personas sin riesgo o sin ninguna evidencia de infección.

Como se muestra en la tabla 2, el método de la invención es capaz de detectar bmGT en 3 de 4 sueros de pacientes con AI probable (75%) y 12 de 28 con AI posible (43%). Cabe destacar que de los casos posibles el galactomanano sólo fue detectado en 1 de ellos. La GT sólo se detectó en uno de los sueros con AI probable de ellas (25%) y en otro con posible (3%). En las dos muestras de lavados broncoalveolares que estaban disponibles (muestras 20 y 21) se detectó bmGT. Cabe destacar que fuimos capaces de encontrar bmGT en las muestras 6, 7, 8, 9, 10, 24, 25, 28, 29, 32 y 35 donde el galactomanano (el marcador principal actual para el diagnóstico de AI) no era detectable, lo que sugiere que la bmGT puede ser un marcador más precoz para revelar la presencia de *Aspergillus*. Se debe indicar que en todas las muestras posibles en las que no se detectó bmGT, tampoco se detectó el galactomanano ni existía ninguna evidencia de infección micológica. Como controles se han utilizado dos grupos diferentes: donantes sanos y pacientes neutropénicos (en riesgo de infección por *aspergillus*) en los que no existe ninguna evidencia de infección (fiebre, tos, dificultad respiratoria, etc). En ninguno de estos grupos se detectó GT o bmGT.

En la mayoría de los casos la concentración de GT fue mucho menor que la concentración de bmGT, lo que sugiere que la prevalencia del GT en el suero es más transitoria que bmGT. Este resultado confirma nuestra hipótesis de que la vida media de bmGT en el suero es más larga que la de GT y, por lo tanto, es un marcador de diagnóstico mejor.

Por lo tanto, se han realizado los estudios necesarios para confirmar la precisión y sensibilidad de la detección de SS'-dimetil-gliotoxina en suero humano mediante (cromatografía de capa fina con detección por UV). Asimismo, se ha confirmado que el método de detección de la invención es fiable (realmente detecta SS'-dimetil-gliotoxina y no otros compuestos similares) mediante espectrometría de masas (LC-MS-MS). En la presente invención se han utilizado muestras procedentes de sangre de donantes sanos, pacientes neutropénicos sin evidencia de infección, pacientes con aspergilosis posible o pacientes con aspergilosis probable. En ninguno de las muestras de donantes sanos o neutropénicos sin evidencia de infección se ha encontrado SS'-dimetil-gliotoxina. Nuestros datos indican que mientras la forma activa de la gliotoxina se presenta en algunos de ellos, la SS'-dimetil-gliotoxina se presenta en un porcentaje mucho más significativo de dichas muestras (alrededor del 75% en muestras probables -positivas en galactomanano- y del 43% en muestras posibles e incluso es detectada en un 40% de muestras negativas en galactomanano (tabla 2). Esto puede ser explicado a que la GT es muy activa y rápidamente metabolizada por los tejidos del organismo. En cambio, la bmGT es inerte y no se incorpora a los tejidos por lo que su presencia en los fluidos del organismo es más estable. De hecho, nuestros datos indican que si añadimos GT a muestras de sangre total y analizamos sus niveles en plasma (fracción líquida de la sangre) tras 10 minutos, el 90% de la GT se ha perdido en las células de la sangre (Tabla 1). En cambio solo un 10-15% de la bmGT se pierde en estas condiciones. Este hecho nos indica que la detección de bmGT origina muchos menos falsos negativos que la detección de GT. Además en algunas muestras somos capaces de detectar bmGT antes que el galactomanano, marcador actual de aspergilosis invasiva (Tabla 2). Los análisis se han llevado a cabo en muestras de suero humano obtenido a partir de sangre periférica y en lavados broncoalveolares (tabla 2). Otros datos que apoyan la presente invención han sido generados utilizando cepas de *Aspergillus fumigatus* aisladas a partir de personas con Aspergilosis confirmada. Nuestros datos indican que la mayoría de estos aislados clínicos son capaces de producir bmGT, lo que apoya la generalidad de dicho marcador. Por lo tanto, los resultados obtenidos sirven de base para el uso *in vitro* de la bmGT como se describe en el segundo aspecto de la invención y además, la presente invención muestra un método basado en la detección de bmGT para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento tal y como se describe en el primer aspecto de la invención.

Análisis de la presencia de GT y bmGT en una serie secuencial de suero de pacientes con riesgo de aspergilosis invasiva (paciente con leucemia mieloide aguda y paciente con leucemia linfática aguda).

Como se muestra en la figura 6A, ni el galactomanano ni la bmGT se detectaron durante las primeras etapas de la quimioterapia (idarrubicina más citarabina). Sin embargo, el nivel de ambos compuestos aumentó notablemente después de terminar el tratamiento, cuando el paciente tenía neutropenia grave. El tratamiento con anfotericina B liposomal (L-AMB) redujo progresivamente los niveles de ambos marcadores. Es importante destacar que hemos encontrado más muestras positivas para bmGT que para galactomanano entre los días 04/10 y 13/10. bmGT se detectó en todas las muestras, mientras que una muestra fue negativa para galactomanano (06/10) y otra estaba en su límite de detección (04/10). Los resultados para el segundo paciente (figura 6B) fueron similares a los del primero. bmGT y galactomanano aparecieron después de que el paciente fuera tratado con quimioterapia intensiva (ciclofosfamida / metotrexato / citarabina / hidrocortisona) y disminuyeron después del tratamiento antifúngico. Estos dos ejemplos ilustran nuevamente que la bmGT puede ser utilizada como marcador específico de aspergilosis invasiva y que puede ayudar a mejorar los métodos actuales utilizados en el diagnóstico de esta infección.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico y/o seguimiento de patologías causadas por hongos productores de gliotoxina o de derivados de gliotoxina caracterizado por la detección de SS'-dimetil-gliotoxina en la muestra biológica de un sujeto, donde los hongos son hongos del género *Aspergillus*.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, donde la detección se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:
 a. separación de SS'-dimetil-gliotoxina en la muestra, mediante cromatografía;
 b. detección y/o cuantificación del compuesto separado en (a) mediante espectroscopia ultravioleta.
- 15 3. El método según la reivindicación 2, donde la separación del paso (a) se lleva a cabo mediante cromatografía en capa fina (HPTLC).
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde la detección del paso (b) se realiza entre 220 y 400 nm.
5. El método según la reivindicación 4, donde la detección del paso (b) se realiza a 280nm.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el hongo es *Aspergillus fumigatus*.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la patología es aspergilosis, preferiblemente la aspergilosis es aspergilosis invasiva.
- 25 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el sujeto es humano.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra biológica se selecciona entre suero, plasma, sangre o lavado broncoalveolar.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde además comprende la detección de componentes biológicos o de metabolitos de hongos, donde dichos componentes o metabolitos se seleccionan de la lista que comprende: galactomanano, (1-3)beta-D-glucano, ADN, antígenos, gliotoxina, gliotoxina E, Gliotoxina G, S-metilgliotoxina, ácido helvólico, sirodesminas, arantina, emestrina, ditiosilvatina, esporidesmina, esterigmatocistina, aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o cualquiera de sus combinaciones.
- 35 11. El método según la reivindicación 10, donde se detecta gliotoxina mediante los siguientes pasos:
 a. separación de gliotoxina en la muestra, mediante cromatografía;
 b. detección y/o cuantificación del compuesto separado en (a) mediante espectroscopia ultravioleta.
- 40 12. El método según la reivindicación 11, donde la detección del paso (b), para la gliotoxina, se realiza entre 220-400 nm, preferiblemente a 280 y 367nm.
- 45 13. Uso *in vitro* de SS'-dimetil-gliotoxina como marcador para el diagnóstico, pronóstico y/o de seguimiento de patologías causadas por un hongo productor de gliotoxina o derivados de gliotoxina en un sujeto, preferiblemente la patología es aspergilosis invasiva, donde los hongos son hongos del género *Aspergillus*.
- 50 14. Uso *in vitro* de SS'-dimetil-gliotoxina según la reivindicación 13, combinado con al menos un componente biológico o metabolito de hongos productores de gliotoxina, seleccionado de la lista que comprende galactomanano, (1-3)beta-D-glucano, ADN, antígenos, gliotoxina, gliotoxina E, Gliotoxina G, S-metilgliotoxina, ácido helvólico, esporidesmina, esterigmatocistina, aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o cualquiera de sus combinaciones.

FIG.1A

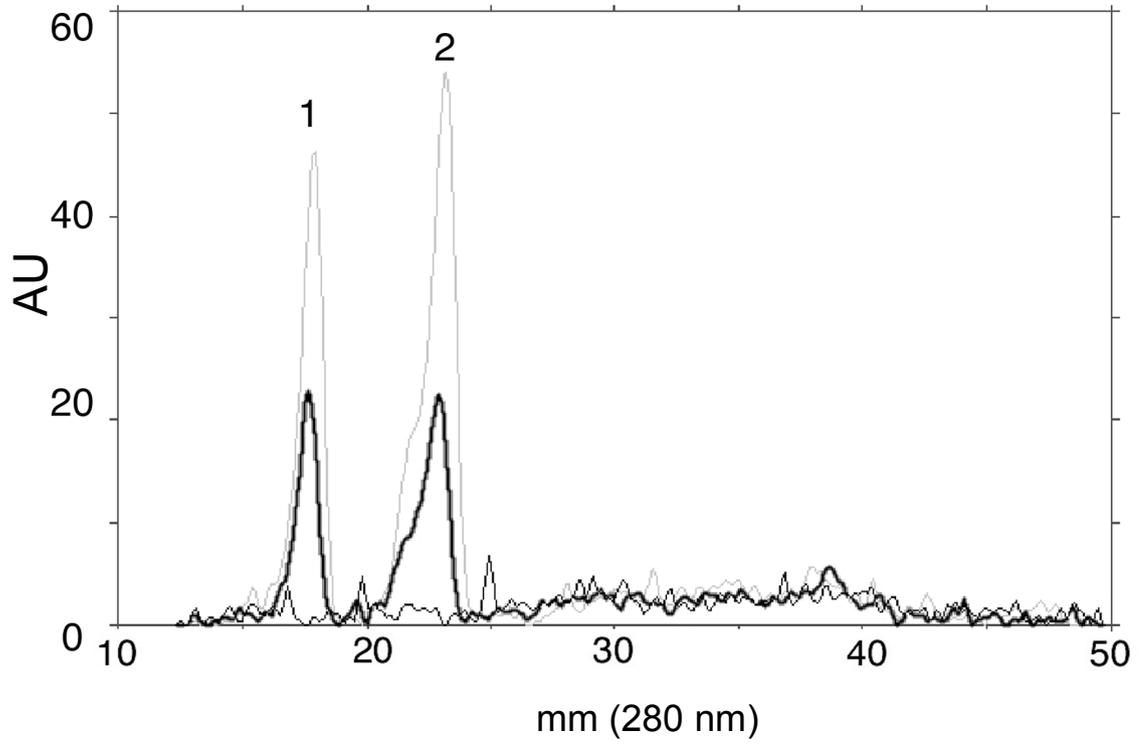


FIG.1B

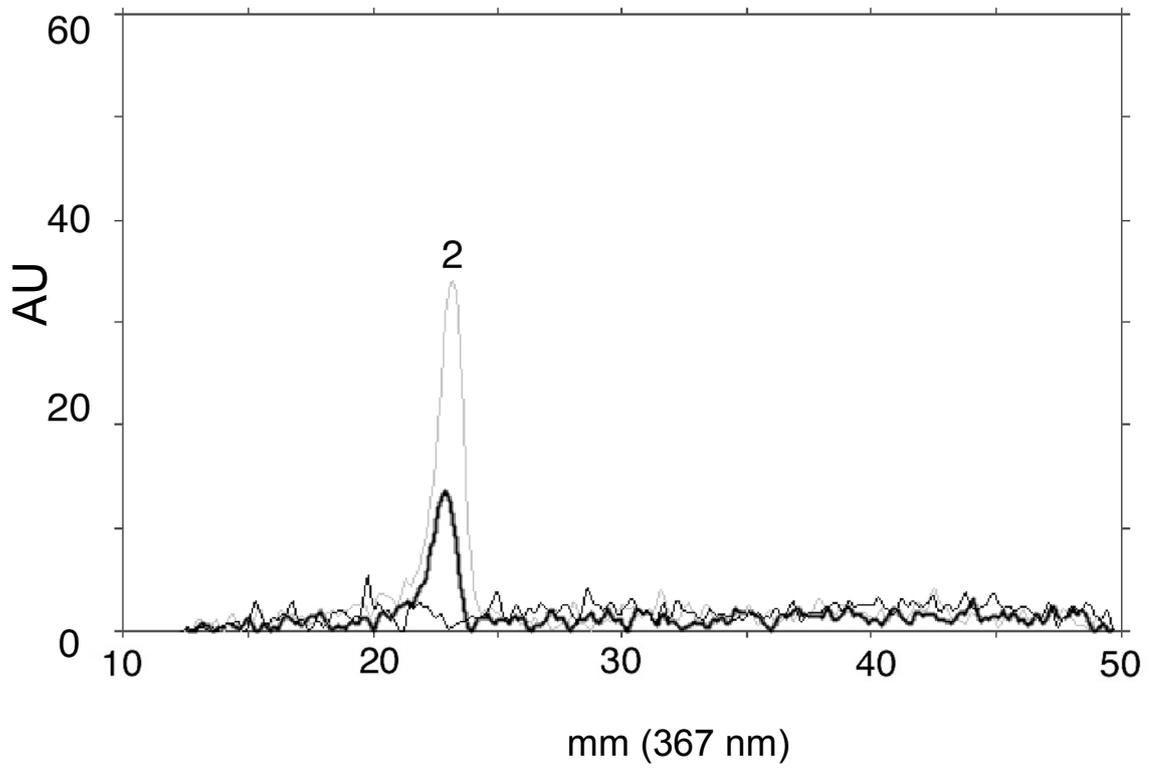


FIG.2 A

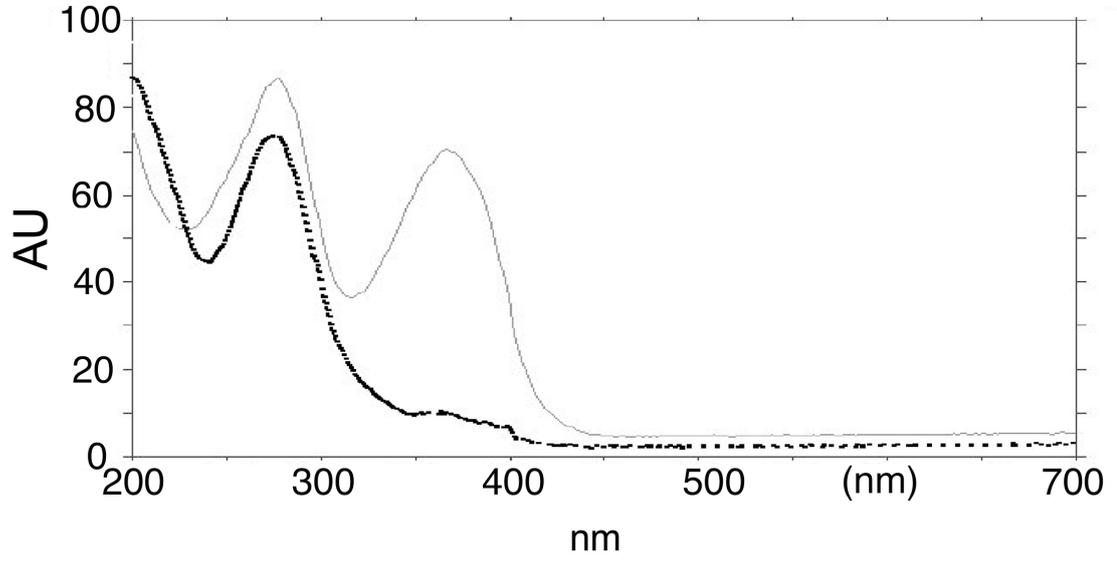


FIG.2 B

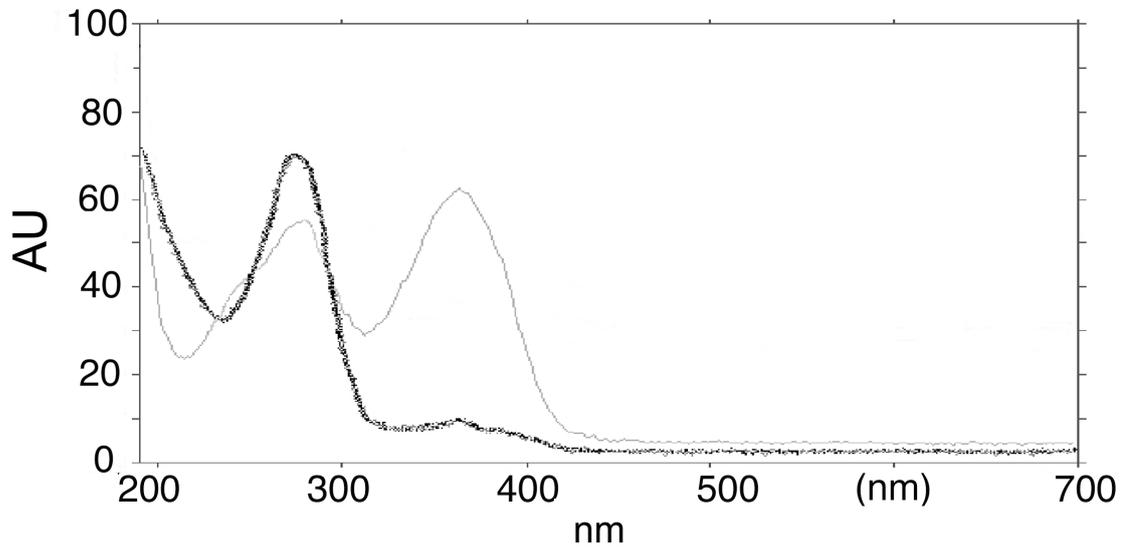


FIG.3 A

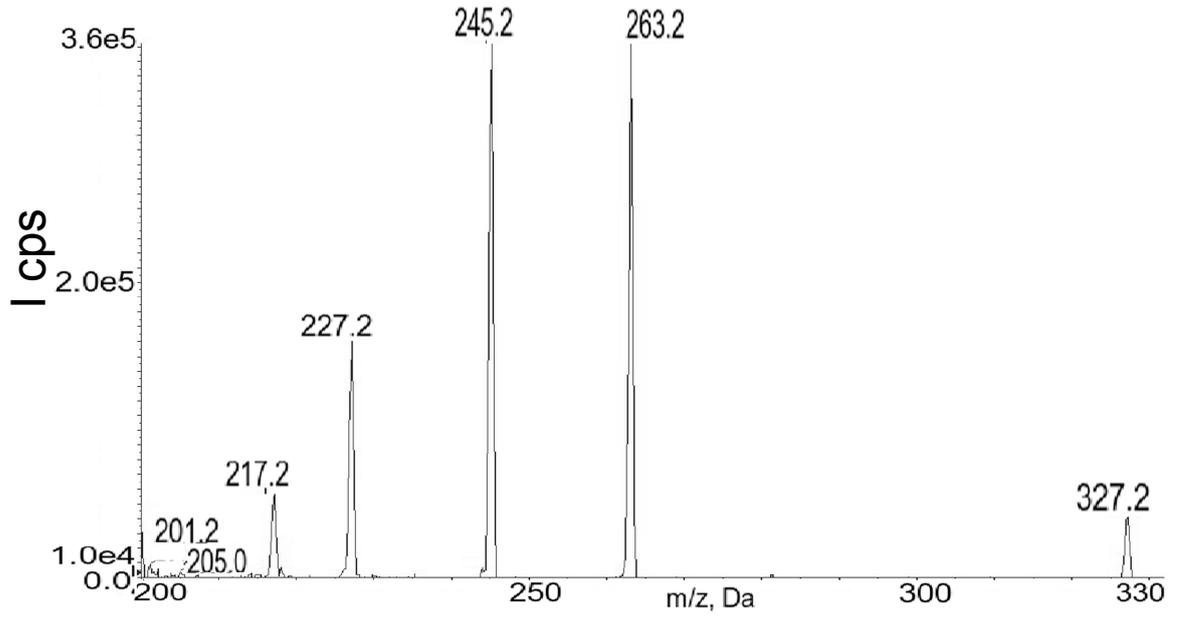


FIG.3 B

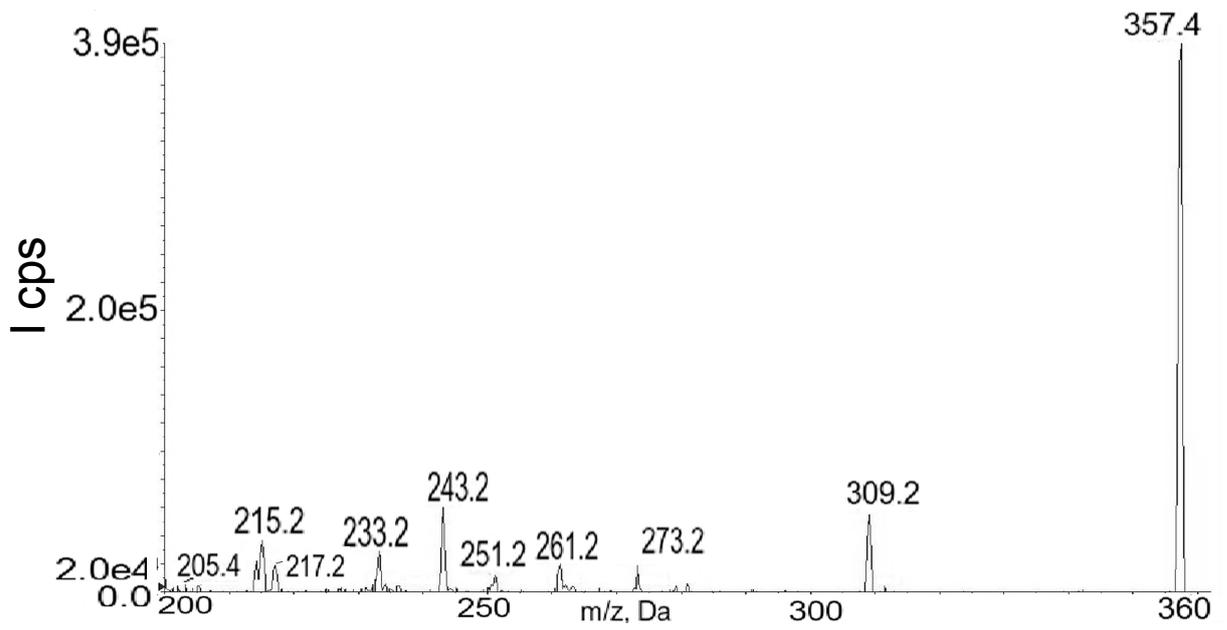


FIG. 4A

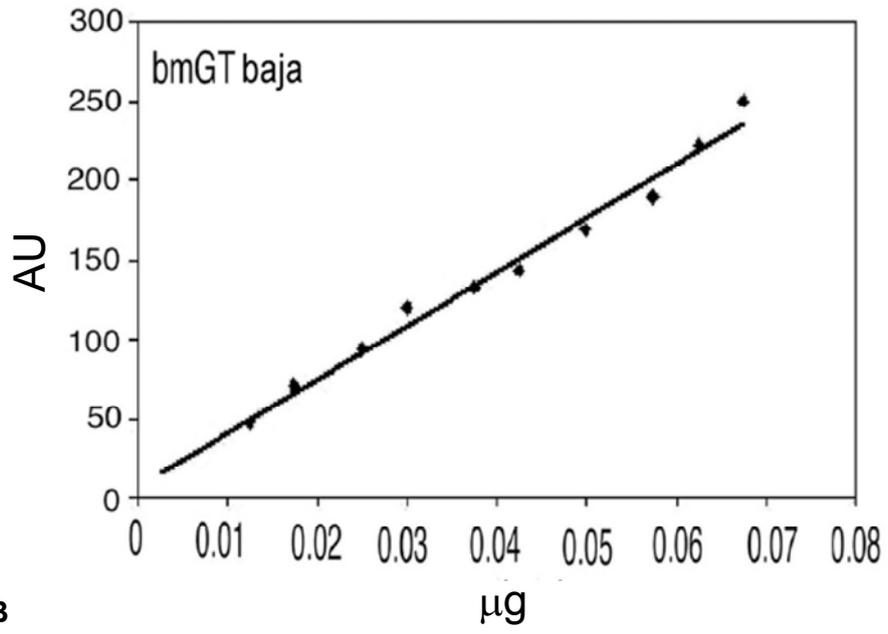


FIG. 4B

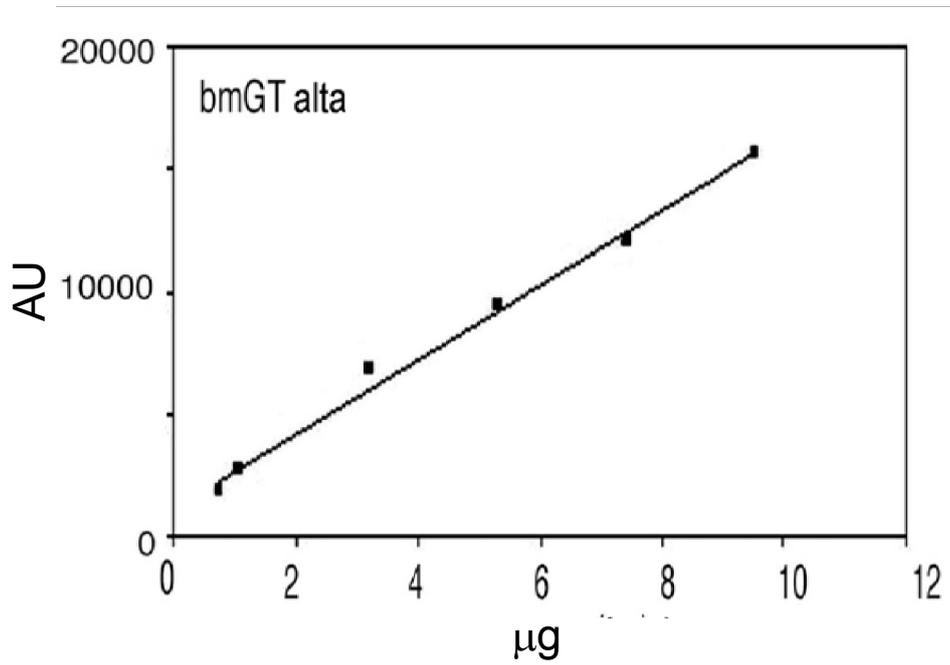


FIG. 4C

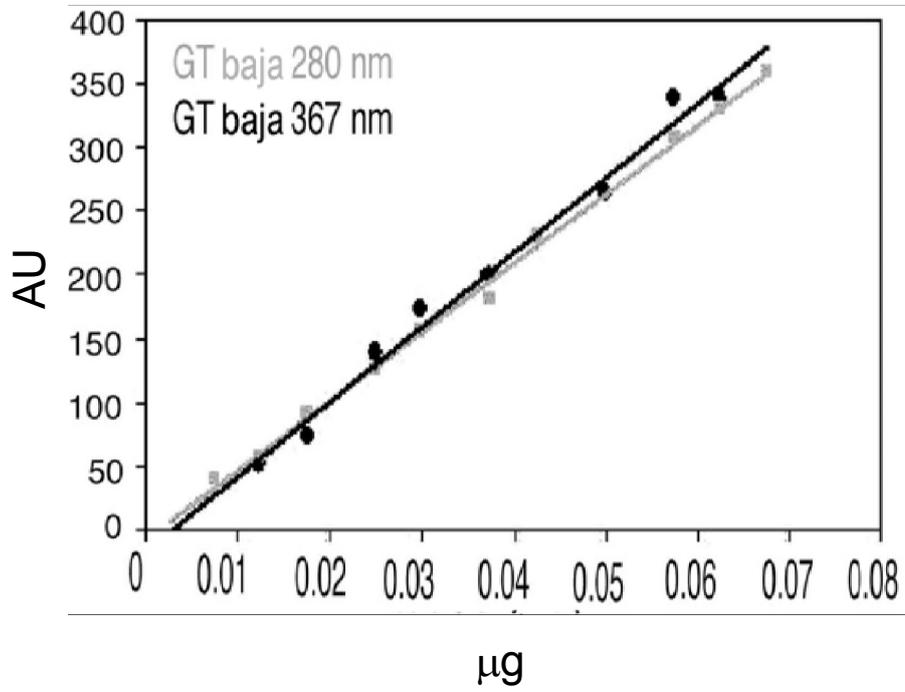


FIG. 4D

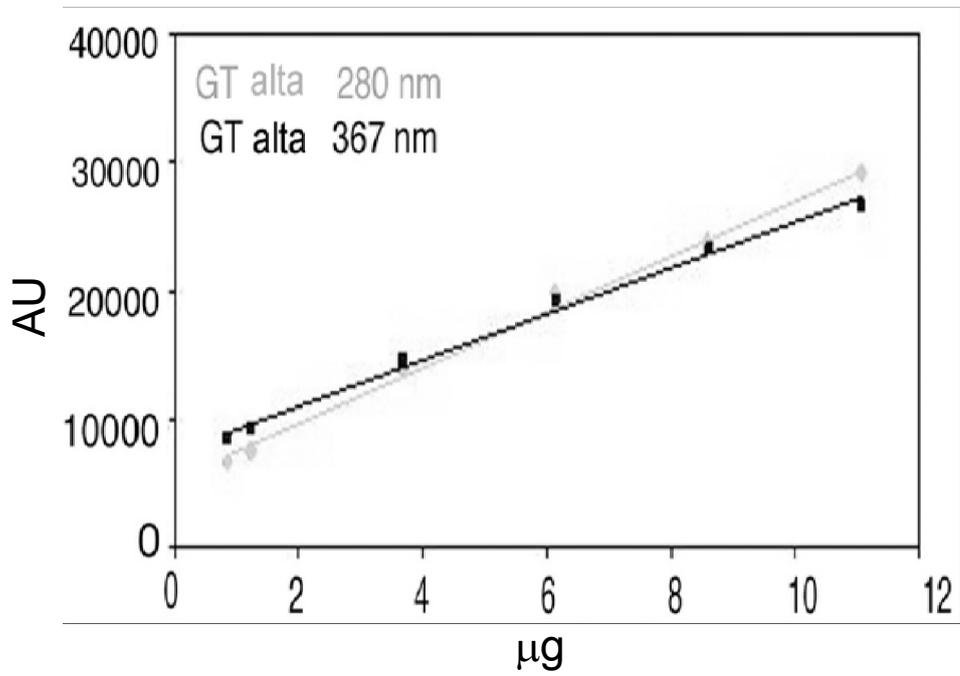


FIG. 5A

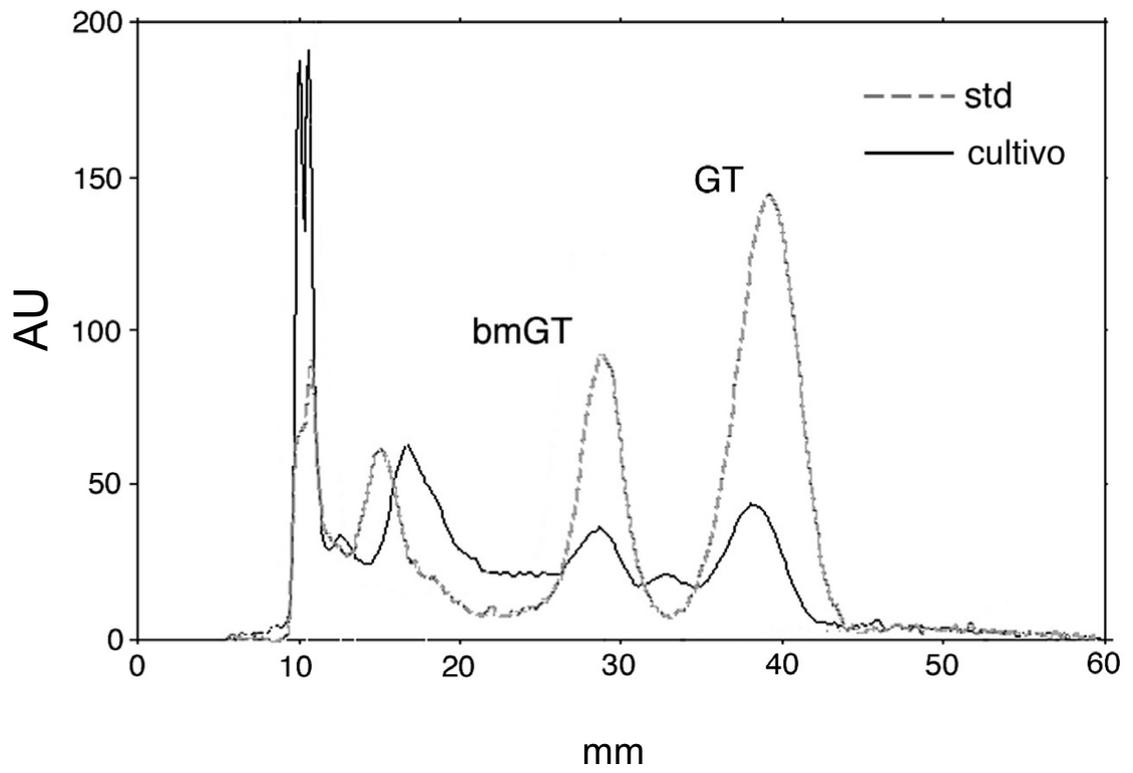


FIG. 5B

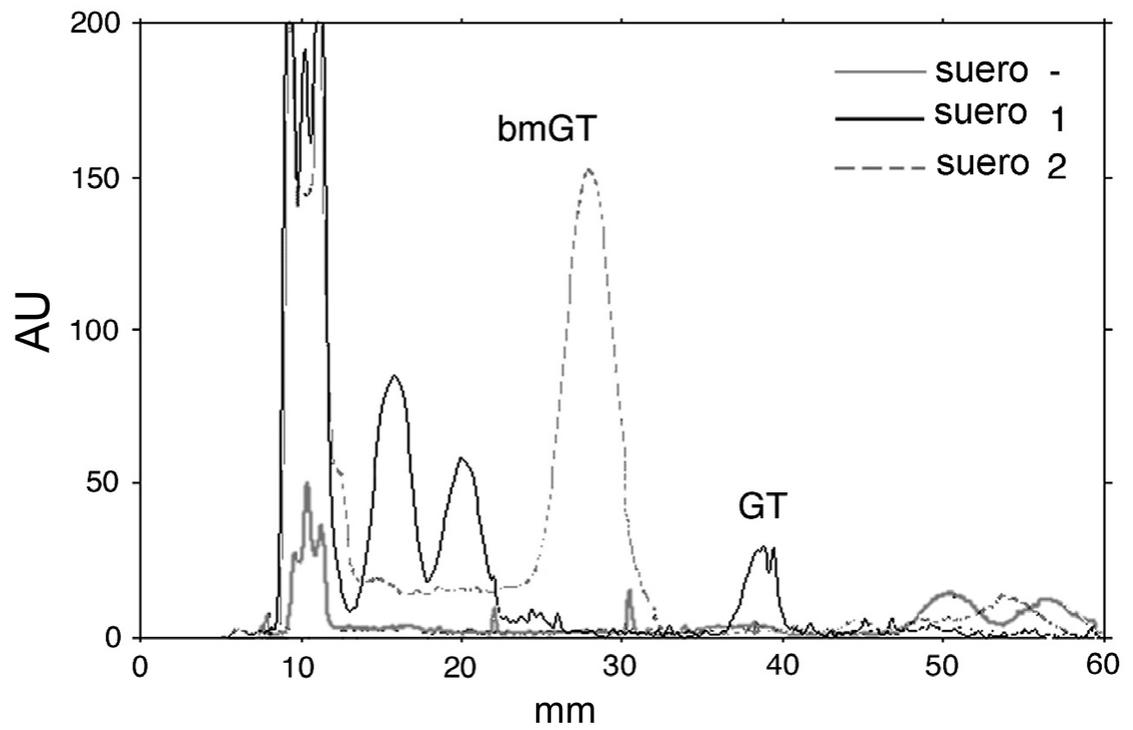


FIG. 6

