(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 114**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2009 PCT/US2009/064310**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10120330**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2009 E 09843480 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2419742**

(54) Título: **Detección de fosfolipidosis y diagnóstico de trastornos de almacenamiento lisosómico**

(30) Prioridad:

16.04.2009 US 169789 P
14.10.2009 US 579121

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2018

(73) Titular/es:

NEXTCEA INC. (100.0%)
500 West Cummings Park, Suite 4550
Woburn, MA 01801, US

(72) Inventor/es:

HSIEH, FRANK y
TENGSTRAND, ELIZABETH

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

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

ES 2 684 114 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

Detección de fosfolipidosis y diagnóstico de trastornos de almacenamiento lisosómico

Antecedentes

La fosfolipidosis medicamentosa es un trastorno de almacenamiento lisosómico caracterizado por la acumulación excesiva de fosfolípidos en células y tejidos. La fosfolipidosis es un hallazgo común en estudios de toxicidad de fármacos anfifílicos catiónicos (CAD, por sus siglas en inglés) tanto en animales como en seres humanos y se ha convertido en una preocupación significativa para las agencias reguladoras. Las preocupaciones principales para las agencias reguladoras son las fosfolipidosis medicamentosas de los tejidos del hígado, riñones, músculos, corazón y pulmones, que podrían contribuir a los efectos adversos de fármacos en estos órganos. Los efectos morfológicos de la fosfolipidosis medicamentosa en tejidos se asemejan a las figuras de mielina verticiladas en los tejidos de pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC). La NPC y otros trastornos de almacenamiento lisosómico hereditarios dan como resultado la acumulación dañina de materiales lipídicos (por ejemplo, lípidos, glucolípidos, lipoproteínas) en las células y tejidos del cuerpo. Con el transcurso del tiempo, el almacenamiento excesivo de los materiales lipídicos provoca daño celular y tisular permanente, particularmente en el cerebro, sistema nervioso periférico, hígado, bazo y médula ósea.

En la actualidad, la fosfolipidosis medicamentosa no se puede determinar de un modo no invasivo. Baronas *et al*. (Toxicology and Applied Pharmacology, 2007; 218: 72-78) describen que unos niveles urinarios de di-docosahexaenoílo (22:6)-bis(monoacilglicerol)fosfato se correlacionaban con la inducción de fosfolipidosis en ratas tratadas con amiodarona, gentamicina o azitromicina. Una tesis de doctorado francesa de Bouvier J. (L'Institut Naciónal des Sciences Appliquées de Lyon) describe biomarcadores para la fosfolipidosis, aunque no se identifica la isoforma particular de di-22:6-BMP. Peter J. Meikle *et al*. (Biochem J., 2008; 411: 71-78) describen el efecto del almacenamiento lisosómico sobre BMP en fibroblastos cultivados de pacientes con ocho trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD, por sus siglas en inglés) diferentes y concluyen que BMP pueden ser útiles como biomarcador para un subgrupo de LSD. Se necesitan biomarcadores fácilmente accesibles para determinar la aparición y la evolución temporal de la fosfolipidosis en estudios preclínicos y clínicos, y para explorar las relaciones entre la fosfolipidosis y las toxicidades de los fármacos.

Sumario

Esta invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que los niveles de diferentes especies de di-docosahexaenoílo (22:6)-bis(monoacilglicerol)fosfato (di-22:6-BMP), di-docosahexaenoílo (22:6)-fosfatidilglicerol (di-22:6-PG), y mono-docosahexaenoílo (22:6)-bis(monoacilglicerol)fosfato (mono-22:6-BMP) se correlacionan de forma diferente con la fosfolipidosis inducida por diferentes fármacos y trastornos de almacenamiento lisosómico hereditarios.

Por consiguiente, un aspecto de esta invención presenta un método para evaluar la actividad de un compuesto de prueba (incluyendo un fármaco autorizado) para inducir fosfolipidosis en un sujeto destinatario. El método se lleva a cabo (a) obteniendo una disolución que contiene (1) una muestra de prueba de un sujeto de prueba al que se le ha administrado un compuesto de prueba o (2) una población de células de prueba que se han puesto en contacto con el compuesto de prueba o (3) vesículas endocíticas aisladas de la muestra de prueba o las células de prueba; y (b) determinando el nivel de un primer biomarcador en la muestra de prueba, células o vesículas endocíticas, en el que el grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3'di-22:6-BMP, di-22:6-PG, 2-mono-22:6-BMP y 3-mono-22:6-BMP, cuyas estructuras se muestran en las figuras 1 a 3. El nivel de cada biomarcador se compara con un nivel predeterminado para cada biomarcador. Se determina que el compuesto de prueba tiene la actividad de inducir fosfolipidosis en el sujeto destinatario si el nivel de cualquiera del grupo de biomarcadores está en o por encima de un nivel predeterminado.

Cuando se utiliza un sujeto de prueba, el nivel predeterminado puede ser un nivel obtenido a partir del sujeto de prueba antes del tratamiento con fármaco o un sujeto de control apropiado que es idéntico al sujeto de prueba salvo que al sujeto de control no se le ha administrado el compuesto de prueba. Cuando se utilizan células de prueba, el nivel predeterminado puede ser un nivel obtenido a partir de una población de células de control que son idénticas a la población de células de prueba salvo que las células de control no se han puesto en contacto con el compuesto de prueba.

Un "sujeto" se refiere a ya sea un ser humano o un animal no humano. Los ejemplos de animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (por ejemplo, ratones, ratas o cobayas), cerdos, gatos y no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal que se utiliza en la evaluación de la seguridad de fármacos o un modelo de enfermedad en animales adecuado. En una realización preferida, el sujeto destinatario es un ser humano para evaluar la actividad de un compuesto de prueba para inducir la fosfolipidosis en los seres humanos. El sujeto de prueba puede ser un mamífero, tal como un roedor, perro, cerdo, primate no humano o ser humano.

Otro aspecto de esta invención presenta un método para gestionar el tratamiento de un paciente. Preferiblemente, un paciente de este tipo tiene una forma hereditaria de, o corre el riesgo de desarrollar, un trastorno de almacenamiento lisosómico que da como resultado la acumulación de materiales lipídicos en células y tejidos afectados (tal como fosfolipidosis) y efectos secundarios clínicos relacionados en respuesta al tratamiento. El método incluye las etapas de (1) identificar un paciente sometido a, o que necesita, un tratamiento para una afección, (2) determinar el nivel de un grupo de biomarcadores en una muestra de prueba que se ha obtenido a partir del paciente. El grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3' di-22:6-BMP, di-22:6-PG, 2-mono-22:6-BMP y 3-mono-22:6-BMP. El nivel de cada biomarcador se compara con un nivel predeterminado para cada biomarcador. Se determina que el paciente no es adecuado para la iniciación o continuación del tratamiento si el nivel de cualquiera del grupo de biomarcadores está en o por encima de un valor predeterminado. En un ejemplo, el nivel predeterminado es un nivel obtenido a partir de un sujeto de control que padece fosfolipidosis.

En un aspecto adicional, esta invención presenta un método de diagnóstico de un trastorno de almacenamiento lipídico en un sujeto humano o no humano. El método incluye determinar el nivel de un grupo de biomarcadores en una muestra de prueba que se ha obtenido a partir del sujeto, en el que el grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3' di-22:6-BMP, di-22:6-PG, 2-mono-22:6-BMP y 3-mono-22:6-BMP. El nivel de cada biomarcador se compara con un nivel predeterminado para cada biomarcador. Un nivel de expresión incrementado de uno cualquiera del grupo de biomarcadores relativo a un nivel predeterminado es indicativo del trastorno de almacenamiento lipídico o una predisposición a desarrollar el trastorno en el futuro. En particular, este método se puede utilizar para determinar si un sujeto humano padece o corre el riesgo de desarrollar la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC) u otro tipo de lipidosis lisosómica, tal como la lipofuscinosis neuronal ceroidea o la fosfolipidosis. En el caso de la enfermedad de NPC, el nivel predeterminado del primer biomarcador es un nivel obtenido a partir de un sujeto de control que padece la enfermedad de NPC.

En otro ejemplo, cada método incluye además una etapa de separación de 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, di-22:6-PG, 2-mono-22:6-BMP y 3-mono-22:6-BMP unos de otros antes de determinar el nivel del primer biomarcador. Por ejemplo, se pueden separar dos, tres o todos los marcadores, por ejemplo, utilizando cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con el fin de evaluar el nivel de cada marcador de forma individual (tal como se muestra en la figura 4). La etapa de determinación se puede llevar a cabo mediante LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS o ELISA.

En cada método, la muestra de prueba puede ser una muestra de sangre completa, muestra de plasma, muestra de suero, muestra de orina o sedimento urinario, muestra de líquido de lavado broncoalveolar, muestra de linfa, muestra de líquido cefalorraquídeo, muestra de saliva, muestra de semen, muestra de leche materna o muestra de heces. La muestra de prueba también puede ser una muestra de tejido del hígado, riñón, músculo, corazón, pulmón, bazo, ganglio linfático, médula ósea, piel, válvulas y vasos sanguíneos, ojo o cerebro. En una realización, la población de las células de prueba puede incluir células de lavado broncoalveolar, eritrocitos, glóbulos blancos, células nerviosas, fracciones de células hepáticas, fibroblastos cutáneos, histiocitos de médula ósea, células de vellosidades coriónicas, células del epitelio pigmentario de la retina o células de líquido amniótico. La muestra de prueba también puede ser vesículas endocíticas aisladas, tales como endosomas, lisosomas y exosomas derivados de células y tejidos. En otra realización, las células de prueba son células de la línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), línea celular epitelial de hígado de ratón diploide (ARLJ301-3), línea celular de pulmón de hámster chino (CHL/IU), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de adenocarcinoma de riñón humano (769-P humanas), células tubulares proximales de riñón humano (HK-2) o línea celular similar a macrófagos de ratón (J744A).

Cada uno de los métodos descritos anteriormente puede incluir además una etapa de determinación del nivel de un segundo biomarcador de la fosfolipidosis. Este segundo biomarcador puede ser un lípido o una proteína como los que se dan a conocer a continuación. En un ejemplo, cada uno de los métodos descritos anteriormente puede incluir además una etapa de determinación de los niveles de otros fosfolípidos, tales como diferentes especies de fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), ácido fosfatídico (PA) u otros tipos de materiales lipídicos, incluyendo lisofosfolípidos, esfingolípidos, glucolípidos, colesterol, lipoproteínas, etc. En un segundo ejemplo, cada método puede incluir además una etapa de determinación de los niveles de proteínas asociadas con las rutas de degradación celular y la función lisosómica, tales como las proteínas LC3, Beclin-1, Niemann-Pick C1 y C2 (NPC1 y NPC2), y anexina II. En otro ejemplo, los métodos descritos anteriormente pueden incluir además una etapa de determinación de los niveles de especies adicionales de BMP, el nivel de BMP total o la clasificación de ácidos grasos del BMP total.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra estructuras de especies de di-22:6-BMP, en las que R es alquenilo alifático (22:6, 18:1 o 18:2).

La figura 2 es un diagrama que muestra la estructura del di-docosahexaenoílo (22:6)-fosfatidilglicerol (di-22:6-PG), en la que R es alquenilo alifático (22:6, 18:1 o 18:2).

La figura 3 es un diagrama que muestra la estructura del mono-docosahexaenoílo (22:6)-bis(monoacilglicerol)fosfato (mono-22:6-BMP), en la que R es alquenilo alifático (22:6, 18:1 o 18:2).

La figura 4 es un análisis por LC-MS de diferentes especies/isoformas de di-22:6-BMP y di-22:6-PG en orina de rata.

Las figuras 5A y 5B son análisis por LC-MS de diferentes especies/isoformas de di-22:6-BMP en orina de ratas tratadas con amiodarona (5A), azitromicina (5A) o citalopram (5B).

La figura 6 es un análisis por LC-MS de isoformas de di-22:6-BMP y di-22:6-PG en orina de ratas tratadas con cloroquina y amiodarona.

La figura 7 es un diagrama que muestra la intensidad de di-22:6-PG en orina de ratas tratadas con amiodarona.

Las figuras 8A y 8B son diagramas que muestran niveles de 2,2' di-22:6-BMP en muestras de orina de ratas Sprague-Dawley que recibieron tratamientos de control, amiodarona (150 mg/kg/día), cloroquina (120 mg/kg/día) o el compuesto A (50 mg/kg/día).

La figura 9 es un diagrama que muestra los niveles de di-22:6-BMP (incluyendo todas las isoformas) en la orina de ratas Sprague-Dawley tras un tratamiento con azitromicina.

La figura 10 es un diagrama que muestra los niveles de isoformas de mono-22:6-BMP, mono-18:1-BMP y mono-18:2-BMP en el tejido de pulmón de ratas tratadas con el compuesto de prueba ABC en comparación con ratas tratadas sin ningún fármaco (vehículo).

Descripción detallada

Esta invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que los niveles de diferentes especies de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP se correlacionan de forma diferente con la fosfolipidosis inducida por diferentes fármacos y trastornos de almacenamiento lisosómico hereditarios, tales como la enfermedad de NPC.

Fosfolipidosis medicamentosa

La fosfolipidosis medicamentosa es un trastorno de almacenamiento fosfolipídico que da como resultado la acumulación excesiva de fosfolípidos en tejidos. Diversos fármacos pueden inducir fosfolipidosis. Entre ellos, los fármacos anfifílicos catiónicos (CAD) pueden penetrar en la membrana plasmática y son secuestrados dentro de los lisosomas en los que quedan atrapados en el entorno ácido. Otros compuestos fosfolipidóticos, tales como antibióticos aminoglucósidos, se suministran al compartimento lisosómico por receptores glucoproteicos o tras la unión a fosfolípidos cargados negativamente sobre la superficie celular. Una acumulación gradual de complejos de fármaco-fosfolípido no digeridos y una disminución en las actividades de las enzimas lisosómicas dan como resultado la acumulación intracelular de múltiples láminas (cuerpos mieloides) tras una exposición prolongada a fármacos.

El marcador más consolidado de la fosfolipidosis es la acumulación anómala de cuerpos mieloides en el citoplasma o lisosomas de células afectadas. Los cuerpos mieloides se pueden visualizar en secciones de tejido delgadas, células de sangre periférica y sedimento urinario utilizando microscopía electrónica. Se caracterizan por varias capas concéntricas de material membranoso denso en electrones rodeado por una única membrana limitante. Los cuerpos mieloides se producen de forma natural en algunos tejidos en los que generalmente sirven como vesículas de almacenamiento para materiales lipídicos y proteicos atrapados o secretados dentro de los lisosomas. En la fosfolipidosis medicamentosa, los cuerpos mieloides también sirven como repositorios para el exceso de fármaco y complejos de fármaco-fosfolípido no digeridos.

La fosfolipidosis medicamentosa es una preocupación significativa para la evaluación de riegos. Muchos fármacos que provocan fosfolipidosis en animales también se asocian con efectos secundarios clínicos no deseados, tales como la prolongación de QT, miopatía, hepatotoxicidad, disfunción pulmonar o toxicidad hepática medicamentosas, que se tratan más detalladamente a continuación.

Trastornos de almacenamiento lisosómico

Los cuerpos mieloides que se producen en la fosfolipidosis medicamentosa se asemejan a las figuras de mielina

verticiladas en los tejidos de pacientes que padecen trastornos de almacenamiento lisosómico que incluyen la enfermedad de NPC (Warren *et al*., J Vet Diagn Invest 2000;12:483-496). La enfermedad de NPC es un trastorno hereditario que se caracteriza por defectos en la separación y el transporte del colesterol intracelular. En condiciones normales, el éster de colesterilo derivado de una lipoproteína de baja densidad media un mecanismo de retroalimentación complejo que estabiliza la concentración intracelular de colesterol. En pacientes con NPC, un defecto en las actividades de las proteínas NPC1 y NPC2 da como resultado un eflujo muy lento de colesterol sin esterificar desde los compartimentos endocíticos tardíos. La razón de colesterol no esterificado y bis(monoacilglicerol)fosfato (BMP) es importante dentro de la membrana lisosómica interna para que se produzca la hidrólisis eficaz de los componentes de la membrana. Como resultado de esto, no solamente el colesterol, sino otros componentes de la membrana (es decir, esfingomielina, BMP, glucosilceramida, glucospingolipídos, fosfolípidos y glucolípidos) se pueden acumular secundariamente dependiendo del perfil lipídico celular. Los defectos en el tráfico lipídico que se producen en células con NPC pueden conducir a la muerte autónoma de las células.

Mecanismos de la fosfolipidosis

Los mecanismos que conducen a la acumulación de cuerpos mieloides en la fosfolipidosis muestran algunas similitudes con aquellos observados en la etiología de la enfermedad de NPC. Los mecanismos que están mejor descritos para la fosfolipidosis implican el atrapamiento de fármacos dentro del compartimento lisosómico y una acumulación de complejos de fármaco-fosfolípido dentro de las membranas lisosómicas internas. Las hipótesis más recientes relacionadas con la fosfolipidosis implican efectos del fármaco sobre el estado del colesterol y el direccionamiento erróneo de enzimas lisosómicas del Golgi a través de la vía de receptores de manosa-6-fosfato (M6PR/IGF2).

De forma similar a las células con NPC, células que están afectadas por la fosfolipidosis se cree que requieren grandes cantidades de BMP dentro de las membranas lisosómicas internas para se produzca la hidrólisis de complejos de fármaco-fosfolípido acumulados y materiales membranosos no digeridos. Una demanda de BMP más alta de lo habitual dentro de las membranas lisosómicas internas y la inhibición de la fosfatidato fosfohidrolasa (PAPasa) por la acción de fármacos podría dar como resultado la redirección de la síntesis de fosfolípidos hacia los fosfolípidos ácidos (es decir, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol) que sirven como precursores para la síntesis de BMP. Se especula que Los CAD provocan un fenotipo de NPC por unión a fosfolípidos cargados negativamente tales como BMP. Además de BMP, también se pueden acumular colesterol no esterificado y otras especies de fosfolípidos dentro de los lisosomas debido a efectos inhibitorios directos del fármaco sobre las actividades de enzimas lisosómicas (PLA_1, PLA_2, PLC) o a través de la formación de complejos de fármaco-fosfolípido.

Un aumento en los materiales membranosos no digeridos dentro de células fosfolipidóticas puede dar como resultado una acumulación anómala de cuerpos mieloides lisosómicos. Algunas de las vesículas fosfolipidóticas pueden pasar a través del citoplasma y fusionarse con la membrana plasmática en el lado opuesto de la célula, liberando sus componentes en el espacio extracelular por exocitosis. Se ha sugerido que se puede inducir la eliminación de cuerpos mieloides en la fosfolipidosis mediante una mayor renovación de componentes intracelulares (es decir, autofagia), lo cual podría representar una estrategia de supervivencia adaptativa. Como alternativa, un desequilibrio en la inducción y el flujo autofágicos también podría dar como resultado estrés autofágico y el desencadenamiento de la muerte celular autofágica tal como se observa en NPC y otros trastornos de almacenamiento lisosómico.

Biomarcadores para la fosfolipidosis

Tal como ha mencionado anteriormente, la norma convencional para la fosfolipidosis es la confirmación visual de cuerpos mieloides en tejidos. Se utiliza normalmente microscopía electrónica para revelar la presencia de cuerpos mieloides en secciones de tejido delgadas de muestras de biopsia, macrófagos pulmonares o células de sangre periférica. En cada caso, se calcula el promedio del número de cuerpos mieloides en diferentes rejillas y se compara con muestras normales. A pesar de su utilidad, esta estrategia de microscopía electrónica es invasiva, relativamente no cuantitativa, costosa y requiere mucho tiempo. Además, tiene una utilidad limitada a la hora de definir la relación temporal entre el estado fosfolipídico y la actividad celular.

Esta invención proporciona una estrategia alternativa y menos invasiva para detectar fosfolipidosis. Emplea especies particulares de BMP en la sangre u orina como biomarcadores fácilmente accesibles para la evaluación rutinaria la fosfolipidosis en tejidos. En comparación con la microscopía electrónica, el método descrito en el presente documento proporciona un medio mejor para definir la relación temporal entre la aparición y la evolución temporal de la fosfolipidosis con los cambios que conducen a toxicidad del fármaco. Como resultado, proporciona un medio mejor para determinar si la fosfolipidosis representa una manifestación adaptativa o tóxica.

El BMP, denominado también ácido lisobisfosfatídico (LBPA), es un fosfolípido lisosómico. El BMP teóricamente puede existir en cuatro isoformas geométricas (figura 1). Las etapas individuales de la secuencia de reacción de BMP han sido descritas por Amidon *et al*. (Biochemistry 1995;34(16):5554-5560) y Thornburg *et al*. (Journal of Biological Chemistry 1991;266(11):6834-6840). Amidon *et al*. sugirieron que, *in vivo,* las cadenas de ácido graso de BMP están predominantemente esterificadas en las posiciones β del esqueleto de glicerol (es decir, 2,2'di-22:6 -

BMP). Como alternativa, Thornburg *et al*. predijeron que las cadenas de ácido graso migran a las posiciones α (es decir, 3,3'-BMP) debido al entorno ácido de los endosomas y lisosomas tardíos.

Tal como se describe en el presente documento, diferentes especies de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP se correlacionan de forma diferente con la fosfolipidosis en tejidos inducida por diferentes fármacos y trastornos de almacenamiento lisosómico hereditarios. Por consiguiente, esta invención presenta métodos de evaluación del desarrollo de fosfolipidosis medicamentosa en tejidos en estudios preclínicos y clínicos, y para el diagnóstico de trastornos de almacenamiento lisosómico que dan como resultado la acumulación de materiales lipídicos dentro de células y tejidos.

Métodos analíticos

Para evaluar el potencial de un compuesto de prueba para inducir fosfolipidosis en un sujeto destinatario, se puede obtener una muestra de prueba o población de células a partir de un sujeto de prueba al que se le ha administrado un compuesto de prueba. Entonces, se puede determinar el nivel de cada uno de un grupo de biomarcadores en la muestra de prueba o las células. El grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3' di-22:6-BMP, di-22:6-PG, 2-mono-22:6-BMP y 3-mono-22:6-BMP. Se determina que el compuesto de prueba tiene la actividad de inducir fosfolipidosis en el sujeto destinatario si el nivel de cualquiera del grupo de biomarcadores está en o por encima de un nivel predeterminado. Es decir, el método para la predicción de fosfolipidosis medicamentosa se basa en el uso individual o combinado de isoformas de di-docosahexaenoílo (22:6)-bis(monoacilglicerol)fosfato (es decir, 2,2'-di-22:6-BMP, 2,3'-di-22:6-BMP, 3,2'-di-22:6-BMP y 3,3'-di-22:6-BMP), di-docosahexaenoílo (22:6)-fosfatidilglicerol (di-22:6-PG) y mono-docosahexaenoílo (22:6)-bis(monoacilglicerol)fosfato (es decir, 2-mono-22:6-BMP y 3-mono-22:6-BMP).

1. Sujetos

El método anterior se puede utilizar con el fin de evaluar pacientes o sujetos humanos sometidos a ensayos clínicos que participan en experimentación médica o a los que de otro modo se les administra cualquier tipo de compuesto farmacéutico, vitamina o suplemento dietético. El sujeto de prueba puede ser un animal no humano, incluyendo pero sin limitarse a roedores (por ejemplo, ratas, ratones, conejos, hámsteres, cobayas), perros, cerdos, gatos, primates no humanos (por ejemplo, monos) y no mamíferos (por ejemplo, aves, anfibios y reptiles).

La muestra de prueba puede ser una muestra de fluido biológico, incluyendo pero sin limitarse a sangre completa, plasma, suero, orina, sedimento urinario, líquido de lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés), linfa, muestra de líquido cefalorraquídeo, saliva, semen, leche materna y heces derivados del sujeto de prueba. También puede ser una célula, fracción de célula o un cultivo celular. Los ejemplos incluyen células de lavado broncoalveolar (BAL), eritrocitos, glóbulos blancos, células nerviosas, fracciones de células hepáticas, fibroblastos cutáneos, histiocitos de médula ósea, células del epitelio pigmentario de la retina, células de vellosidades coriónicas y células de líquido amniótico, derivadas del sujeto de prueba y cultivos celulares *in vitro*, incluyendo pero sin limitarse a línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), línea celular epitelial de hígado de ratón diploide (ARLJ301-3), línea celular de pulmón de hámster chino (CHL/IU), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de adenocarcinoma de riñón humano (769-P humanas), células tubulares proximales de riñón humano (HK-2) y línea celular similar a macrófagos de ratón (J744A). La muestra también puede ser un tejido completo, corte de tejido o fracción de tejido, incluyendo pero sin limitarse a hígado, riñón, músculo, corazón, válvulas y vasos sanguíneos, pulmón, bazo, ganglio linfático, médula ósea, piel, ojo y cerebro, derivado del sujeto de prueba. La muestra de prueba también puede ser vesículas endocíticas aisladas, tales como endosomas, lisosomas y exosomas derivados de células y tejidos.

2. Preparación de muestras

Para preparar la muestra de prueba mencionada anteriormente, se pueden utilizar muestras líquidas (tales como orina, plasma, suero) directamente sin ninguna preparación de la muestra para la extracción líquido/líquido (véase a continuación). El pH de una muestra líquida se puede ajustar para estabilizar compuestos en ésta para el análisis ya que el pH de la muestra puede afectar a la razón de las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en la muestra. El valor del pH puede ser de 1-14. Preferiblemente, el valor del pH es de 4-10 o de 6-8, o aproximadamente 7. Además, la muestra se puede filtrar antes de la extracción líquido/líquido con el fin de eliminar material particulado.

También se pueden utilizar muestras sólidas o semisólidas de tejido y células. En un ejemplo, tales muestras se homogenizan primero con o sin la adición de agua o un reactivo para la extracción de proteínas de tejido o células (es decir, preparación de muestras húmedas) antes de extraerse de la forma descrita anteriormente. En otro ejemplo, una muestra de tejido se liofiliza para deshidratarla y se tritura finamente antes de la extracción de fosfolípidos (es decir, preparación de muestras secas).

Una vez que la muestra está preparada, se realiza la extracción líquido/líquido para extraer isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP. Para ello, se puede utilizar cloroformo, metanol, isopropanol, agua, acetato de

etilo, acetonitrilo, butanol, diclorometano, metil terc-butil éter, hexano, ácido fórmico o hidróxido de amonio en cualquier combinación de disolventes o el uso individual de éstos. También se pueden utilizar disoluciones acuosas de diferentes sales ($CaCl_2$, $MgCl_2$, NaCl o KCl) para extraer fosfolípidos. Se pueden añadir antioxidantes, tales como 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT) o vitamina E, a mezclas de extracción para ayudar a suprimir la autooxidación de los enlaces insaturados de grupos de ácido graso. La matriz de muestra extraída que contiene los di-22:6-BMP y di-22:6-PG se separa y se seca bajo una corriente de nitrógeno gaseoso. La muestra seca se reconstituye en un disolvente apropiado, tal como una mezcla de acetonitrilo, metanol y agua, en preparación para el análisis mediante cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (LC-MS, LC-MS/MS).

La purificación de la muestra generalmente no es necesaria para aislar adicionalmente las especies de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP de la matriz de extracción. Sin embargo, como el número de otros fosfolípidos competidores en la matriz de muestra puede afectar a la sensibilidad analítica de las especies de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP, eliminar tantos compuestos competidores como sea posible de la matriz de muestra puede mejorar la sensibilidad analítica. Con este fin, se pueden utilizar sorbentes químicos (por ejemplo, columnas modificadas con cerio, Tandem Labs, Sal Lake City, Utah) o columnas de anticuerpos contra fosfolípidos. También se puede utilizar cromatografía de intercambio iónico en columna. Por ejemplo, se pueden utilizar columnas de DEAE preparativas o LiChrospher Si-100. Se pueden utilizar columnas de dietilaminoetil (DEAE)-acetato de celulosa para separar fosfolípidos de tejidos en fracciones ácidas y no ácidas. Los extractos lipídicos también se pueden separar en clases de fosfolípidos diferentes utilizando columnas LiChrospher Si-100. Estas técnicas se pueden aplicar para aislar la fracción total de BMP y PG de otras clases de fosfolípidos competidores antes de la evaluación de especies específicas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP.

La cromatografía en capa fina (TLC) mono- y bidimensional son técnicas comunes utilizadas para el análisis de fosfolípidos. Aunque no se puede utilizar TLC para separar las isoformas individuales de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP, se puede utilizar como una primera etapa para aislar la fracción total de BMP y PG de las otras clases de fosfolípidos en una muestra de prueba. Las especies moleculares y las isoformas de BMP y PG se pueden analizar posteriormente utilizando otras técnicas, tales como LC-MS y GC-MS tal como se describe a continuación.

No es necesario marcar o derivatizar di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP para el análisis mediante cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (por ejemplo, LC-MS y LC-MS/MS). Sin embargo, el análisis de di-22:6-BMP y di-22:6-PG mediante métodos de afinidad inmunológica (véanse a continuación) requeriría diferentes procedimientos de marcaje (por ejemplo, radiomarcador para radioinmunoensayo; marcador fluorescente para un estudio de inmunofluorescencia) y anticuerpos específicos. El análisis de di-22:6-BMP y di-22:6-PG mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS, GC-MS/MS) requeriría derivatización de las cadenas de ácido graso.

3. Evaluación de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP

Se pueden utilizar varios métodos para evaluar la abundancia o localización de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en una muestra de prueba. Los ejemplos incluyen cromatografía en capa fina, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases, espectrometría de masas, florescencia o detección UV, conteo de centelleo, ELISA, RMN, técnicas de obtención de imágenes y marcaje con un colorante, anticuerpo, marca fluorescente o modificador químico.

4. Evaluación de isoformas individuales de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP

Se puede utilizar cromatografía de líquidos con espectrometría de masas para evaluar isoformas individuales de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP. Se puede utilizar cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo de tipo cuadrupolo (TOF-MS) y espectrometría de masas en tándem (TOF-MS/MS) con el fin de evaluar los niveles de las isoformas de di-22:6-BMP y di-22:6-PG en una muestra biológica.

En un ejemplo, se puede utilizar la columna cromatográfica “Synergi Hidro RP” (Fenomenex, Torrance, CA), que es una columna analítica de fase inversa de tipo C18. Para ello, se puede utilizar una mezcla de metanol, agua, hidróxido de amonio y ácido fórmico para la fase móvil 1 y una mezcla de metanol, hexano, hidróxido de amonio y ácido fórmico para la fase móvil 2. Se puede utilizar un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo de tipo cuadrupolo (Q-TOF) MDS Sciex API QStar (Applied Biosystems, Foster City, CA) para analizar las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP, en el que los datos se adquieren en modo de ionización por electrospray negativa (ESI), es decir, las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP se desprotonan.

También se puede utilizar otro tipo de columna de HPLC (por ejemplo, columnas de fase inversa, intercambio iónico, fase normal) o sistema de fases móviles con el fin de conseguir una mejor separación de las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP para un tipo particular de muestra de prueba

La espectrometría de masas es una herramienta común para determinar una especie fosfolipídica específica. Además de TOF-MS y TOFMS/MS, se pueden utilizar otros tipos de espectrómetros de masas para evaluar di-22:6-

BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en muestras de prueba. Los espectrómetros de masas tienen tres partes básicas: una fuente de iones, un analizador de masas y un detector. Una fuente de ionización por electrospray es la más utilizada en LC-MS. Otro tipo de fuente de ionización que se puede utilizar para el análisis de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP es la ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI). Se pueden utilizar diversos tipos de analizadores de masas para el análisis de isoformas individuales de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP, que incluyen de triple cuadrupolo, de tiempo de vuelo de tipo cuadrupolo, espectrómetros de masas con trapa iónica de tipo cuadrupolo, resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier y analizadores de masas de tipo orbitrap.

En muchos estudios de lípidos se utiliza cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) y espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). Por ejemplo, se puede utilizar GC-MS/MS para monitorizar especies moleculares y estereoisoformas específicas de fosfatidilglicerol (PG) (Fritz *et al.* Journal of Biological Chemistry 2007;282(7):4613-4625). Una técnica de GC-MS similar se podría ampliar para monitorizar las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en muestras biológicas para la predicción de la fosfolipidosis. En tal caso, se requeriría la derivatización química de las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP para los estudios por GC-MS y GC-MS/MS.

Se pueden detectar fosfolípidos mediante absorción UV a 205 nm (Patton *et al.* Journal of Lipid Research 1982; 23:190-196). Con un método preparativo para aislar primero el BMP total de otras clases de fosfolípidos (tal como se ha descrito anteriormente), se pueden evaluar las isoformas de di-22:6-BMP y di-22:6-PG mediante separación por LC con detección UV. También se pueden utilizar métodos de detección basados en anticuerpos, tales como ELISA, inmunofluorescencia y radioinmunoensayos (RIA). Se pueden generar anticuerpos contra fosfolípidos para di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP mediante métodos estándar y utilizarlos para evaluar los niveles de diferentes isoformas de di-22:6-BMP di-22:6-PG y mono-22:6-BMP mediante ELISA, inmunofluorescencia y RIA.

5. Normalización de los datos

Puede ser de interés normalizar los niveles de los di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP entre muestras de prueba. En un ejemplo, los niveles de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en orina se pueden normalizar en función del volumen de orina total recogido durante un periodo de tiempo específico, o marcadores del funcionamiento del riñón, nitrógeno ureico en sangre, suero o creatinina urinaria. En otro ejemplo, los niveles de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en muestras de prueba se pueden normalizar en función del peso del tejido, en ensayos de proteínas totales (por ejemplo, ensayo de proteínas BCA) o de fósforo total.

Compuestos de prueba

Los métodos descritos anteriormente se pueden utilizar para evaluar o monitorizar los efectos inductores de la fosfolipidosis de diferentes compuestos, tales como candidatos a fármacos, fármacos autorizados, vitaminas y suplementos dietéticos. Hay constancia de que más de 50 fármacos anfifílicos catiónicos (CAD), incluyendo agentes antidepresivos, antianginosos, antipalúdicos e hipocolesterolemiantes, inducen fosfolipidosis. Algunos ejemplos de fármacos que inducen fosfolipidosis incluyen amiodarona (y su principal metabolito desetilamiodarona), azitromicina, cloroquina, perhexilina, gentamicina, fluoxetina, clorpromazina, perhexlina, benzamida, eritromicina, amikacina, netilmicina, tobramicina, trospectromicina, ambroxol, bromhexina, clozapina, tilarona, boxidina, triparanol, iprindol, zimelidina, sertralina, imipramina, clociclizina, meclizina, norclorciclizina, hidroxizina y agentes quimioterápicos liposómicos. El método descrito en el presente documento se puede utilizar para monitorizar la fosfolipidosis inducida por tales compuestos de prueba.

Gestión de pacientes

Tal como se mencionó anteriormente, muchos fármacos que provocan fosfolipidosis en animales están asociados con efectos secundarios clínicos no deseados, tales como la prolongación de QT, miopatía, hepatotoxicidad, disfunción pulmonar o toxicidad hepática medicamentosas. Por consiguiente, esta invención presenta un método para gestionar el tratamiento del paciente. El método incluye identificar un paciente sometido a, o que necesita, un tratamiento para una afección; obtener una muestra biológica a partir del paciente; y determinar el nivel de un primer biomarcador en la muestra biológica tal como se ha descrito anteriormente. Se determina que el paciente no es adecuado para el tratamiento si el nivel del primer biomarcador está en o por encima de un valor predeterminado.

1. Cardiotoxicidad

El método se puede utilizar para monitorizar la fosfolipidosis en pacientes con potencial para desarrollar cardiotoxicidad en respuesta a un compuesto de prueba. Por ejemplo, la prolongación de QT medicamentosa es una gran preocupación por la seguridad de fármacos debido a su asociación con la taquicardia ventricular polimórfica (*torsade de pointes*, TdP) y la muerte súbita. Muchos fármacos autorizados que provocan fosfolipidosis en tejidos de animales y humanos también provocan la prolongación de QT en estudios clínicos (tabla 1). La ausencia de un medio para monitorizar la fosfolipidosis en tejidos cardiacos ha frustrado los intentos de determinar la importancia de la fosfolipidosis medicamentosa en la aparición de la prolongación de QT y TdP. Esta invención proporciona un

medio para definir mejor el papel de la fosfolipidosis en la cardiotoxicidad.

Tabla 1: Ejemplos de fármacos que provocan fosfolipidosis y la prolongación de QT

Clase terapéutica	Fármacos a modo de ejemplo
Antiarrítmicos	Amiodarona
Antipalúdicos	Cloroquina
Antibióticos	Telitromicina, eritromicina, azitromicina
Antimicrobianos	Pentamidina
Antipsicóticos	Haloperidol, clorpromazina
Antidepresivos	Imipramina, fluoxetina

2. Miopatía

Varios compuestos antipalúdicos (por ejemplo, cloroquina, hidroxicloroquina, mefloquina, quinina, quinidina) provocan fosfolipidosis, miopatía y daño neurológico en modelos humanos y animales. La miopatía y el daño neurológico también se producen con otros fármacos que provocan fosfolipidosis conocidos, que incluyen amiodarona, haloperidol y coragil. La miopatía medicamentosa puede ser difícil de diagnosticar debido a que la afección suele estar enmascarada por una enfermedad musculoesquelética subyacente. En la actualidad, se requiere la detección de cuerpos mieloides mediante la biopsia muscular para confirmar el diagnóstico de miopatía provocada por antipalúdicos. La medición de isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP tal como se describe en el presente documento proporciona un medio no invasivo para la detección sistemática y la investigación sobre el papel de la fosfolipidosis en la etiología de miopatías medicamentosas.

3. Toxicidad renal

Los métodos descritos en el presente documento también se pueden utilizar para comprender mejor la aparición simultánea de fosfolipidosis con las toxicidades renales de un compuesto de prueba. Por ejemplo, el tratamiento prolongado o la dosificación incrementada de antibióticos aminoglucosídicos (por ejemplo, gentamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina) y cloroquina en animales y seres humanos puede dar como resultado daño renal. La relación entre la fosfolipidosis y las toxicidades renales de fármacos no se comprende del todo. Las isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP se pueden utilizar para investigar las asociaciones temporales de la fosfolipidosis y las toxicidades renales de compuestos de prueba en seres humanos y otros sujetos de prueba.

Los siguientes ejemplos específicos se han de interpretar como meramente ilustrativos y no limitativos del resto de la memoria descriptiva de ningún modo en absoluto. Sin entrar en más detalles, se cree que un experto en la técnica puede sacar el máximo provecho de la presente invención, basándose en la descripción del presente documento. Además, cualquier mecanismo propuesto a continuación no restringe de ningún modo el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Se investigó la relación entre la exposición a amiodarona, azitromicina o citalopram y la aparición de fosfolipidosis medicamentosa en ratas Fisher. Las ratas se trataron con amiodarona (50 mg/kg/día), azitromicina (100 mg/kg/día), citalopram (90 mg/kg/día) o sin ningún fármaco durante 4 semanas. Se recogieron muestras de orina de cada animal y se prepararon para su análisis utilizando un método de extracción líquido/líquido. Las muestras de orina (200 µL de orina por rata) se mezclaron con cloroformo/metanol 3:1 (v/v) frío (400 µl) y se mezclaron en vórtex antes de añadir ácido fórmico al 0.1% (ac.) (100 µl). Las muestras se mezclaron en vórtex de nuevo, se dejó que reposaran durante 5 min y se centrifugaron durante 15 min. La capa inferior (orgánica) se separó cuidadosamente y se concentró a sequedad. Las muestras se reconstituyeron hasta 30 µl con ácido fórmico al 0,05% en acetonitrilo/metanol 2:1 (v/v).

El perfil molecular de cada muestra de orina se adquirió utilizando cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas (LC/MS). Se realizaron inyecciones sobre una columna Synergi Hidro-RP de 150X2,00 mm (Fenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) utilizando un autoinyector 235 de Gilson (Gilson, Inc., Middletown, WI, EE.UU.) y una bomba binaria 1100 de Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). La fase móvil A era hidróxido de amonio al 0,25%, ácido fórmico al 0,05% en metanol/agua 88:12 (v/v). La fase móvil B era hidróxido de amonio al 0,25%, ácido fórmico al 0,05% en metanol/hexano 80:20 (v/v). La tasa de flujo era de 0,25 ml/min. Las condiciones iniciales eran el 60% de A y el 40% de B. El % de B se incrementó hasta el 90% en el transcurso de un periodo de 15 min.

Para la detección, se utilizó un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelto de tipo cuadrupolo (Q-TOF) MDS Sciex API QStar (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los datos se adquirieron en el modo de TOF MS de barrido completo (*m/z* de 100 a 2000) con ionización por electrospray negativa (ESI). La interfase de la fuente Turbo IonSpray (pulverización iónica asistida neumáticamente) se fijó en 425°C y se mantuvo un voltaje de pulverización iónica de -4,2 kV con un potencial de desagrupación de -50 V. La ionización fue asistida con un

nebulizador y gas (nitrógeno) de pulverización iónica fijados en 55 y 75 (unidades arbitrarias) respectivamente.

Los resultados se muestran en las figuras 4, 5A y 5B. Tal como se muestra en la figura 4, el método LC-MS inesperadamente resolvió bien las diferentes isoformas de di-22:6-BMP y di-22:6-PG. Se descubrió que la isoforma 2,2' de di-22:6-BMP se eluyó del HPLC primero, seguida por las isoformas 2,3' y 3,2', y a continuación la isoforma 3,3'. También fue inesperado que el tratamiento con amiodarona y azitromicina diera como resultado un aumento significativo de la isoforma de di-22:6-BMP que se eluye en primer lugar (es decir, 2,2' di-22:6-BMP) y un aumento menor de las otras isoformas (es decir, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP y 3,3' di-22:6-BMP) (figura 5A). Por otro lado, el tratamiento con citalopram inesperadamente dio como resultado un aumento de la isoforma de di-22:6-BMP que se eluye en último lugar (es decir, 3,3'di-22:6-BMP) pero ningún cambio significativo en las otras isoformas (figura 5B).

Estos resultados demuestran que los fármacos pueden tener efectos diferentes sobre los niveles de diferentes isoformas de di-22:6-BMP en orina de rata. También demostraron que las isoformas de di-22:6-BMP se pueden utilizar, de forma individual y/o en combinación, como biomarcadores para evaluar el potencial de un compuesto de prueba para inducir fosfolipidosis en un sujeto destinatario.

Un gran reto en la evaluación de riesgos es hacer un seguimiento de la aparición y la evolución temporal de la fosfolipidosis con toxicidades de fármacos. El método de esta invención, que determina los niveles de diferentes isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP, se puede utilizar para monitorizar la aparición, evolución temporal e intensidad de la fosfolipidosis en relación con las toxicidades de fármacos.

Ejemplo 2

Otro reto para evaluar los riesgos de fosfolipidosis es determinar qué tipo de células y tejidos del cuerpo se ven afectados. Este ejemplo demuestra que una especie específica de fosfatidilglicerol (PG), di-docosahexaenoílo (22:6)-PG (di-22:6-PG), se correlaciona con la fosfolipidosis debida a amiodarona en ratas. Por consiguiente, se puede utilizar un método en el que se utiliza di-22:6-PG en combinación con diferentes isoformas de di-22:6-BMP y mono-22:6-BMP para detectar específicamente la fosfolipidosis del pulmón ya que el pulmón secreta una gran cantidad de PG como tensioactivo pulmonar.

Resumiendo, se administró a ratas amiodarona, cloroquina o ningún fármaco (vehículo). Se recogió orina de cada rata y se examinó para determinar los niveles de di-22:6-PG de la forma descrita anteriormente. Tal como se muestra en las figuras 6 y 7, se descubrió que el nivel de di-22:6-PG incrementó en la orina de ratas tratadas con amiodarona (un compuesto que se sabe con certeza que provoca fosfolipidosis y toxicidad pulmonares), pero no en la orina de ratas tratadas con cloroquina o sin ningún fármaco. Además, los pacientes con toxicidad pulmonar debida a amiodarona muestran aumentos significativos en el BMP total (+64%) y PG total (+1866%) en células de lavado broncoalveolar (BAL) en comparación con sujetos de control, mientras que la composición relativa de otros fosfolípidos permanece inalterada (Martin y Standing, Pharmacology and Experimental Therapeutics 1988;244(2):774-779). Estos resultados demuestran que diferentes isoformas de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP proporcionan un medio para obtener una mejor idea general de los efectos de la fosfolipidosis en los pulmones.

De forma similar, el método descrito anteriormente se puede utilizar en combinación con otros biomarcadores fosfolipídicos para determinar específicamente otros órganos afectados por la fosfolipidosis. Por ejemplo, se puede utilizar un aumento de di-22:6-BMP, di- 22:6-PG y mono-22:6-BMP acompañado de un aumento de biomarcadores de fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) para detectar específicamente fosfolipidosis del riñón. Como otro ejemplo, se puede utilizar un método en el que se utilizan las especies de di-22:6-BMP, di-22:6-PG y mono-22:6-BMP en combinación con especies de lisofosfatidilcolina (LPC) o LPC total para detectar específicamente fosfolipidosis del hígado.

Ejemplo 3

Se administró a ratas Sprague-Dawley amiodarona (150 mg/kg), cloroquina (120 mg/kg), el compuesto de prueba A (50 mg/kg) o metilcelulosa al 0,5% (vehículo/control), una vez al día durante 14 días consecutivos. Se recogieron muestras de orina de cada animal ~6-12 horas después de la dosis los días 4 y 10, y se sometieron al ensayo descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en las figuras 8A y 8B. Tras el tratamiento con amiodarona (150 mg/kg/día), cloroquina (120 mg/kg/día) y el compuesto A (50 mg/kg/día), los niveles urinarios de di-22:6-BMP incrementaron en aproximadamente 0,14 (114%), 3,4 (344%), y 10 (1004%) veces, respectivamente, el día 4, y 3 (317%), 6 (605%), y 20 (2035%) veces, respectivamente, el día 10. Como la medición de di-22:6-BMP en muestras de orina no es invasiva, es especialmente útil para evaluar la relación temporal entre la fosfolipidosis y las toxicidades de fármacos.

Ejemplo 4

Los métodos descritos anteriormente se utilizaron para evaluar la fosfolipidosis de tejidos inducida por azitromicina (150 mg/kg/día) en ratas durante un periodo de 17 días. Se recogieron muestras de orina de las ratas los días 11 y 17, y se sometieron al ensayo. Los resultados mostraron que la orina de las ratas tratadas con azitromicina contenía más di-22:6-BMP en comparación con los de las ratas que no recibieron fármaco (controles). Véase la figura 9. El día 11, el nivel medio (n=5 ratas por grupo) de di-22:6-BMP en orina incrementó en 2,6 veces en las ratas tratadas con azitromicina en comparación con los controles. El día 17, el nivel medio (n=5 ratas por grupo) de di-22:6-BMP en orina incrementó en aproximadamente 4,5 veces en las ratas tratadas con azitromicina en comparación con las ratas de control.

Ejemplo 5

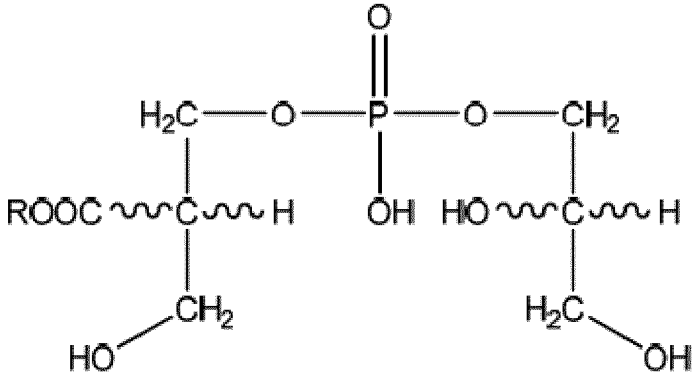
Se trataron ratas Sprague-Dawley con un compuesto de prueba (Compuesto B) que induce fosfolipidosis en el pulmón. Se recogieron muestras de tejido pulmonar de cada animal y se prepararon para su análisis utilizando un método de extracción líquido/líquido. Las muestras de pulmón (0,25 g por rata) se mezclaron con acetato de etilo/metanol 90:20 (v/v) frío con ácido fórmico al 0,1% (500 µl). Las muestras se mezclaron en vórtex, se dejó que reposaran durante 5 min, se mezclaron en vórtex de nuevo y entonces se centrifugaron durante 15 min. La capa superior se separó cuidadosamente y se concentró a sequedad. Las muestras se reconstituyeron hasta 50 µl con hidróxido de amonio al 0,25%, ácido fórmico al 0,05% en metanol/agua 88:12 (v/v) y se analizaron mediante LC-MS tal como se ha descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en la figura 10. Los niveles de las isoformas de mono-22:6-BMP, mono-18:1-BMP y mono-18:2-BMP incrementaron en el tejido pulmonar de las ratas tratadas con el compuesto ABC, pero no en las ratas tratadas sin ningún fármaco (vehículo).

REIVINDICACIONES

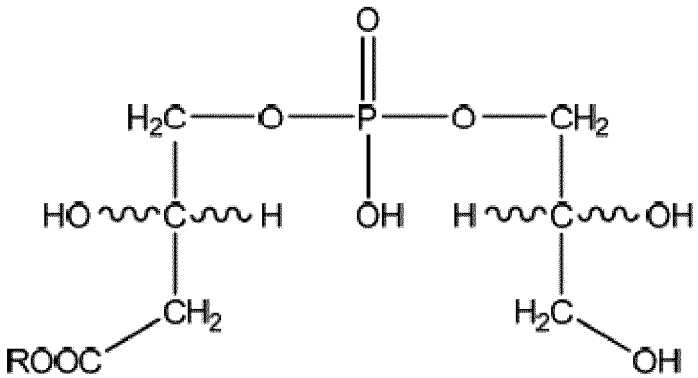
1. Método para evaluar la actividad de un compuesto de prueba para inducir fosfolipidosis en un sujeto destinatario, que comprende

determinar el nivel de cada uno de un grupo de biomarcadores en un disolución que contiene (1) una muestra de prueba obtenida a partir de un sujeto de prueba al que se le ha administrado un compuesto de prueba, (2) una población de células de prueba que se han puesto en contacto con el compuesto de prueba, o (3) vesículas endocíticas aisladas a partir de la muestra de prueba o las células de prueba, en el que el grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3'di-22:6-BMP, di-22:6- PG,



2 mono-22:6-BMP

y



3 mono-22:6-BMP

y

comparar el nivel de cada biomarcador con un nivel predeterminado para cada biomarcador, en el que se determinar que el compuesto de prueba tiene la actividad de inducir fosfolipidosis en el sujeto destinatario si el nivel de cualquiera del grupo de biomarcadores está en o por encima del nivel predeterminado correspondiente.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el sujeto de prueba es un roedor, un perro, un cerdo, un primate no humano o un ser humano, y opcionalmente en el que el nivel predeterminado es un nivel obtenido a partir de un sujeto de control que es idéntico al sujeto de prueba salvo que al sujeto de control no se le ha administrado el compuesto de prueba.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de prueba es una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de sedimento urinario, una muestra de líquido de lavado broncoalveolar, una muestra de linfa, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de saliva, una muestra de semen, una muestra de leche materna, una muestra de heces o una

muestra de tejido de hígado, riñón, músculo, corazón, válvulas y vasos sanguíneos, pulmón, bazo, ganglio linfático, médula ósea, piel, ojo o cerebro.

4. Método según la reivindicación 1, en el que la población de las células de prueba comprende células de lavado broncoalveolar, eritrocitos, glóbulos blancos, células nerviosas, fracciones de células hepáticas, fibroblastos cutáneos, histiocitos de médula ósea, células de vellosidades coriónicas, células del epitelio pigmentario de la retina o células de líquido amniótico.

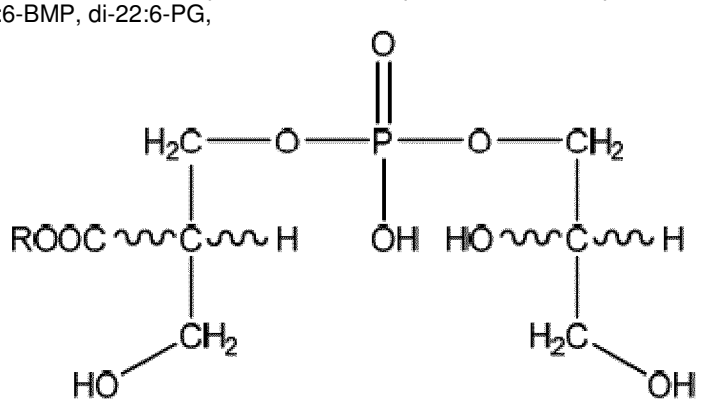
5. Método según la reivindicación 1, en el que las vesículas endocíticas son endosomas, lisosomas o exosomas.

6. Método según la reivindicación 1, en el que las células de prueba son células de línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2), línea celular epitelial de hígado de ratón diploide (ARLJ301-3), línea celular de pulmón de hámster chino (CHL/IU), células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de adenocarcinoma de riñón humano (769-P humanas), células tubulares proximales de riñón humano (HK-2) o línea celular similar a macrófagos de ratón (J744A), y opcionalmente en el que el nivel predeterminado es un nivel obtenido a partir de una célula de control que es idéntica a la célula de prueba salvo que la célula de control no se ha puesto en contacto con el compuesto de prueba.

7. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además determinar el nivel de una especie adicional de BMP, el BMP total o la clasificación de ácidos grasos del BMP total.

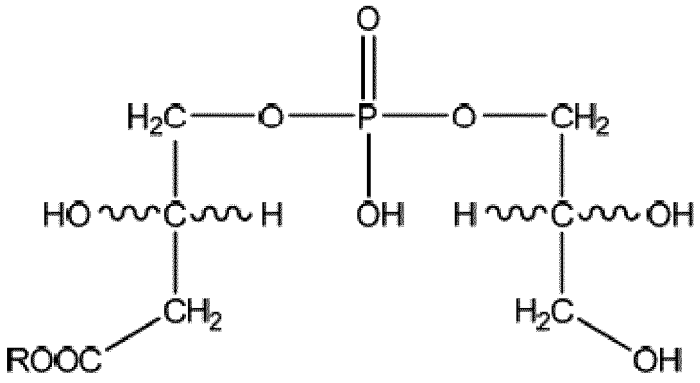
8. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación se lleva a cabo mediante LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS o ELISA.

9. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además separar 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, di-22:6-PG,



2 mono-22:6-BMP

y

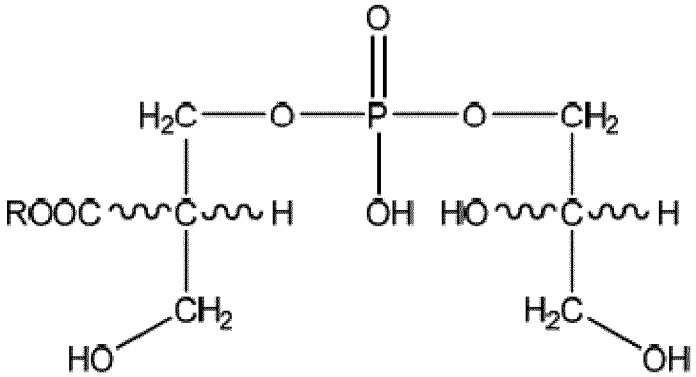


3 mono-22:6-BMP

unos de otros antes de determinar el nivel de cada biomarcador.

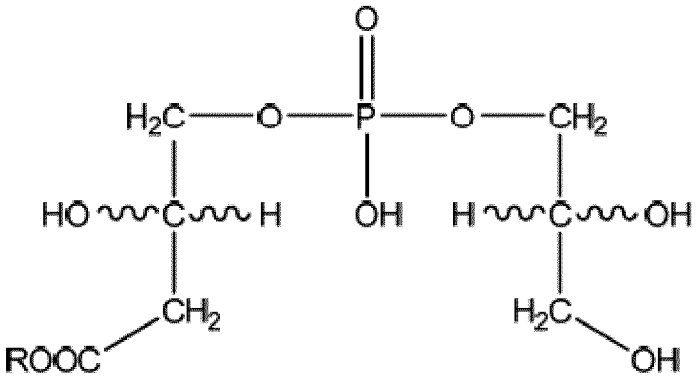
10. Método para gestionar el tratamiento de un paciente que comprende

identificar un identificar un paciente sometido a, o que necesita, un tratamiento que se sospecha que induce fosfolipidosis en el paciente, determinar el nivel de cada uno de un grupo de biomarcadores en una muestra de prueba obtenida a partir del paciente, en el que el grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3'di-22:6-BMP, di-22:6-PG,



2 mono-22:6-BMP

y



3 mono-22:6-BMP

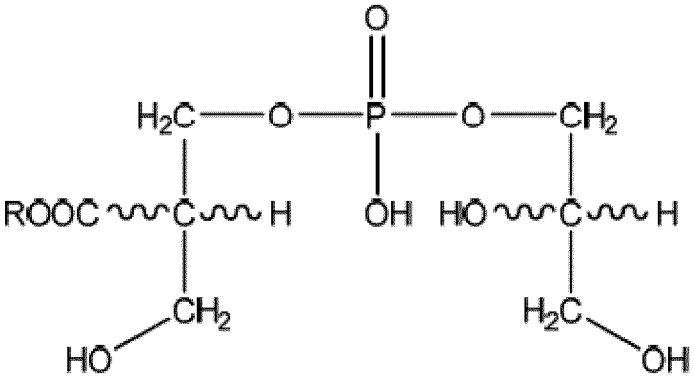
,

y comparar el nivel de cada biomarcador con un nivel predeterminado para cada biomarcador, en el que se determina que el paciente no es adecuado para el tratamiento si el nivel de cualquiera de un grupo de biomarcadores está en o por encima del nivel predeterminado correspondiente.

11. Método según la reivindicación 10, en el que el método comprende además separar 2,2' 22:6-di-BMP, 3,2' 22:6-di-BMP, 2,3' 22:6-di-BMP y di-22:6-PG unos de otros antes de determinar el nivel de cada biomarcador.

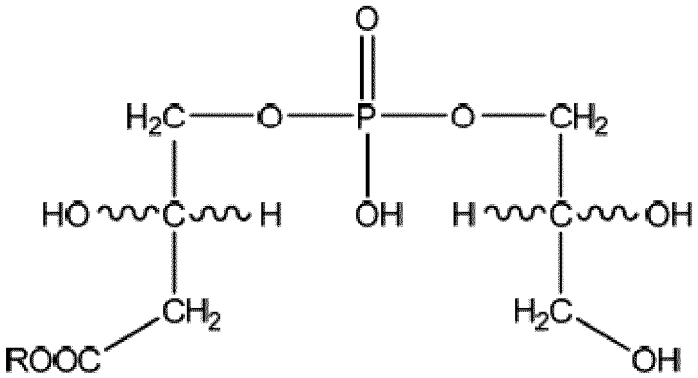
12. Método de diagnóstico de un trastorno de almacenamiento lipídico en un sujeto humano, comprendiendo el método:

determinar el nivel de un grupo de biomarcadores en una muestra de prueba obtenida a partir del sujeto, en el que el grupo de biomarcadores incluye 2,2' di-22:6-BMP, 3,2' di-22:6-BMP, 2,3' di-22:6-BMP, 3,3'di-22:6-BMP, di-22:6-PG,



2 mono-22:6-BMP

y



3 mono-22:6-BMP

,

y

comparar el nivel de cada biomarcador con un nivel predeterminado para cada biomarcador, en el que un nivel de expresión incrementado de uno cualquiera del grupo de biomarcadores relativo al nivel predeterminado correspondiente indica que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar el trastorno de almacenamiento lipídico.

13. Método según la reivindicación 12, en el que el trastorno es la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC) y el nivel predeterminado es un nivel obtenido a partir de un sujeto de control que padece la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC), y/o en el que el método comprende además separar 2,2' 22:6-di-BMP, 3,2' 22:6-di-BMP, 2,3' 22:6-di-BMP y di-22:6-PG unos de otros antes de determinar el nivel de cada biomarcador.

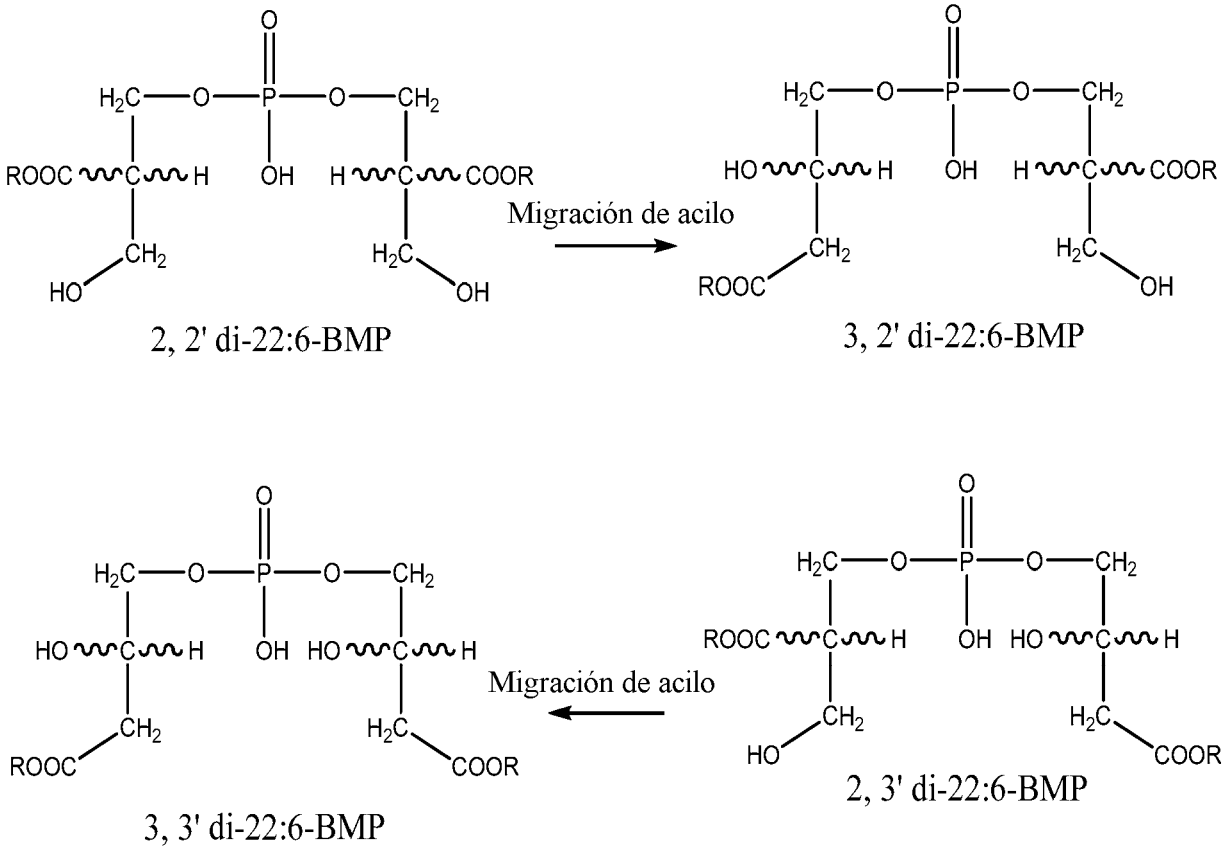
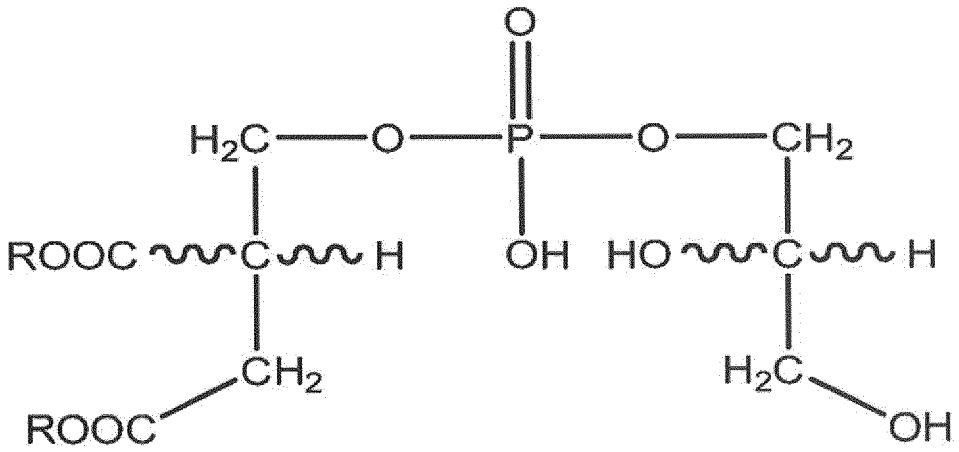
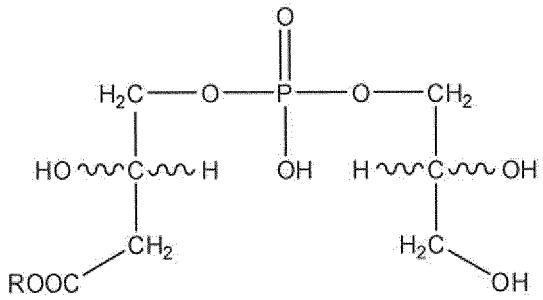

Migración de acilo
2, 2' di-22:6-BMP
3, 2' di-22:6-BMP
Migración de acilo
3, 3' di-22:6-BMP
2, 3' di-22:6-BMP

FIG. 1

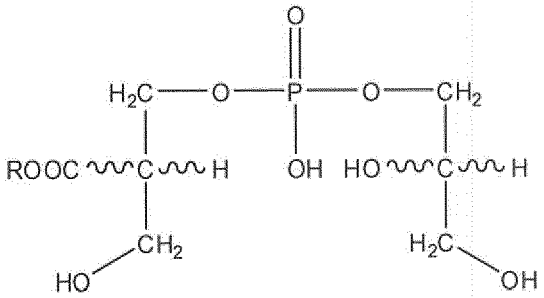


Fosfatidilglicerol

FIG. 2



3 mono-22:6-BMP



2 mono-22:6-BMP

FIG. 3

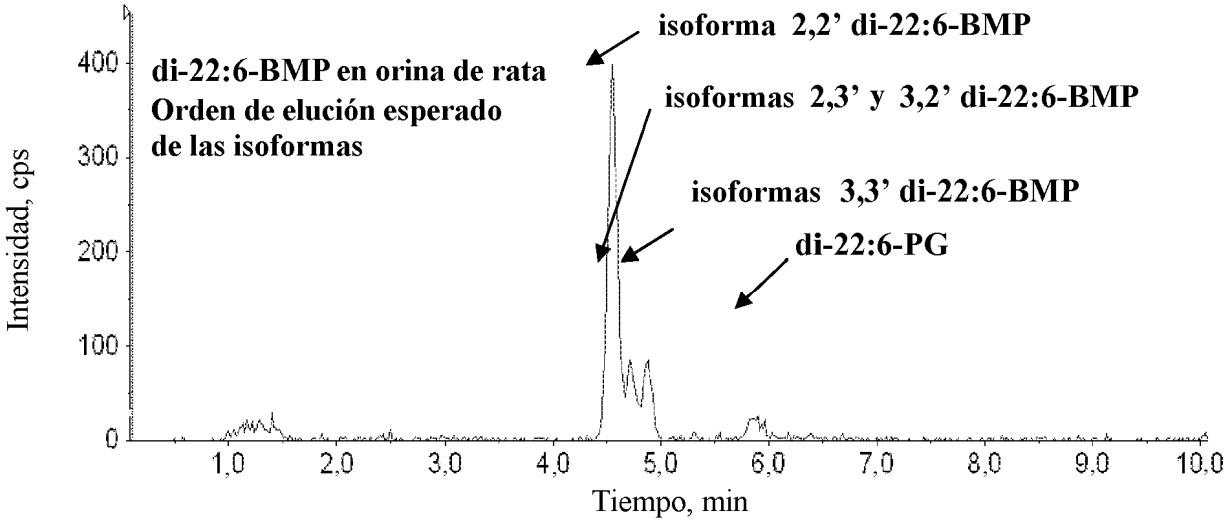
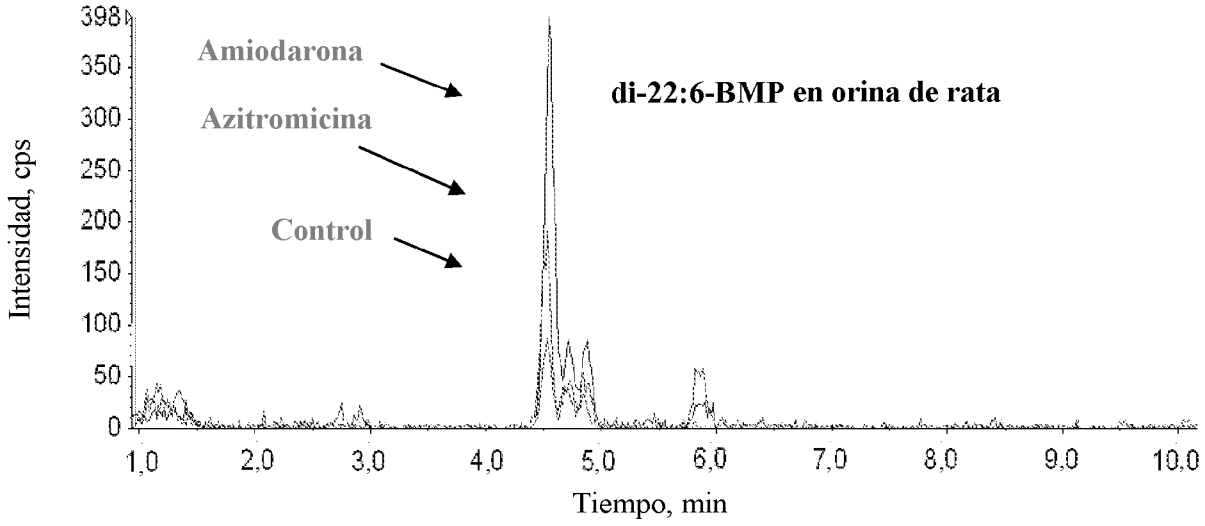

di-22:6-BMP en orina de rata
Orden de elución esperado
de las isoformas
isoforma 2,2' di-22:6-BMP
isoformas 2,3' y 3,2' di-22:6-BMP
isoformas 3,3' di-22:6-BMP
di-22:6-PG
Intensidad, cps
400
300
200
100
0
1,0
2,0
3,0
4,0
5,0
6,0
7,0
8,0
9,0
10,0
Tiempo, min

FIG. 4

5A



5B

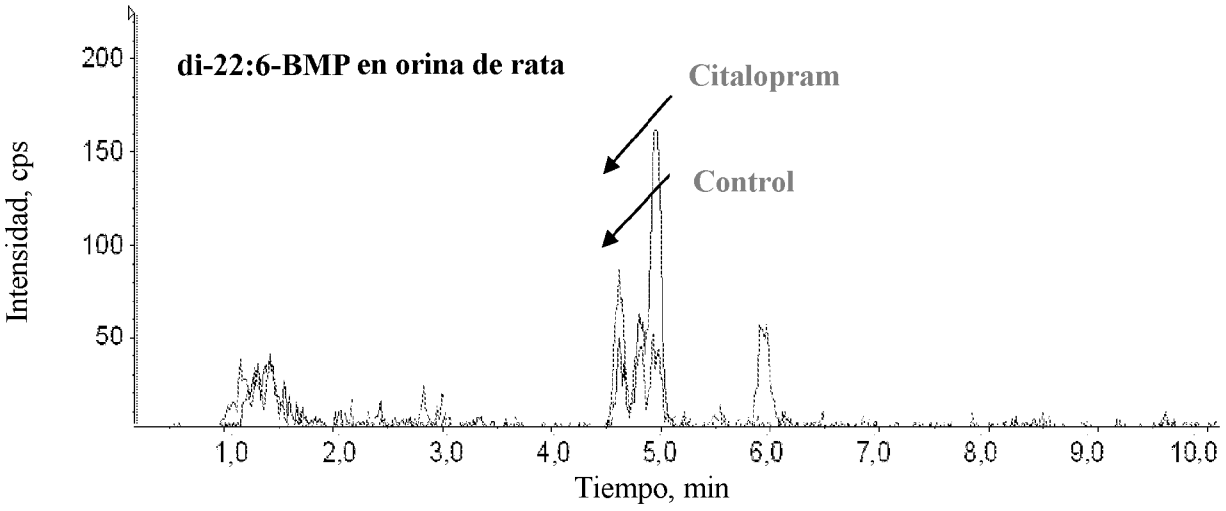


FIG . 5A y 5B

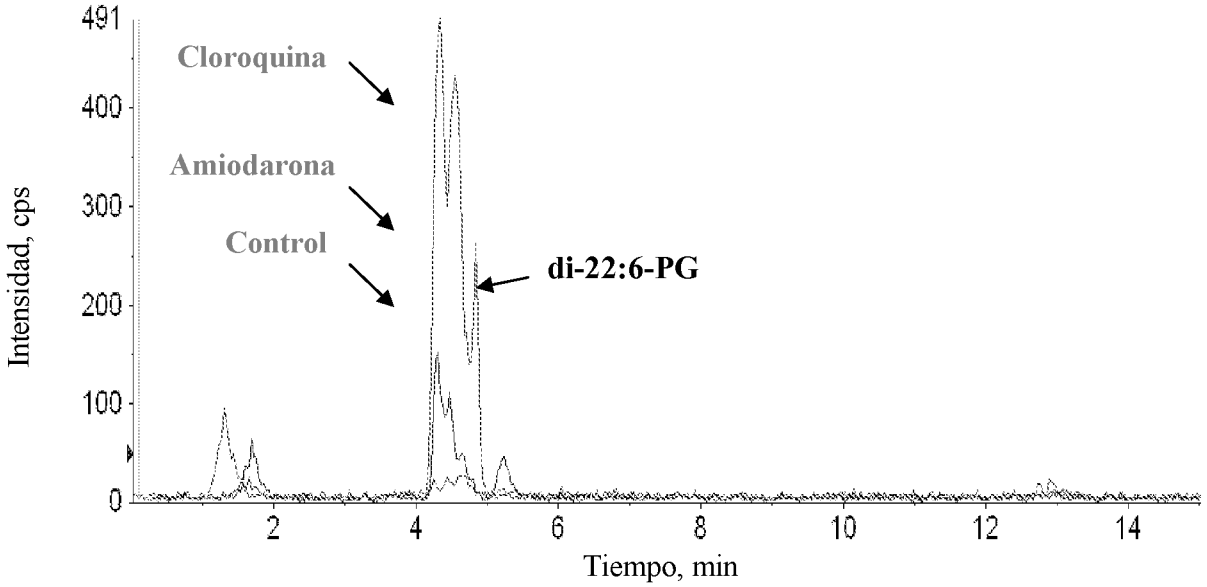

491
400
300
200
100
0
Intensidad, cps
Cloroquina
Amiodarona
Control
di-22:6-PG
2
4
6
8
10
12
14
Tiempo, min

FIG. 6

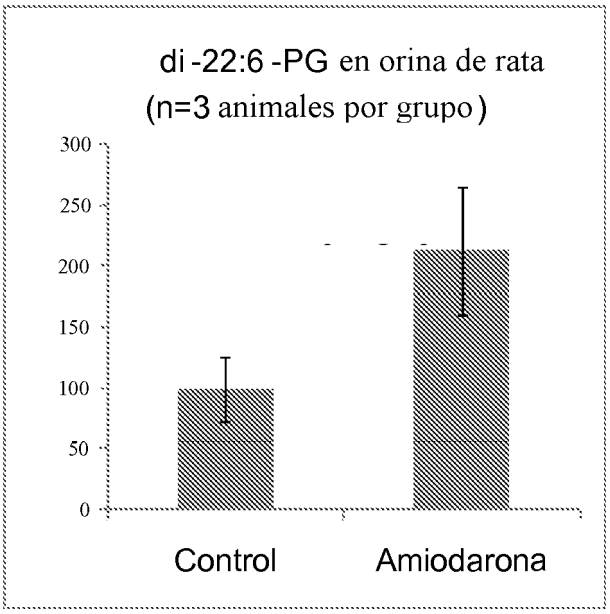
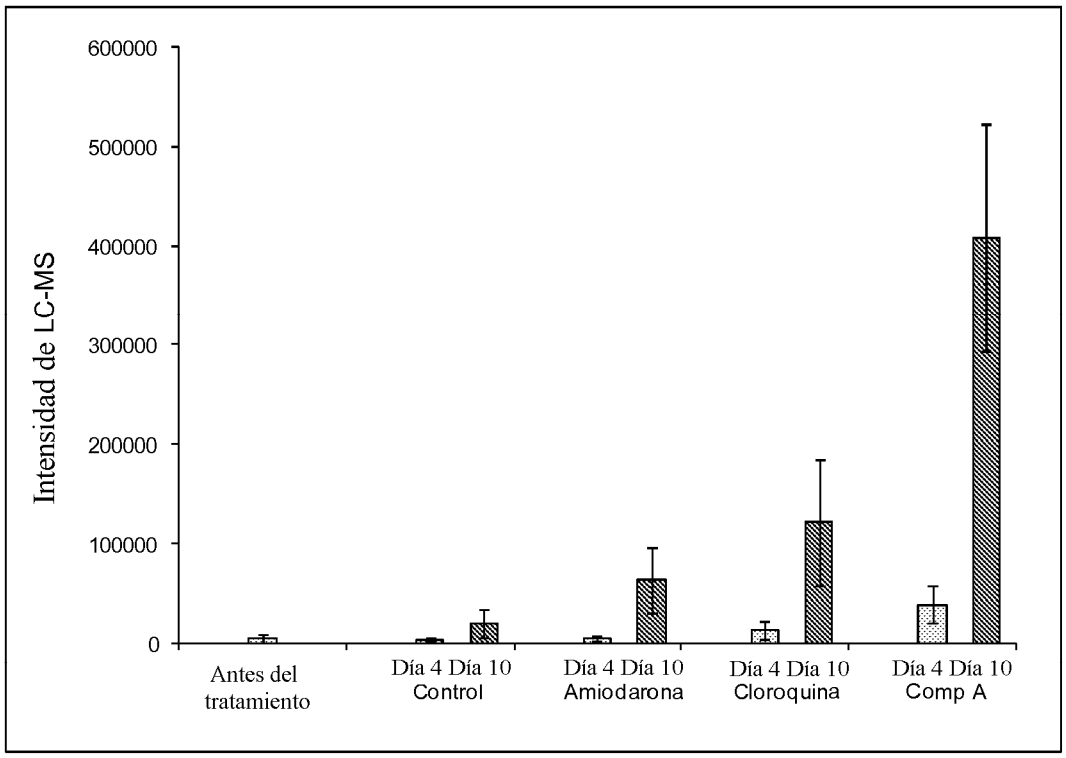

di -22:6 -PG en orina de rata
(n=3 animales por grupo)
300
250
200
150
100
50
0
Control
Amiodarona

FIG. 7

8A



8B

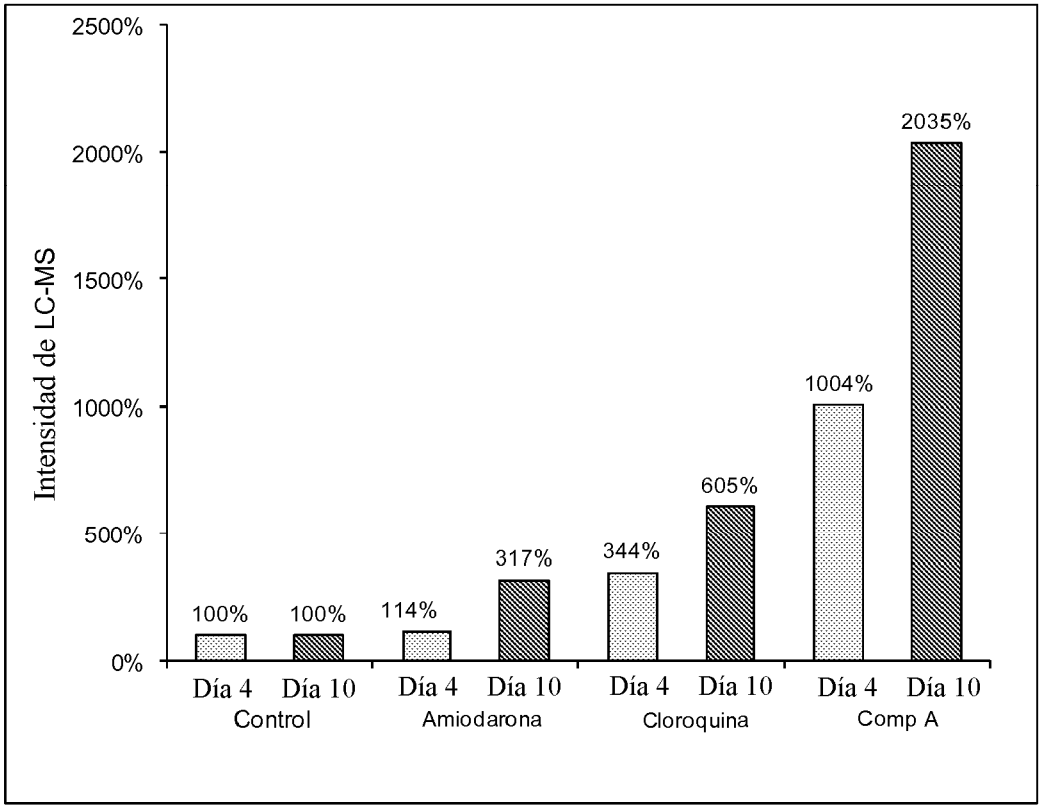


FIG. 8A y B

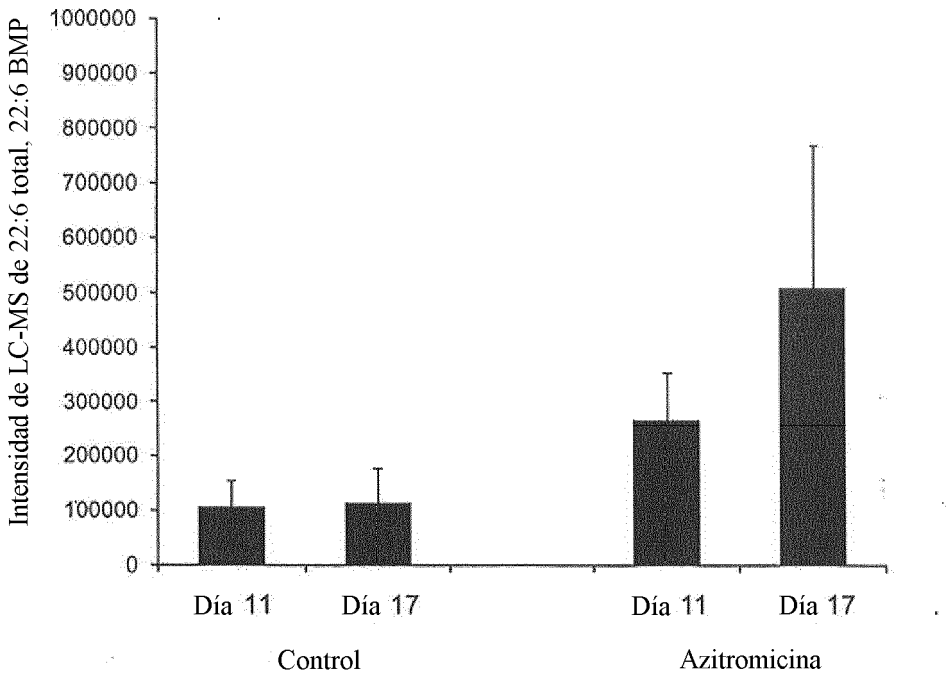

Intensidad de LC-MS de 22:6 total, 22:6 BMP
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Día 11
Día 17
Día 11
Día 17
Control
Azitromicina

FIG. 9

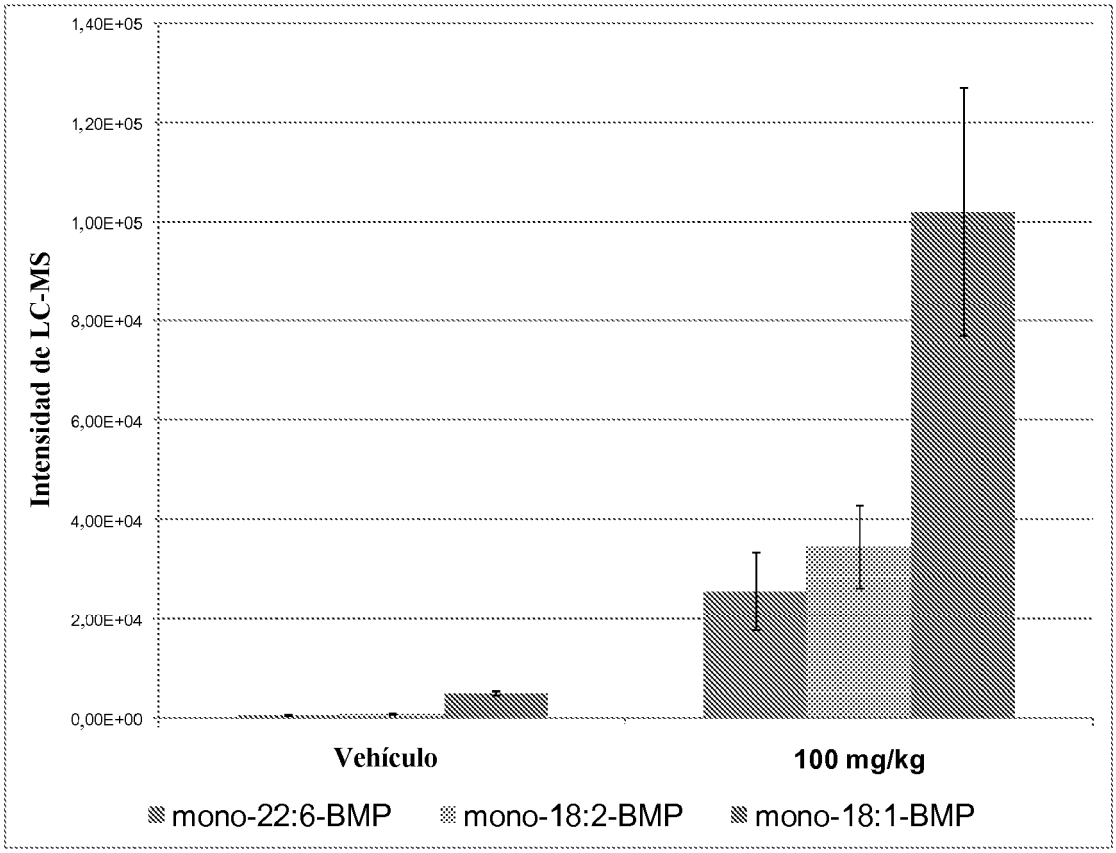

1,40E+05
1,20E+05
1,00E+05
8,00E+04
6,00E+04
4,00E+04
2,00E+04
0,00E+00
Intensidad de LC-MS
Vehículo
100 mg/kg
mono-22:6-BMP
mono-18:2-BMP
mono-18:1-BMP

FIG. 10