

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 282**

51 Int. Cl.:

A61K 31/167 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2015 PCT/US2015/015905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015 E 15748750 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3104849**

54 Título: **Aductos acetaminofén proteína y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

14.02.2014 US 201461940023 P

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**BIOVENTURES, LLC (50.0%)
4301 W. Markham St., No 831
Little Rock, AR 72205-7199, US y
ARKANSAS CHILDREN'S HOSPITAL RESEARCH
INSTITUTE, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JAMES, LAURA P.;
HINSON, JACK;
ROBERTS, DEAN y
GILL, PRITMOHINDER S.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 754 282 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

Aductos acetaminofén proteína y procedimientos de uso de los mismos

Derechos gubernamentales

5 La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la subvención N° 81406 concedida por el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). El gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud US provisional número 61/940.023, presentada el 14 de Febrero de 2014.

10 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a aductos acetaminofén-proteína y a procedimientos de uso de los aductos acetaminofén-proteína para diagnosticar la toxicidad del acetaminofén.

Antecedentes de la invención

15 El acetaminofén (APAP) es el producto farmacéutico más común asociado con la toxicidad de fármacos. En casos severos, la sobredosis de acetaminofén puede conducir a insuficiencia hepática aguda (ALF) y la muerte. Anualmente los centros de control de intoxicaciones en los EE. UU reciben más de 100.000 llamadas telefónicas relacionadas con la sobredosis de acetaminofén. La FDA estima que anualmente se producen aproximadamente 450 muertes relacionadas con una sobredosis de acetaminofén. Para los pacientes que buscan tratamiento dentro de las 24 horas posteriores a una sobredosis de acetaminofén, y son capaces de proporcionar información precisa acerca del tiempo y de la cantidad de acetaminofén ingerida, la sobredosis de acetaminofén es relativamente fácil de diagnosticar y de tratar. Sin embargo, los procedimientos actuales para diagnosticar una sobredosis de acetaminofén, tal como el nomograma de Rumack, no son muy útiles para diagnosticar pacientes después de 24 horas de una sobredosis de acetaminofén, cuando está disponible información acerca del tiempo y de la dosis de acetaminofén ingerida, o pacientes que ingieren alcohol de manera crónica, ingieren crónicamente dosis supratrapéuticas de acetaminofén, o usan formulaciones de acetaminofén de liberación sostenida. Otros ensayos de laboratorio, tales como la alanina aminotransferasa sérica (ALT) y la aspartato aminotransferasa sérica (AST), indican la ocurrencia de daño hepático, pero ninguno de los bioindicadores es específico de una sobredosis de acetaminofén.

25 Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento para diagnosticar con precisión la toxicidad inducida por acetaminofén, incluyendo el envenenamiento oculto por acetaminofén, incluso 24 horas o más después de la sobredosis.

Descripción detallada

35 La presente divulgación se refiere a aductos acetaminofén-proteína (APAP) y a procedimientos para detectar la toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto que usa aductos APAP-proteína. El uso de un procedimiento según se describe en la presente memoria para detectar la toxicidad inducida por acetaminofén puede mejorar el resultado en los pacientes mediante la identificación de los sujetos que probablemente se beneficiarán de las decisiones de tratamiento apropiadas, informadas y oportunas. De manera ventajosa, dicho procedimiento puede permitir la identificación de la toxicidad inducida por acetaminofén como la causa de una insuficiencia hepática aguda cuando otros procedimientos de identificación de toxicidad inducida por acetaminofén fallan en individuos para los que no puede encontrarse una etiología identificable. Un procedimiento de la divulgación es también útil en pacientes con factores de confusión en los que los procedimientos actuales de detección de sobredosis de acetaminofén no son útiles, cuyos factores incluyen la presentación en el hospital 24 horas después de ingerir una sobredosis de acetaminofén, una ingestión crónica supratrapéutica de acetaminofén, el abuso de formulaciones de acetaminofén de liberación sostenida o uso de etanol.

I. Aducto APAP-proteína

45 Según un primer aspecto, la invención proporciona un aducto acetaminofén-proteína humana aislada (APAP), en el que el aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.

50 Un aspecto de la presente divulgación proporciona un aducto APAP-proteína para diagnosticar la toxicidad inducida por acetaminofén. La toxicidad inducida por acetaminofén está mediada por la conversión de acetaminofén a un metabolito reactivo, N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), en el cuerpo de un sujeto. La NAPQI se une covalentemente a grupos de cisteína en proteínas o péptidos para formar aductos APAP-proteína principalmente en el hígado y, en menor medida,

en otros tejidos capaces de metabolizar el acetaminofén. Estos aductos APAP-proteína tienen el grupo azufre de cisteína unido covalentemente al anillo de APAP meta al grupo acetamido y orto al grupo fenol, y se denominan también aductos 3-(cisteína-S-il) APAP (3-Cys-A) proteína. NAPQI agota el glutatión antioxidante natural del hígado y daña directamente las células en el hígado, conduciendo a insuficiencia hepática y liberación de aductos APAP-proteína al sistema circulatorio.

Los presentes inventores han identificado proteínas que son modificadas por NAPQI en sujetos con toxicidad inducida por acetaminofén. Las proteínas modificadas por NAPQI incluyen betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1, aspartato aminotransferasa citoplasmática, enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano, formimidoiltransferasa-ciclodeaminasa y distrofina. A continuación, se proporciona una descripción de cada proteína que puede ser modificada por NAPQI.

Betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1 (BHMT): La BHMT es una metaloenzima de zinc que cataliza la transferencia de un grupo metilo de betaína a homocisteína para producir dimetilglicina y metionina, respectivamente. La BHMT pertenece a la familia de las transferasas, específicamente aquellas que transfieren metiltransferasas del grupo de un carbono. La BHMT participa en el metabolismo de glicina, serina, treonina y también metionina.

Aspartato aminotransferasa citoplasmática (cAspAT): La cAspAT, conocida también como cisteína aminotransferasa citoplasmática, cisteína transaminasa citoplasmática (cCAT), glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) o transaminasa A, es una enzima dependiente de piridoxal fosfato que existe en las formas citoplasmática (GOT1) y mitocondrial (GOT2). Las dos enzimas son homodiméricas y muestran una estrecha homología. La cAspAT desempeña un papel en el metabolismo de los aminoácidos y los ciclos de urea y ácido tricarbóxico.

Enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano (GBE1): La enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano, conocida también como enzima ramificadora o enzima ramificadora de glucógeno, es una enzima que cataliza la formación de los enlaces alfa-1,6-glucosídicos en glucógeno mediante la escisión de un oligosacárido unido por 1,4-alfa a partir de cadenas de alfa-1,4-glucano en crecimiento y la posterior unión del oligosacárido a la posición alfa-1,6. Participa en la conversión de glucosa en glucógeno, añadiendo ramas a la molécula de glucógeno en crecimiento.

Formimidoiltransferasa-ciclodeaminasa (FTCD): La FTCD, conocida también como formiminotransferasa-ciclodeaminasa, es una enzima dependiente de folato que muestra actividad tanto transferasa como desaminasa. La FTCD sirve para canalizar unidades de un carbono desde formiminoglutamato al reservorio de folato. La enzima se une y promueve la agrupación de filamentos de vimentina procedentes del Golgi.

Distrofina (DMD): La distrofina es una proteína citoplasmática con forma de bastón y una parte vital de un complejo proteico que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular a la matriz extracelular circundante a través de la membrana celular. Este complejo es conocido ampliamente como el costámero o el complejo de proteína asociada a distrofina. Muchas proteínas musculares, tales como α -distrobrevina, sincoilina, sinemina, sarcoglicano, distroglicano y sarcospan, se localizan junto con distrofina en el costámero.

En realizaciones específicas, el aducto APAP-proteína comprende betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1 representada por el número de acceso UniProtKB Q93088, modificada con NAPQI.

También se describe que un aducto APAP-proteína comprende aspartato aminotransferasa citoplasmática modificada con NAPQI. Como ejemplo, un aducto APAP-proteína comprende una forma citoplasmática de aspartato aminotransferasa citoplasmática, modificada con NAPQI. Como ejemplo, un aducto APAP-proteína comprende aspartato aminotransferasa citoplasmática representada por el número de acceso UniProtKB P17174, modificada con NAPQI.

También se describe que un aducto APAP-proteína comprende enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano modificada con NAPQI. Como ejemplo, un aducto APAP-proteína comprende una enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano representada por el número de acceso UniProtKB Q04446, modificada con NAPQI.

También se describe que un aducto APAP-proteína comprende formimidoiltransferasa-ciclodeaminasa modificada con NAPQI. Como ejemplo, un aducto APAP-proteína comprende formimidoiltransferasa-ciclodeaminasa representada por el número de acceso UniProtKB O95954, modificada con NAPQI.

También se describe que un aducto APAP-proteína comprende distrofina modificada con NAPQI. Como ejemplo, un aducto APAP-proteína comprende distrofina representada por el número de acceso UniProtKB P11532, modificada con NAPQI.

Tal como se ha descrito anteriormente, la NAPQI se une covalentemente a grupos cisteína en una proteína para formar aductos APAP-proteína. De esta manera, una proteína en un aducto APAP-proteína de la presente divulgación comprende al menos un grupo cisteína modificado con NAPQI. Además, cuando una proteína en un aducto APAP-proteína comprende más de un residuo de cisteína, uno o más de los residuos de cisteína de la proteína pueden modificarse con NAPQI. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más residuos de cisteína de la proteína pueden modificarse

con NAPQI.

Un aducto APAP-proteína de la presente divulgación puede comprender una proteína de longitud completa modificada con NAPQI. De manera alternativa, un aducto APAP-proteína puede comprender un fragmento peptídico de una proteína, en el que el fragmento peptídico está modificado con NAPQI. Un aducto APAP-proteína puede comprender un fragmento peptídico de una proteína si, por ejemplo, un aducto APAP-proteína puede fragmentarse en péptidos en un sujeto antes de obtener una muestra para su análisis. Además, cuando se obtiene y se procesa una muestra para su análisis (véase más adelante), las proteínas en la muestra pueden fragmentarse como resultado del procesamiento de la muestra para su análisis, o pueden fragmentarse intencionalmente para su análisis posterior. En algunas realizaciones, un aducto APAP-proteína comprende una proteína de longitud completa modificada con NAPQI. En otras realizaciones, un aducto APAP-proteína comprende un fragmento peptídico de una proteína de longitud completa modificada con NAPQI. Los expertos en la técnica deberían apreciar que, en dichas realizaciones, un fragmento peptídico de una proteína de longitud completa modificada con NAPQI puede tener cualquier longitud, siempre que el péptido comprenda uno o más residuos de cisteína que están modificados con NAPQI.

II. Procedimientos

Según un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento detectar uno o más aductos APAP-proteína en la muestra, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.

Según un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar la toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento: a) medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína (APAP) en una muestra biológica obtenida del sujeto mediante la detección de uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1; y b) comparar la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra a un valor de referencia, en el que una cantidad mayor de aducto acetaminofén-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia indica toxicidad inducida por acetaminofén en el sujeto.

Según un cuarto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar si la hepatotoxicidad en un sujeto humano con síntomas de hepatotoxicidad es debida a una toxicidad inducida por acetaminofén, comprendiendo el procedimiento: a) medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína (APAP) en una muestra biológica obtenida del sujeto mediante la detección de uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1; y b) determinar si está presente un aducto APAP-proteína, en el que si no está presente un aducto APAP-proteína, la hepatotoxicidad en el sujeto no es debida a una toxicidad inducida por acetaminofén y en el que si está presente uno o más aductos APAP-proteína, comparar la cantidad de dicho uno o más aductos APAP-proteína en la muestra con un valor de referencia, en el que una mayor cantidad de aducto APAP-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia indica que la hepatotoxicidad en el sujeto es debida a una toxicidad inducida por acetaminofén.

Según un quinto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para detectar la toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento: a) medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína (APAP) en una muestra obtenida del sujeto para determinar un perfil de aductos APAP-proteína en el sujeto, comprendiendo el perfil la identidad y la concentración en la muestra del sujeto de uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1; b) comparar el perfil determinado en (a) con una base de datos que comprende la presencia y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína correlacionados con la toxicidad del acetaminofén; c) identificar una entrada coincidente de la base de datos en la que la identidad y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína coinciden con la identidad y la concentración de los uno o más aductos APAP-proteína en la muestra; y d) determinar la toxicidad de acetaminofén que comprende la toxicidad de acetaminofén particular de la entrada coincidente.

La divulgación abarca procedimientos para detectar la toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto humano. Un procedimiento de la divulgación comprende procesar una cantidad de una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, in vitro, para detectar aductos APAP-proteína, en el que el aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.

(a) sujeto

Tal como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un organismo vivo al que se le puede administrar acetaminofén. Según los aspectos de la invención, el sujeto es un ser humano. Se describen también en la presente

memoria sujetos que incluyen un animal de ganadería, un animal de compañía, un animal de laboratorio y un animal de zoológico. También se describe que el sujeto puede ser un roedor, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejillo de indias, etc. También se describe en la presente memoria que el sujeto puede ser un animal de ganado. Los animales de ganado adecuados pueden incluir cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, llamas y alpacas. También se describe en la presente memoria que el sujeto puede ser un animal de compañía. Los animales de compañía pueden incluir mascotas, tales como perros, gatos, conejos y pájaros. También se describe en la presente memoria que el sujeto puede ser un animal de zoológico. Tal como se usa en la presente memoria, un "animal de zoológico" se refiere a un animal que puede encontrarse en un zoológico. Dichos animales pueden incluir primates no humanos, grandes felinos, lobos y osos. También se describe en la presente memoria que el animal es un animal de laboratorio. Los ejemplos no limitativos de un animal de laboratorio pueden incluir roedores, caninos, felinos y primates no humanos. También se describe en la presente memoria que el animal es un roedor. Los roedores pueden incluir ratones, ratas, conejillos de indias, etc. Los sujetos pueden tener cualquier edad, incluidos recién nacidos, adolescentes, adultos, de mediana edad o ancianos.

Un sujeto puede o no tener un síntoma asociado con la toxicidad inducida por acetaminofén. Específicamente, la toxicidad inducida por acetaminofén puede ser hepatotoxicidad. Una persona experta en la materia apreciará que la toxicidad patológica inducida por acetaminofén probablemente comienza antes del diagnóstico o de la aparición de los síntomas asociados con la toxicidad inducida por acetaminofén. En algunas realizaciones, un sujeto tiene un síntoma asociado con la toxicidad inducida por acetaminofén. En otras realizaciones, un sujeto no tiene un síntoma asociado con la toxicidad inducida por acetaminofén. En todavía otras realizaciones, un sujeto tiene toxicidad inducida por acetaminofén detectable pero no tiene ningún otro síntoma asociado con la toxicidad inducida por acetaminofén. En todavía otras realizaciones, un sujeto ha recibido acetaminofén. En diferentes realizaciones, un sujeto ha recibido una dosis supraterapéutica de acetaminofén. En realizaciones alternativas, se sospecha que un sujeto recibe una dosis supraterapéutica de acetaminofén. Por ejemplo, un sujeto puede tener insuficiencia hepática de etiología poco clara que puede haberse desarrollado como resultado de recibir una dosis supraterapéutica de acetaminofén. El diagnóstico temprano de la toxicidad inducida por acetaminofén en el sujeto puede reducir el desarrollo y/o la progresión de los síntomas asociados con la toxicidad patológica inducida por acetaminofén.

Los ejemplos de síntomas asociados con la hepatotoxicidad inducida por acetaminofén pueden incluir, pero sin limitarse a, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal en el cuadrante superior derecho, AST elevada, ALT, bilirrubina y PT (INR), insuficiencia renal, pancreatitis, insuficiencia multiorgánica. La intoxicación leve por acetaminofén puede no causar síntomas y, cuando está presente, los síntomas suelen ser leves hasta ≥ 48 h después de la ingestión. En algunas realizaciones, la gravedad de los síntomas de la toxicidad del acetaminofén se cuantifica usando 4 etapas, tal como se muestra en la Tabla A.

| Tabla A. Etapas de la intoxicación aguda por acetaminofén | | |
|--|------------------------------|---|
| Etapas | Tiempo post-ingestión | Descripción |
| I | 0-24 h | Anorexia, náuseas, vómitos |
| II | 24-72 h | Dolor abdominal en el cuadrante superior derecho (común) AST, ALT y, si la intoxicación es grave, bilirrubina y PT (INR) a veces elevados |
| III | 72-96 h | Vómitos y síntomas de insuficiencia hepática Picos de AST, ALT, bilirrubina e INR A veces, insuficiencia renal y pancreatitis |
| IV | > 5 días | Resolución de hepatotoxicidad o progresión a insuficiencia multiorgánica (a veces fatal) |

(b) obtención de una muestra

Un procedimiento de la divulgación comprende, en parte, proporcionar una muestra biológica de un sujeto. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a una muestra obtenida de un sujeto. Cualquier muestra biológica que comprenda un aducto acetaminofén-proteína es adecuada. En la técnica se conocen numerosos tipos de muestras biológicas. Las muestras biológicas adecuadas pueden incluir, pero sin limitarse a, cabello, muestras de tejido o de fluidos corporales. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tejido, tal como una biopsia de tejido. La biopsia de tejido puede ser una biopsia de tejido hepático. El tejido biopsiado puede fijarse, incorporarse en parafina o plástico, y seccionarse, o el tejido biopsiado puede congelarse y crioseccionarse. De manera alternativa, el tejido biopsiado puede procesarse en células individuales o un explante, o puede procesarse en un homogenado, un extracto celular, una fracción membranosa o un extracto de proteína. En otras realizaciones, la muestra puede ser un fluido corporal. Los ejemplos no limitativos de fluidos corporales adecuados incluyen sangre, plasma, suero, orina, saliva, semen, transpiración, lágrimas, moco, esputo, lisados de tejidos u otros excrementos (por ejemplo, heces).

En una realización específica, el fluido corporal es orina. En otra realización específica, el fluido corporal es plasma. En todavía otra realización específica, el fluido corporal es suero. En todavía otra realización específica, el fluido corporal es saliva. En una realización diferente, la muestra biológica es cabello. El fluido puede usarse "tal cual", los componentes celulares pueden aislarse del fluido o una fracción de proteína puede aislarse del fluido usando técnicas estándar.

5 Tal como apreciará una persona experta en la materia, el procedimiento de recolección de una muestra biológica puede variar y variará dependiendo de la naturaleza de la muestra biológica y del tipo de análisis a realizar. Puede utilizarse cualquiera de entre una diversidad de procedimientos generalmente conocidos en la técnica para recoger una muestra biológica. En términos generales, el procedimiento mantiene preferentemente la integridad de la muestra, de manera que pueda detectarse con precisión un aducto acetaminofén-proteína y medir la cantidad según la invención.

10 Puede obtenerse una muestra biológica de un sujeto recogiendo una muestra fresca, o puede obtenerse de una muestra recogida y almacenada previamente. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra biológica de una colección de muestras de sangre almacenadas y conservadas.

En la presente memoria se describe también la obtención de una sola muestra de un sujeto para detectar un aducto APAP-proteína en la muestra. De manera alternativa, puede detectarse un aducto APAP-proteína en muestras obtenidas de un sujeto a lo largo del tiempo. De esta manera, pueden recogerse más de una muestra de un sujeto a lo largo del tiempo. Por ejemplo, pueden recogerse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o más muestras de un sujeto a lo largo del tiempo. También se describe en la presente memoria la recogida de 2, 3, 4, 5 o 6 muestras de un sujeto a lo largo del tiempo. También se describe en la presente memoria la recogida de 6, 7, 8, 9 o 10 muestras de un sujeto a lo largo del tiempo. También se describe en la presente memoria la recogida de 10, 11, 12, 13 o 14 muestras de un sujeto a lo largo del tiempo. También se describe en la presente memoria la recogida de 14, 15, 16 o más muestras de un sujeto a lo largo del tiempo.

15 Cuando se recoge más de una muestra de un sujeto a lo largo del tiempo, las muestras pueden recogerse cada 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más horas. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 0,5, 1, 2, 3 o 4 horas. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 4, 5, 6 o 7 horas. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 7, 8, 9 o 10 horas. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 10, 11, 12 o más horas. Además, las muestras pueden recogerse cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más días. También se describe en la presente memoria la recogida de una muestra aproximadamente cada 6 días. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 1, 2, 3, 4 o 5 días. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 5, 6, 7, 8 o 9 días. También se describe en la presente memoria la recogida de las muestras cada 9, 10, 11, 12 o más días.

(c) detección de un aducto de proteína

Un procedimiento de la divulgación comprende detectar uno o más aductos APAP-proteína en una muestra de un sujeto humano. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "detectar un aducto APAP-proteína" puede usarse para describir la detección de la presencia de un aducto APAP-proteína, o detectar la presencia y la concentración o la cantidad de un aducto APAP-proteína en una muestra de un sujeto humano. En realizaciones específicas, un procedimiento de la divulgación comprende detectar uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.

En esencia, un aducto APAP-proteína puede detectarse usando procedimientos usados normalmente en la técnica para detectar una proteína específica en una muestra. De esta manera, los ejemplos no limitativos de procedimientos para detectar un aducto de proteína pueden incluir cromatografía, espectrometría de masas, un procedimiento de detección basado en anticuerpos o una combinación de los mismos, y pueden ser tal como se describe en Ausubel et al. (2003) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, o Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

En algunas realizaciones, los aductos APAP-proteína de la divulgación se detectan usando espectrometría de masas. La espectrometría de masas puede ser la espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas cuadrupolo, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectrometría de masas con acelerador (AMS), espectrometría de masas con ionización térmica (TIMS) y espectrometría de masas con fuente de chispa (SSMS). En realizaciones específicas, los aductos APAP-proteína se detectan usando un procedimiento de espectrometría de masas capaz de detectar una proteína específica y de detectar una proteína específica incrementada por la masa molecular de NAPQI. Los ejemplos no limitativos de procedimientos de espectrometría de masas capaces de detectar una proteína específica y de detectar una proteína específica incrementada por la masa molecular de NAPQI incluyen espectrometría de masas MALDI-TOF y espectrometría de masas en tándem de alta resolución. En una realización ejemplar, se usa espectrometría de masas MALDI-TOF para detectar aductos APAP-proteína. En otra realización ejemplar, se usa espectrometría de masas en tándem de alta resolución para detectar aductos APAP-proteína.

5 En otras realizaciones, puede detectarse un aducto APAP-proteína de la divulgación en una muestra usando procedimientos basados en agentes de unión a epítipo. Los ejemplos no limitativos de agentes de unión a epítipo adecuados, dependiendo de la molécula objetivo, incluyen agentes seleccionados de entre el grupo que consiste en un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una secuencia de ADN bicatenario, ácidos nucleicos modificados, imitadores de ácido nucleico, un ligando, un fragmento de ligando, un receptor, un fragmento de receptor, un polipéptido, un péptido, una coenzima, un co-regulador, una molécula alostérica y un ion.

10 En algunas alternativas específicas de las realizaciones, un agente de unión a epítipo es un anticuerpo, y puede detectarse un aducto APAP-proteína usando procedimientos basados en anticuerpos. Los ejemplos no limitativos de anticuerpos que pueden usarse incluyen anticuerpos policlonales, ascitis, fragmentos Fab, fragmentos Fab', anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos humanizados y otros fragmentos que contienen el sitio de unión a epítipo del anticuerpo.

15 Los procedimientos basados en anticuerpos que pueden usarse para detectar una proteína, tal como un aducto APAP-proteína de la presente divulgación, son conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de procedimientos basados en anticuerpos para detectar un aducto APAP-proteína pueden incluir transferencia Western, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) u otros inmunoensayos en fase sólida, un inmunoensayo en sándwich, radioinmunoensayo, nefelometría, electroforesis, inmunofluorescencia, inmunotransferencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica, una matriz u otros procedimientos (véase Ausubel, F. M. et al., Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, incluidos los suplementos hasta 2001).

20 En general, un procedimiento basado en anticuerpos para detectar y medir una cantidad de un aducto acetaminofén-proteína comprende poner en contacto parte o la totalidad de la muestra que comprende un aducto acetaminofén-proteína con un anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína bajo condiciones efectivas para permitir la formación de un complejo entre el anticuerpo y el aducto acetaminofén-proteína. Típicamente, no se necesita la muestra completa, lo que permite a una persona experta en la técnica detectar y medir repetidamente la cantidad de un aducto acetaminofén-proteína en la muestra a lo largo del tiempo. El procedimiento puede ocurrir en solución, o el anticuerpo o el aducto de acetaminofén-proteína pueden inmovilizarse sobre una superficie sólida. Los ejemplos no limitativos de superficies adecuadas incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, perlas, resinas y otros polímeros. La fijación al sustrato puede producirse en una amplia diversidad de maneras, tal como apreciarán las personas expertas en la materia. Por ejemplo, el sustrato y el anticuerpo pueden derivatizarse con grupos químicos funcionales para una posterior unión de los dos. Por ejemplo, el sustrato puede derivatizarse con un grupo químico funcional que incluye, pero no se limita a, grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo o grupos tiol. Usando estos grupos funcionales, el anticuerpo puede unirse directamente usando los grupos funcionales o indirectamente usando enlazadores. Un anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína puede unirse también al sustrato de forma no covalente. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína biotinilado, que puede unirse a superficies revestidas covalentemente con estreptavidina, resultando en la unión. De manera alternativa, un anticuerpo puede sintetizarse sobre la superficie usando técnicas tales como fotopolimerización y fotolitografía.

35 La puesta en contacto de la muestra con un anticuerpo bajo condiciones efectivas durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo generalmente implica añadir la composición de anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína a la muestra e incubar la mezcla durante un período de tiempo suficiente para que el anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína se una a cualquier antígeno presente. Después de este tiempo, el complejo puede lavarse y, a continuación, el complejo se detecta y se mide la cantidad mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica. Los procedimientos para detectar y medir una cantidad de un complejo anticuerpo-polipéptido se basan generalmente en la detección de un marcador. El término "marcador", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia unida a un anticuerpo u otro material de sustrato, en el que la sustancia es detectable mediante un procedimiento de detección. Los ejemplos no limitativos de marcadores adecuados incluyen moléculas luminiscentes, moléculas quimioluminiscentes, fluorocromos, agentes de enfriamiento fluorescentes, moléculas coloreadas, radioisótopos, centelleadores, biotina, avidina, estreptavidina, proteína A, proteína G, anticuerpos o fragmentos de los mismos, polihistidina, Ni²⁺, marcadores Flag, marcadores myc, metales pesados y enzimas (incluyendo fosfatasa alcalina, peroxidasa, glucosa oxidasa y luciferasa). Los procedimientos para detectar y medir una cantidad de un complejo anticuerpo-polipéptido basado en la detección de un marcador son bien conocidos en la técnica.

40 En algunas realizaciones, un procedimiento basado en anticuerpos es un inmunoensayo. Los inmunoensayos pueden ejecutarse en una serie de formatos diferentes. En términos generales, los inmunoensayos pueden dividirse en dos categorías: inmunoensayos competitivos e inmunoensayos no competitivos. En un inmunoensayo competitivo, un analito no marcado en una muestra compite con el analito marcado para unirse a un anticuerpo. Se lava el analito no unido y se mide el analito unido. En un inmunoensayo no competitivo, el anticuerpo está marcado, no el analito. Los inmunoensayos no competitivos pueden usar un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo de captura está marcado) o más de un anticuerpo (por ejemplo, al menos un anticuerpo de captura que no está marcado y al menos un anticuerpo de "terminación" o de detección que está marcado). Los marcadores adecuados se han descrito anteriormente.

En otras realizaciones, un procedimiento basado en anticuerpos es una inmunotransferencia o transferencia Western. En todavía otras realizaciones, un procedimiento basado en anticuerpos es una citometría de flujo. En diferentes realizaciones, un procedimiento basado en anticuerpos es la inmunohistoquímica (IHC). La IHC usa un anticuerpo para detectar y cuantificar antígenos en muestras de tejido intactas. Las muestras de tejido pueden ser bloques de tejido recién congelados y/o fijados con formalina, incluidos en parafina (o incluidos en plástico) preparados para su estudio mediante IHC. Los procedimientos para preparar bloque de tejido para un estudio mediante IHC, así como los procedimientos para realizar la IHC, son bien conocidos en la técnica.

En realizaciones alternativas, un procedimiento basado en anticuerpos es una matriz. Una matriz comprende al menos una dirección, en la que al menos una dirección de la matriz tiene dispuesto sobre la misma un anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína. Las matrices pueden comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente varios cientos de miles de direcciones. En la técnica se conocen varios sustratos adecuados para la construcción de matrices, y una persona experta en la materia apreciará que otros sustratos pueden estar disponibles a medida que avanza la técnica. Los sustratos adecuados se han descrito también anteriormente. En algunas realizaciones, la matriz comprende al menos un anticuerpo anti-aducto acetaminofén-proteína unido al sustrato que está situado en una o más direcciones definidas espacialmente de la matriz. Por ejemplo, una matriz puede comprender al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco anticuerpos anti-aducto acetaminofén-proteína, reconociendo cada anticuerpo los mismos o diferentes aductos acetaminofén-proteína, y cada anticuerpo puede estar en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más direcciones definidas espacialmente.

Un procedimiento basado en anticuerpos que puede usarse para detectar un aducto APAP-proteína comprende usar cualquier anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína. Los ejemplos no limitativos de un anticuerpo con especificidad por APAP unido a una proteína incluyen anticuerpos que reconocen los aductos de acetaminofén-cisteína. Dichos anticuerpos son conocidos en la técnica y pueden ser tal como se describe en Bartolone et al. (1987; *Biochem Pharmacol.* 36: 1193-1196), Roberts et al. (1987 *J Pharmacol Exp Ther.* 241: 527-533), Bartolone et al. (1988 *Biochem Pharmacol.* 37: 4763-4774), Pumford et al. (1989, *J Pharmacol Exp Ther* 248: 190-196) y Pumford et al. (1990, *Toxicol Appl Pharmacol* 104: 521-532).

Un anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína puede ser específico para cualquier epítipo asociado con NAPQI unido a una proteína. En algunas realizaciones, un anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína puede ser específico para el fármaco original acetaminofén, pero reconoce también el acetaminofén unido a una proteína. En otras realizaciones, un anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína puede ser específico para NAPQI libre, pero reconoce también NAPQI unido a proteína. En realizaciones específicas, un anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína puede ser específico para NAPQI unido covalentemente a proteína. Por ejemplo, un anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína puede ser específico para un enlace 3-(cisteína-S-il) APAP (3-Cys-A)-proteína, o puede ser específico para un enlace de APAP-proteína en el carbono 4 del anillo APAP a través de un enlace -S-. En una realización ejemplar, un anticuerpo con especificidad para NAPQI unido a una proteína es específico para NAPQI unido a una proteína a través de un enlace 3-(cisteína-S-il) APAP (3-Cys-A)-proteína.

Para cada una de las realizaciones anteriores, una proteína que puede ser modificada por NAPQI puede ser aislada o enriquecida primero antes de la detección. Por ejemplo, las proteínas que pueden ser modificadas por NAPQI pueden ser enriquecidas o aisladas mediante cromatografía líquida, mediante precipitación, electroforesis o purificación por afinidad. En algunas realizaciones, las proteínas se enriquecen o purifican usando cromatografía líquida. En otras realizaciones, las proteínas que pueden ser modificadas por NAPQI se enriquecen o purifican usando electroforesis.

En realizaciones específicas, las proteínas se enriquecen o purifican mediante purificación por afinidad antes de la detección. En realizaciones particularmente específicas, las proteínas se enriquecen o purifican mediante purificación por afinidad usando anticuerpos con especificidad para una proteína que puede ser modificada por NAPQI. Los procedimientos para enriquecer una muestra para una proteína o purificar una proteína usando purificación por afinidad son conocidos en la técnica. En breve, la purificación por afinidad comprende incubar una muestra con un soporte sólido, tal como perlas, una placa de cultivo o una membrana, que facilita las etapas posteriores. Un soporte sólido puede ser revestido con anticuerpos específicos para proteínas que pueden ser modificados por NAPQI, causando que las proteínas que pueden ser modificadas por NAPQI se unan al soporte sólido. De manera alternativa, una muestra puede ser incubada con un primer anticuerpo con especificidad para una proteína que puede ser modificada por NAPQI, y el complejo NAPQI-proteína-anticuerpo puede aislarse mediante incubación con un soporte sólido revestido con un segundo anticuerpo con especificidad contra un segundo sitio en dicho primer anticuerpo, causando que un complejo proteína-anticuerpo se una al soporte sólido. A continuación, los aductos acetaminofén-proteína pueden purificarse o enriquecerse lavando otro material en la muestra que no está unido al soporte sólido o, si el soporte sólido es perlas superparamagnéticas, las proteínas que pueden ser modificadas por NAPQI unidas a las perlas (que expresan el antígeno) pueden separarse de la muestra por atracción a un campo magnético fuerte. Tras el enriquecimiento o la purificación de una proteína, a continuación, puede detectarse una proteína aducida por APAP en la muestra enriquecida o purificada usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

En algunas realizaciones ejemplares, un procedimiento de la divulgación comprende usar anticuerpos específicos de proteínas para capturar y aislar una o más proteínas que pueden ser modificadas con NAPQI, y a continuación usar un segundo inmunoensayo con especificidad para NAPQI unido a una proteína para detectar el los aductos APAP-proteína. En otras realizaciones ejemplares, un procedimiento de la divulgación comprende usar anticuerpos específicos de NAPQI para capturar y aislar una o más proteínas que pueden ser modificadas con NAPQI, y a continuación usar un segundo inmunoensayo con especificidad para una proteína que puede ser modificada con NAPQI para detectar los aductos APAP-proteína.

La divulgación proporciona también que puedan medirse simultáneamente múltiples aductos APAP-proteína en la misma muestra biológica. Además, la divulgación proporciona que puedan detectarse los aductos APAP-proteína y las proteínas no aducidas correspondientes en la misma muestra biológica. De esta manera, la divulgación proporciona un procedimiento útil para detectar cambios en la síntesis y la eliminación de las proteínas aducidas por APAP a gran escala (es decir, proteómica/metabólica) y proporciona un medio sensible para detectar y medir proteínas aducidas por APAP.

En algunas realizaciones, pueden detectarse también aductos totales de APAP-proteína en una muestra de un sujeto. Los procedimientos para detectar aductos totales de APAP-proteína en una muestra son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los aductos totales de APAP-proteína en una muestra se detectan usando cromatografía líquida. La cromatografía líquida puede ser cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los ejemplos no limitativos de HPLC pueden incluir cromatografía de partición, cromatografía de fase normal, cromatografía de desplazamiento, cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de bioafinidad o cromatografía de fase normal acuosa. Los procedimientos de detección no limitativos que pueden usarse junto con HPLC para detectar aductos totales de APAP-proteína incluyen detección electroquímica, detección usando espectroscopía ultravioleta o visible, fluorescencia, un detector quiral, una matriz de fotodiodos o procedimientos de detección basados en espectrometría de masas. En una alternativa específica de las realizaciones, los aductos totales de APAP-proteína en una muestra se detectan usando HPLC con detección electroquímica (HPLC-ECD). En una realización ejemplar, los aductos totales de APAP-proteína se detectan usando HPLC-ECD, tal como se describe en Muldrew et al., 2002, *Drug Metabolism and Disposition* 30: 446-451.

(d) detección de toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto

La invención proporciona medios para clasificar a un sujeto humano en base a la cantidad de aducto acetaminofén-proteína medida en una muestra biológica obtenida del sujeto. El procedimiento generalmente comprende (i) medir la cantidad de aducto de acetaminofén-proteína en una muestra biológica obtenida del sujeto, (ii) comparar la cantidad de aducto de acetaminofén-proteína en la muestra con un valor de referencia, y (iii) clasificar al sujeto como que tiene una cantidad alta o baja de aducto acetaminofén-proteína en base a la cantidad de aducto acetaminofén-proteína medida en la muestra. También se describe en la presente memoria que pueden medirse uno o más aductos acetaminofén-proteína. Por ejemplo, pueden medirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aductos acetaminofén-proteína. Los procedimientos para obtener una muestra biológica de un sujeto y medir la cantidad de aducto de acetaminofén-proteína en la muestra se han detallado anteriormente. En una realización preferente, la muestra biológica es un fluido biológico seleccionado de entre el grupo que consiste en sangre, plasma, suero, orina y saliva.

Según los aspectos de la invención, el aducto de acetaminofén-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, en el que la proteína modificada con NAPQI es betaína-homocisteína S-metiltransferasa. También se describe en la presente memoria la detección de aspartato aminotransferasa citoplasmática modificada con NAPQI. También se describe en la presente memoria la detección de la enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano modificada con NAPQI. También se describe en la presente memoria la detección de la formimidoiltransferasa-cicludeaminasa modificada con NAPQI. También se describe en la presente memoria la detección de distrofina modificada con NAPQI.

También se describe en la presente memoria la detección de más de un aducto APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, y en el que la proteína se selecciona de entre el grupo que consiste en betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1, aspartato aminotransferasa citoplasmática, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, formimidoiltransferasa-cicludeaminasa o distrofina. Por ejemplo, se detectan dos, tres, cuatro o cinco aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, y en el que la proteína se selecciona de entre el grupo que consiste en betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1, aspartato aminotransferasa citoplasmática, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, formimidoiltransferasa-cicludeaminasa o distrofina. También se describe en la presente memoria la detección de dos aductos APAP-proteína. También se describe en la presente memoria la detección de tres aductos APAP-proteína. También se describe en la presente memoria la detección de cuatro aductos APAP-proteína. También se describe en la presente memoria la detección de cinco aductos APAP-proteína.

También se describe en la presente memoria la detección de más de un aducto APAP-proteína, en el que los aductos APAP-proteína comprenden una proteína modificada con NAPQI, y en el que las proteínas modificadas con NAPQI son

tal como se describe en la **Tabla B**.

| |
|---|
| Tabla B. |
| BHMT |
| cAspAT |
| Enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano |
| FTCD |
| distrofina |
| BHMT, cAspAT |
| BHMT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano |
| BHMT, FTCD |
| BHMT, distrofina |
| cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano |
| cAspAT, FTCD |
| cAspAT, distrofina |
| Enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD |
| Enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, distrofina |
| FTCD, distrofina |
| BHMT, cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano |
| BHMT, cAspAT, FTCD |
| BHMT, cAspAT, distrofina |
| BHMT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD |
| BHMT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, distrofina |
| BHMT, FTCD, distrofina |
| cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD |
| cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, distrofina |
| cAspAT, FTCD, distrofina |
| Enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD, distrofina |
| BHMT, cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD |
| BHMT, cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, distrofina |
| BHMT, cAspAT, FTCD, distrofina |
| BHMT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD, distrofina |
| cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD, distrofina |
| BHMT, cAspAT, enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano, FTCD, distrofina |

La cantidad de aducto de acetaminofén-proteína en la muestra se compara con un valor de referencia. Puede usarse cualquier valor de referencia adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra de fluido biológico obtenida de un sujeto o grupo de sujetos de la especie humana que tiene una función hepática normal. En otro ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra de fluido biológico obtenida de un sujeto, o grupo de sujetos, de la especie humana que no tiene toxicidad inducida por acetaminofén detectable. En otro ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra de fluido biológico obtenida de un sujeto o grupo de sujetos de la especie humana que tiene toxicidad inducida por acetaminofén medida mediante AST, ALT, bilirrubina, INR u otros biomarcadores inespecíficos de la función hepática. Por ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra biológica obtenida de un sujeto o grupo de sujetos de la especie humana que tiene toxicidad inducida por acetaminofén medida por niveles de ALT > 1000 IU. En otro ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser la señal de fondo del ensayo determinada por procedimientos conocidos en la técnica. En otro ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser una medición de la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra de referencia obtenida del mismo sujeto. La muestra de referencia comprende el mismo tipo de fluido biológico que la muestra de ensayo, y puede obtenerse o no del sujeto cuando la función hepática era normal. Una persona experta en la materia apreciará que no siempre es posible o deseable obtener una muestra de referencia de un sujeto cuando el sujeto está sano. Por ejemplo, en un contexto agudo, una muestra de referencia puede ser la primera muestra obtenida del sujeto en la presentación. En otro ejemplo, cuando se supervisa la efectividad de una terapia, una muestra de referencia puede ser una muestra obtenida de un sujeto antes de comenzar la terapia. En dicho ejemplo, un sujeto puede haber sospechado de una toxicidad inducida por acetaminofén, pero puede no tener otros síntomas de toxicidad inducida por acetaminofén o el sujeto puede haber sospechado de una toxicidad inducida por acetaminofén y de uno o más síntomas de toxicidad inducida por acetaminofén. En una realización específica, un valor de referencia adecuado puede ser un valor umbral determinado previamente mediante otros procedimientos. Por ejemplo, un valor de referencia adecuado puede ser un valor correspondiente a 1 nmol/ml de aducto acetaminofén-proteína medido mediante cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-EC). Las personas expertas en la materia deberían apreciar que, en dichas realizaciones, puede determinarse un valor de referencia de uno o más aductos APAP-proteína para cada aducto APAP-proteína.

Según ciertos aspectos de la invención, un sujeto puede clasificarse en base a la cantidad de aducto acetaminofén-proteína medida en la muestra. La clasificación de un sujeto en base a la cantidad de aducto acetaminofén-proteína medida en una muestra de fluido biológico obtenida del sujeto puede usarse para identificar los sujetos con toxicidad inducida por acetaminofén. A continuación, se describe en detalle la expresión "toxicidad inducida por acetaminofén". En términos generales, un sujeto puede clasificarse como teniendo una cantidad alta o baja de aducto acetaminofén-proteína en comparación con un valor de referencia, en el que una cantidad alta de aducto acetaminofén-proteína es una cantidad superior al valor de referencia y una cantidad baja es una cantidad igual o inferior al valor de referencia. En realizaciones preferentes, para clasificar a un sujeto como teniendo una alta cantidad de aducto acetaminofén-proteína, la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia puede ser al menos un 5% mayor. Por ejemplo, la cantidad de aducto de acetaminofén-proteína en la muestra puede ser al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 100% mayor que el valor de referencia. En otras realizaciones, la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra de fluido biológico obtenida del sujeto en comparación con el valor de referencia puede incrementarse en más de 1 vez. Por ejemplo, la cantidad de aducto de acetaminofén-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia puede incrementarse al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4 veces, al menos 4,5 veces o al menos 5 veces. De manera alternativa, la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia puede incrementarse al menos 5,5 veces, al menos 6 veces, al menos 6,5 veces, al menos 7 veces, al menos 7,5 veces, al menos 8 veces, al menos 8,5 veces, al menos 9 veces, al menos 9,5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces o al menos 50 veces.

En otro aspecto, la invención proporciona medios para detectar la toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "toxicidad inducida por acetaminofén" se refiere al daño o destrucción del hígado debido al acetaminofén. El acetaminofén, cuando se toma en sobredosis y, a veces, incluso cuando se ingiere dentro de los intervalos terapéuticos, puede dañar el hígado. El daño al hígado no es debido al medicamento en sí, sino a un metabolito tóxico (N-acetil-p-benzoquinona imina NAPQI o NABQI) producido por las enzimas del citocromo P-450 en el hígado. En una sobredosis, se genera una gran cantidad de NAPQI, que sobrecarga el proceso de desintoxicación y conduce al daño de las células hepáticas. El riesgo de lesión hepática está influenciado por diversos factores, incluyendo la dosis ingerida, la ingesta simultánea de alcohol u otros fármacos, el intervalo entre la ingestión y el antídoto, etc. Las causas de la hepatotoxicidad conocidas en la técnica son numerosas y pueden incluir, pero no se limitan a, traumatismos, enfermedades neoplásicas, infecciones bacterianas o virales, exposición a toxinas, venenos, sustancias ambientales u otras sustancias. Los biomarcadores de la función hepática son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de biomarcadores de daño hepático incluyen AST, ALT, bilirrubina y PT (INR) elevados. Sin embargo, el aumento del

aducto acetaminofén-proteína en un fluido biológico puede demostrar que el acetaminofén causó o contribuyó a la lesión hepática.

En algunas realizaciones, la toxicidad inducida por acetaminofén se detecta cuando la concentración del aducto APAP-proteína detectada en una muestra de un sujeto está por encima del valor de referencia. También se describe en la presente memoria un diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén cuando la concentración de 2, 3, 4 o 5 de los aductos APAP-proteína detectados en una muestra está por encima del valor de referencia. También se describe en la presente memoria un diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén cuando las concentraciones de dos aductos APAP-proteína detectados en una muestra están por encima del valor de referencia. También se describe en la presente memoria un diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén cuando las concentraciones de tres aductos APAP-proteína detectados en una muestra están por encima del valor de referencia. También se describe en la presente memoria un diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén cuando las concentraciones de cuatro aductos APAP-proteína detectados en una muestra están por encima del valor de referencia. También se describe en la presente memoria un diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén cuando las concentraciones de cinco aductos APAP-proteína detectados en una muestra están por encima del valor de referencia. También se describe en la presente memoria un diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén cuando la concentración de un aducto APAP-proteína está por encima del valor de referencia, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, y en el que la proteína es tal como se ha descrito en **Tabla B**.

Además de la detección de una toxicidad inducida por acetaminofén, las personas expertas en la materia deberían apreciar también que puede usarse un procedimiento de la divulgación para diagnosticar diversas características del tratamiento con acetaminofén y de la toxicidad por acetaminofén. Puede usarse un procedimiento de la divulgación para determinar los niveles de ingesta de acetaminofén por un sujeto para determinar el cumplimiento del tratamiento. De manera alternativa, puede usarse un procedimiento de la divulgación para determinar la gravedad de la toxicidad por acetaminofén. Por ejemplo, puede usarse un procedimiento de la divulgación para determinar los niveles sub-tóxicos normales de acetaminofén, descartando de esta manera la toxicidad por acetaminofén. También puede usarse un procedimiento de la divulgación para diagnosticar la toxicidad por acetaminofén con un buen pronóstico y que se resolverá. De manera alternativa, puede usarse un procedimiento de la divulgación para diagnosticar una toxicidad por acetaminofén con un mal pronóstico, que conducirá a la muerte o a la necesidad de un trasplante de hígado. También puede usarse un procedimiento de la divulgación para determinar la exposición crónica al acetaminofén. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "exposición crónica al acetaminofén" puede usarse para describir la toxicidad por acetaminofén causada por la exposición al acetaminofén supratrapéutico repetida durante períodos de tiempo prolongados, tal como, por ejemplo, al ingerir dosis supratrapéuticas de acetaminofén, o el uso de formulaciones de acetaminofén de liberación sostenida. Además, puede usarse un procedimiento de la divulgación para determinar la exposición aguda a acetaminofén. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "exposición aguda a acetaminofén" puede usarse para describir la toxicidad por acetaminofén causada por la ingestión de una única dosis grande de acetaminofén.

Puede usarse un procedimiento de la presente divulgación en combinación con otros procedimientos para diagnosticar la toxicidad por acetaminofén u otros procedimientos de diagnóstico clínico.

Tras la detección del diagnóstico de toxicidad inducida por acetaminofén, el sujeto puede ser tratado mediante procedimientos estándar en la técnica para la toxicidad inducida por acetaminofén. Dichos procedimientos de tratamiento pueden depender de la gravedad de la toxicidad inducida por acetaminofén. El tratamiento de la sobredosis de acetaminofén consiste principalmente en la descontaminación gastrointestinal y la atención de apoyo. Puede administrarse carbón activado, N-acetilcisteína (NAC) al sujeto o, en casos graves, puede ser necesario un trasplante de hígado.

Para cada aspecto, el procedimiento comprende generalmente (i) proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, (ii) medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra y (iii) comparar la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra con un valor de referencia. Una mayor cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia indica toxicidad inducida por acetaminofén. La cantidad de aducto de acetaminofén-proteína puede ser una medición cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. Los aductos acetaminofén-proteína adecuados se han descrito anteriormente, así como los procedimientos para medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra biológica. En una realización preferente, la muestra biológica es un fluido biológico seleccionado de entre el grupo que consiste en sangre, plasma, suero, orina y saliva.

Los procedimientos de la presente divulgación pueden usarse también para determinar un perfil de aductos APAP-proteína en una muestra de un sujeto. Tal como se usa en la presente memoria, un "perfil de aductos APAP-proteína" puede usarse para describir la identidad y/o la concentración de uno o más aductos APAP-proteína en una muestra de un sujeto, o la fluctuación de la identidad y/o de la concentración de aductos APAP-proteína a lo largo del tiempo en muestras de un sujeto, en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1. En algunas realizaciones, un perfil de aductos APAP-proteína puede comprender uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada uno de los uno o

más aductos APAP-proteína comprende una proteína modificada con NAPQI, y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.

De esta manera, un procedimiento de la divulgación puede comprender comparar un perfil de aductos APAP-proteína en una muestra de un sujeto humano con una base de datos que comprende la identidad y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína correlacionados con la toxicidad de APAP, identificar una entrada coincidente de la base de datos en la que la identidad y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína coinciden con la identidad y la concentración del perfil del al menos un aducto APAP-proteína en la muestra, y determinar la toxicidad por acetaminofén que comprende la toxicidad por acetaminofén particular de la entrada coincidente.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la materia. En el caso de que existan múltiples definiciones para un término en la presente memoria, prevalecerán las de esta sección, a menos que se indique lo contrario.

Al llevar a la práctica la presente divulgación, pueden usarse muchas técnicas convencionales en biología molecular, microbiología y ADN recombinante. Estas técnicas son bien conocidas y se explican, por ejemplo, en *Molecular Biology*, Volumes I, II y III, 1997 (F.M. Ausubel ed.); *Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II, 1985 (D. N. Glover ed.); *Oligonucleotide Synthesis*, 1984 (M.L. Gait ed.); *Nucleic Acid Hybridization*, 1985 (Hames y Higgins eds.); *Transcription and Translation*, 1984 (Hames y Higgins eds.); *Animal Cell Culture*, 1986 (R.I. Freshney ed.); *Immobilized Cells and Enzymes*, 1986 (IRL Press); *Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian cells*, 1987 (J.H. Miller y M.P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); y *Methods in Enzymology*, Vol. 154 y Vol. 155 (Wu and Grossman, y Wu, eds., respectivamente).

Las expresiones "aducto APAP" o "aducto APAP-proteína" pueden usarse indistintamente para describir una proteína modificada con NAPQI, y en la que la proteína se selecciona de entre el grupo que consiste en betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1, aspartato aminotransferasa citoplasmática, enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano, formimidoiltransferasa-cicludeaminasa o distrofina. Según la invención, la proteína del "aducto APAP" o "aducto APAP-proteína" es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.

Las expresiones "dosis supraterapéutica de APAP" o "dosis tóxica de APAP" pueden usarse indistintamente para describir una dosis excesiva de APAP que puede causar toxicidad (por ejemplo, daño hepático) en un sujeto.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferentes de la divulgación. Las personas expertas en la materia deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas que los presentes inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la divulgación y, de esta manera, puede considerarse que constituyen modos preferentes para su práctica. Sin embargo, las personas expertas en la materia deberían apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aun así obtener un resultado parecido o similar.

Ejemplo 1. Identificación de proteínas modificadas por NAPQI en suero de pacientes con toxicidad significativa por acetaminofén

El acetaminofén (APAP) es el medicamento más común usado para el tratamiento del dolor y la fiebre en el mundo actual y es también la principal causa de insuficiencia hepática aguda en los Estados Unidos. Las etapas iniciales de la toxicidad por APAP se han caracterizado bien e implican la biotransformación del fármaco original en un metabolito químicamente reactivo N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), que se une covalentemente a las proteínas celulares. La NAPQI se desintoxica mediante su unión al cisteiniltiol en el glutatión hepático (GSH). En exposiciones tóxicas a APAP, las reservas de GSH se agotan, aumentando la cantidad de NAPQI que se une a los cisteiniltioles en las proteínas celulares, produciendo una diversidad de aductos APAP-proteína. La toxicidad se produce con la lisis de los hepatocitos y la liberación de las proteínas modificadas en el suero. Las proteínas que son modificadas en humanos por NAPQI no han sido reportadas previamente.

En este ejemplo, se informa acerca de la identificación de proteínas aducidas con acetaminofén específicas en suero de pacientes con sobredosis de acetaminofén. Se usaron enfoques proteómicos enfocados en aductos de vanguardia para identificar biomarcadores de "segunda generación" específicos de toxicidad por APAP en pacientes que recibieron dosis terapéuticas de APAP y pacientes que recibieron sobredosis de APAP. La identificación de aductos APAP-proteína específicos y el examen de estos aductos específicos con relación a los marcadores metabólicos recientemente descritos

de la toxicidad por APAP y los índices establecidos de toxicidad hepática pueden sentar las bases para evaluaciones futuras mejoradas de riesgo y seguridad para el APAP en pacientes.

5 Se usaron estudios proteómicos basados en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para determinar inequívocamente las proteínas modificadas por NAPQI (proteínas aducidas) en suero de pacientes con toxicidad significativa por acetaminofén. Estas proteínas se muestran en **Tabla 1**. La **Tabla 1** muestra también al menos una modificación del sitio de cisteína en cada proteína.

| Tabla 1 | | |
|--|-----------------------------|--|
| Nombre de la proteína | Peso molecular (kDa) | ID de proteína; Cisteína modificada |
| Betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1 | 45 | Q93088; Cys131 |
| Aspartato aminotransferasa, citoplasmática | 46 | P17174; Cys46 |
| Enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano | 80 | Q04446; Cys81 |
| Formimidoltransferasa-cicludeaminasa | 59 | O95954; Cys131 |
| Distrofina | 427 | P11532; Cys1040 |

No se produjeron proteínas modificadas con acetaminofén en el suero de control de individuos que no estuvieron expuestos al acetaminofén.

10 **Ejemplo 2. Detección de proteínas aducidas por NAPQI**

Para comprobar si las proteínas modificadas por NAPQI específicas, tales como las proteínas descritas en Ejemplo 1, pueden detectarse específicamente, las proteínas ovoalbúmina (OA) y albúmina de suero bovino (BSA) se hicieron reaccionar con NAPQI preparada sintéticamente y se sometieron a evaluación proteómica usando MS/MS. El análisis proteómico MS/MS fue capaz de determinar la masa molecular de la proteína incrementada por la masa molecular de NAPQI (149), y se determinaron el sitio o los sitios específicos de modificación. El análisis proteómico MS/MS fue capaz también de determinar la masa molecular de la proteína incrementada por la masa molecular de más de una NAPQI (149n, donde n es el número de NAPQI aducidas a la proteína). Además, las proteínas aductoras modificadas específicamente (OA-APAP y BSA-APAP) fueron reconocidas por un anticuerpo anti-aducto desarrollado por los inventores y, de esta manera, podrían cuantificarse mediante inmunoensayo.

20 **Ejemplo 3. Desarrollo de un inmunoensayo para la toxicidad por acetaminofén**

La identificación de las proteínas aducidas por NAPQI descritas en el Ejemplo 1 puede permitir el desarrollo de un inmunoensayo específico para la toxicidad por acetaminofén. La divulgación puede basarse en el uso de anticuerpos específicos de proteínas para capturar y aislar las proteínas aducidas y, a continuación, la utilización de un segundo inmunoensayo específico para aductos de acetaminofén-cisteína (aductos totales) para detectar la aducción de la proteína.

Pueden analizarse muestras humanas de sobredosis y exposición a acetaminofén para comprender la frecuencia de aparición de aductos de proteínas específicos entre los diferentes grados de severidad de la toxicidad. Para conseguir esto, puede desarrollarse una metodología adicional para aislar por anticuerpos/afinidad las proteínas aductoras y de esta manera enriquecer las proteínas específicas de muestras humanas. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos que usan anticuerpos en fase sólida contra proteínas específicas (en perlas paramagnéticas u otra matriz en fase sólida) para capturar la proteína específica y pueden complementarse con la detección de proteínas aductoras usando anticuerpos con especificidad para APAP unida a proteína a través del enlace formado fisiológicamente de C3 del acetaminofén a S de los residuos de cisteína. Esencialmente, el ensayo puede implicar interrogar la proteína aducida dos veces: 1) captura mediante un anticuerpo anti-proteína específico, y 2) detección con anticuerpos específicos para el enlace de la proteína hapteno. Pueden usarse anticuerpos antiproteína disponibles comercialmente, o anticuerpos recientemente desarrollados diseñados específicamente para el uso descrito en la presente memoria. De manera alternativa, el ensayo puede implicar interrogar la proteína aducida mediante captura con anticuerpos específicos para el enlace de la proteína hapteno, y detectar con anticuerpos específicos para la proteína.

REIVINDICACIONES

1. Un aducto acetaminofén (APAP)-proteína humano aislado, en el que el aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.
- 5 2. Un procedimiento para medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento detectar uno o más aductos APAP-proteína en la muestra, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1.
- 10 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la muestra biológica es un fluido biológico seleccionado entre el grupo que consiste en sangre, plasma, suero, orina y saliva.
4. Un procedimiento de detección de toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento:
 - a) medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína (APAP) en una muestra biológica obtenida del sujeto mediante la detección de uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1; y
 - 15 b) comparar la cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra con un valor de referencia, en el que una mayor cantidad de aducto acetaminofén-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia indica toxicidad inducida por acetaminofén en el sujeto.
- 20 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la toxicidad inducida por acetaminofén está asociada directa o indirectamente con una sobredosis de acetaminofén.
6. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la toxicidad inducida por acetaminofén es hepatotoxicidad.
7. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la muestra biológica es un fluido biológico seleccionado de entre el grupo que consiste en sangre, plasma, suero, orina y saliva.
- 25 8. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la muestra biológica es de un sujeto con hepatotoxicidad de etiología desconocida.
9. Un procedimiento para determinar si la hepatotoxicidad en un sujeto humano con síntomas de hepatotoxicidad es debida a toxicidad inducida por acetaminofén, comprendiendo el procedimiento:
 - a) medir la cantidad de aducto acetaminofén (APAP)-proteína en una muestra biológica obtenida del sujeto mediante la detección de uno o más aductos APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1; y
 - 30 b) determinar si está presente un aducto APAP-proteína, en el que, si no está presente un aducto APAP-proteína, la hepatotoxicidad en el sujeto no es debida a toxicidad inducida por acetaminofén, y en el que si está presente uno o más aductos APAP-proteína, comparar la cantidad de dichos uno o más aductos APAP-proteína en la muestra con un valor de referencia, en el que una mayor cantidad de aducto APAP-proteína en la muestra en comparación con el valor de referencia indica que la hepatotoxicidad en el sujeto es debida a toxicidad inducida por acetaminofén.
 - 35
10. Un procedimiento de detección de toxicidad inducida por acetaminofén en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento:
 - a) medir la cantidad de aducto acetaminofén-proteína (APAP) en una muestra obtenida del sujeto para determinar un perfil de aductos APAP-proteína en el sujeto, comprendiendo el perfil la identidad y la concentración en la muestra del sujeto de uno o más aductos de APAP-proteína, en el que cada aducto APAP-proteína comprende una proteína modificada con N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), y en el que la proteína es betaína-homocisteína S-metiltransferasa 1;
 - 40
 - 45 b) comparar el perfil determinado en (a) con una base de datos que comprende la presencia y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína correlacionados con la toxicidad de acetaminofén;
 - c) identificar una entrada coincidente de la base de datos en la que la identidad y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína coinciden con la identidad y la concentración de uno o más aductos APAP-proteína en la

muestra; y

d) determinar la toxicidad de acetaminofén que comprende la toxicidad de acetaminofén particular de la entrada coincidente.