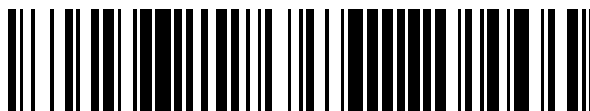


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 367**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01)
A61K 31/4706 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2016 PCT/EP2016/077843**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085115**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2016 E 16798131 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3377095**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para tratar la rabdomiólisis**

30 Prioridad:

18.11.2015 EP 15306831

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

01.07.2020

73 Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
FONDATION IMAGINE (20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (20.0%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (20.0%)

72 Inventor/es:

DE LONLAY-DEBENEY, PASCALE;
LEBRETON, CORINNE;
HAMEL, YAMINA;
MAUVAIS, FRANÇOIS-XAVIER y
VAN ENDERT, PETER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 770 367 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para tratar la rabdomiólisis

Campo:

La presente descripción se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para tratar la rabdomiólisis.

5 Antecedentes:

Las formas juveniles de rabdomiólisis grave y recurrente son trastornos hereditarios caracterizados por la presencia de mioglobinuria, niveles séricos de creatinina cinasa >10.000 UI/L y daño renal agudo [1, 2]. Aún se debate la incidencia exacta, ya que esta entidad clínica es a menudo desconocida por los médicos, pero se cree que representa 10-15% de todas las rabdomiólisis de la infancia. Su pronóstico es malo, especialmente porque tanto la gravedad como la aparición de nuevas exacerbaciones son impredecibles [3] y los tratamientos siguen siendo sintomáticos. La enfermedad por lipina-1 es una causa de rabdomiólisis recurrente y grave en la infancia (Zeharia *et al.*, 2008; Michot *et al.*, 2010; Michot *et al.*, 2012). La mitad de los pacientes muere durante los episodios de rabdomiólisis (Bergounioux *et al.*, 2012).

En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para tratar la rabdomiólisis. Por ello, se ha sugerido que puede ser sumamente deseable caracterizar nuevos compuestos para el tratamiento de la rabdomiólisis.

Así pues, existe una necesidad crucial de identificar los mecanismos patogénicos implicados en los brotes de rabdomiólisis, aunque algunos de ellos ya han sido caracterizados. De hecho, el espectro clínico de la rabdomiólisis juvenil grave y recurrente resulta bastante heterogéneo en cuanto a la naturaleza de sus distintas enfermedades. Sin embargo, estas comparten un mecanismo común responsable de la mioglobinuria: tales defectos conducen a un deterioro en el metabolismo del trifosfato de adenosina y a una desregulación de los canales de iones Na^+/K^+ o $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y finalmente a un rápido aumento de la concentración citoplasmática de calcio ionizado que conduce a la destrucción de la célula muscular [1, 4, 5].

Las rabdomiólisis hereditarias se ven precipitadas y empeoradas por una enfermedad febril o el ejercicio, dos estados de los que es bien conocido que están asociados con altos niveles circulantes de mediadores proinflamatorios tales como citocinas y quimiocinas [6-8] y temperatura elevada. Además, los autores de la invención han demostrado recientemente que la rabdomiólisis debida a deficiencia de aldolasa A implica una exacerbación de la deficiencia enzimática a temperaturas elevadas [9].

Ya se han descrito posibles vínculos entre enfermedades metabólicas e inflamación crónica en diversos contextos, tales como la diabetes tipo 2, la obesidad o la aterosclerosis [6-8], lo que lleva a proponer el inmunometabolismo como una frontera emergente [10]. En la diabetes tipo 2 se han detectado diversos mediadores inflamatorios circulantes, tales como factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), interleucinas (IL) o adipocinas. El foco se ha desplazado recientemente hacia la IL-1 β , a la que ahora se incrimina como uno de los principales agentes patógenos, por activar la cinasa NH-(2)-terminal de c-Jun (JNK, por sus siglas en inglés) y desencadenar la fosforilación de serina del sustrato-1 de receptor de insulina (IRS1, por sus siglas en inglés). La IL-1 β entorpece la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés)-Akt para insulina en tejidos sensibles a la insulina, contribuyendo a la resistencia a la insulina. En cuanto a los trastornos metabólicos hereditarios, la inflamación contribuye en gran medida a la patogénesis del síndrome de Majeed [11, 12] o de la deficiencia de mevalonato cinasa [13], que pertenecen ambas al espectro clínico de los trastornos autoinflamatorios [14, 15]. El síndrome de Majeed es debido a un defecto en LPIN2, un homólogo de LPIN1, que controla la síntesis de triacilglicerol (TAG), la activación de la vía JNK/AP-1 (cinasa N-terminal de Jun y factor de transcripción AP-1, por sus siglas en inglés) y, en última instancia, la regulación en incremento de genes proinflamatorios bajo estimulación palmítica [14]. Como prueba directa, las bioterapias dirigidas hacia las rutas relacionadas con IL-1 han mejorado los resultados de estas dos afecciones. Resulta interesante que en algunos trastornos metabólicos hereditarios se ha descrito una toxicidad directa de mediadores inflamatorios en órganos diana, como el caso de la neurotoxicidad del glutamato que, en la aciduria glutárica de tipo 1, resulta potenciada por TNF- α [16-19].

La situación es menos clara en lo que se refiere al músculo esquelético. A pesar de una clara evidencia clínica de su presencia, ningún trabajo ha investigado el papel que desempeña la inflamación durante el curso de la rabdomiólisis juvenil grave y recurrente, por lo que aún quedan por abordar cuestiones importantes. Los autores de la invención y otros han descrito mutaciones en lipina-1 (LPIN1) como causa de rabdomiólisis grave y recurrente desencadenada por una enfermedad febril o el ejercicio [20-24]. La lipina-1 (fosfatasa 1 de ácido fosfatídico, PAP1, EC 3.1.3.4) desfosforila el ácido fosfatídico (PA, por sus siglas en inglés) a diacilglicerol (DAG), un precursor común para la síntesis de triglicéridos (TAG) y fosfolípidos (FL) [25, 26]. También tiene actividad correguladora transcripcional, la cual, mediante asociación con PPAR α , PGC-1 α , SREBP1 o NFATc4, regula el metabolismo lipídico y la cadena respiratoria mitocondrial [27-30]. Los mioblastos primarios de pacientes presentan una disminución espectacular de la expresión de LPIN1 y de la actividad de PAP1, asociada con una acumulación significativa de gotas lipídicas (GL) [31]. Se ha explicado en parte esta miopatía lipídica por una sobreexpresión de ACACB, el gen que codifica la acetil-CoA carboxilasa beta, una enzima clave en el equilibrio síntesis/oxidación de ácidos grasos, que está asociada

con una disminución de la actividad de carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1) en presencia de condiciones proinflamatorias (TNF- α + IL-1 β) [31]. También los ratones Lpin1^{fl/d/fl/d} presentan una acumulación similar de lípidos en el músculo, descrita recientemente como la consecuencia de un bloqueo en el flujo autofágico y la acumulación de mitocondrias aberrantes [32].

5 Los autores de la invención han demostrado que el mecanismo patogénico de la rabdomiólisis en pacientes con deficiencia de lipina-1 combina el entorpecimiento constitutivo predisponente del metabolismo lipídico y su exacerbación por citocinas proinflamatorias; pero siguen existiendo preguntas cruciales acerca de la existencia de una desregulación en las respuestas inflamatorias y sus mecanismos subyacentes. Según esto, se expresan lipinas en macrófagos humanos y de otras especies [14, 33-35], y se ha sugerido que la lipina-1 es una enzima antiinflamatoria por reprimir actividades de factor nuclear 4 de células T activadas citoplasmáticas, dependientes de calcineurina (NFATc por sus siglas en inglés)-4, [28] y de proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP, por sus siglas en inglés)-1 [36].

15 El sistema inmunitario innato actúa como primera línea de defensa contra patógenos invasores. La inducción de respuestas inmunitarias innatas antivíricas depende de una familia de receptores inmunitarios innatos, los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) que detectan "señales de peligro", activan rutas de señalización e inducen respuestas inflamatorias [37, 38, 39]. Los TLR están presentes en la superficie celular o en compartimentos endosómicos, siendo el TLR9 un ejemplo de este último caso [40]. Es importante destacar que un nuevo mecanismo de transducción de TLR incide directamente sobre la transferencia de Ca²⁺ [41], el paso final responsable de la rabdomiólisis.

20 Se ha descrito recientemente una red lipídica membránica importante para la regulación de la activación de TLR y la señalización por los mismos {Koberlin, 2015 #2452} {Kano, 2011 #2143}. Análogamente, la regulación de proteínas relacionadas con Ras en el cerebro (Rab, del inglés "*Ras-related in brain*"), que controlan estrictamente el sistema inmunitario innato {Jahn, 1999 #2154}, depende de su microambiente lipídico inmediato [43]. Las proteínas Rab regulan el tráfico entre los diferentes compartimentos membranosos subcelulares de las células eucariotas [42].
25 Recientemente se ha implicado a una proteína similar a Rab7 denominada Rab7b, también localizada en endosomas y lisosomas tardíos, y expresada principalmente en células inmunitarias innatas y en el músculo, en el transporte proteico retrógrado [43-45]. Rab7b regula en disminución los TLR9 y TLR4, al regular el transporte desde los endosomas tardíos a la red trans-Golgi {Yao, 2009 #2062; Wang, 2007 #2063; Ge, 2014 #2155; {Bucci, 2010 #2058; Klaver, 2015 #2372}. Se ha descrito recientemente un cometido adicional de Rab7b en el músculo esquelético, para el control de la remodelación de actina [46]. Las composiciones fosfolipídicas de los distintos orgánulos subcelulares difieren entre sí [47], y uno de los rasgos característicos de los endosomas tempranos es, en particular, su alto contenido de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P clase III) [48, 49]. El PI3P ha sido objeto de mucha atención en lo que se refiere a la endocitosis y la transducción de señales a través de endosomas [49-53, 54 {Gillooly, 2003 #2294, 55], especialmente en el músculo esquelético [56]. Sorprendentemente, las fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP, por sus siglas en inglés) desempeñan un cometido en este entorno lipídico, ya que la supresión de la actividad de Pah1, el único homólogo en levadura de la familia de la lipina, ha sido relacionada con la disminución de la PI 3-quinasa Vps34p y de su producto PI3P. Esto origina una reducción de las proteínas Rab, entre ellas Rab Ypt7p, Vps34p y Vps39p, una subunidad del complejo de anclaje HOPS (fusión homotípica y organización de proteínas vacuolares, por sus siglas en inglés), que son necesarias para la actividad de SNARE y la fusión de vacuolas [57]. Zhang *et al.* Han demostrado que el defecto en la actividad PAP de lipina-1 conduce al bloqueo autofágico al reducir la cascada PKD-Vps34 [32] en la rabdomiólisis inducida por estatina en ratones LPIN1^{fl/d/fl/d}.

45 Los autores de la invención han investigado la inmunidad innata en pacientes por lipina-1, y han demostrado una liberación excesiva de mediadores proinflamatorios, lo que se explica por una hipersensibilidad de células inmunitarias y no inmunitarias a ligandos de TLR-9, siendo este último fenómeno resultado de una alteración en el contenido y arquitectura endosómicos de PI3P, y una regulación en disminución de Rab7b, responsable del bloqueo del transporte retrógrado de TLR9. La hiperactividad de TLR9 conduce a un aumento del calcio intracelular, responsable de la lisis del músculo esquelético. Esto ha permitido a los autores de la invención proponer la investigación del flujo del calcio como un método original para estudiar la enfermedad por lipina-1 y los tratamientos adecuados, y que se tengan en consideración a antagonistas o inhibidores de TLR9 y medicamentos anticalcio para prevenir nuevas recaídas en los pacientes.

No existe una descripción previa en la técnica del papel que desempeña TLR9 en la rabdomiólisis, ni del uso de antagonistas de TLR9 e inhibidores de la expresión de TLR9 en el tratamiento de la rabdomiólisis.

Compendio de la invención:

55 Tal como definen las reivindicaciones, la presente invención se refiere a:

- un compuesto seleccionado del grupo consistente en antagonistas de TLR9 e inhibidores de la expresión de TLR9, para su uso en el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita, y

- un método para seleccionar un compuesto candidato para su uso como fármaco para tratar la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende los pasos de:

- 5 o proporcionar un TLR9, proporcionar una célula, muestra de tejido o un organismo no humano que expresa un TLR9,
- o proporcionar un compuesto candidato tal como una molécula orgánica pequeña, un oligonucleótido, un polipéptido, un aptámero o un intra-anticuerpo,
- o medir la actividad de TLR9 y el flujo entrante de calcio,
- o y seleccionar positivamente compuestos candidatos que inhiben la actividad de TLR9 o inhiben el flujo entrante de calcio.

10 **Descripción detallada:**

Los autores de la invención han investigado la presencia de mediadores inflamatorios y el papel que desempeñan en el desencadenamiento de la rabdomiólisis, utilizando muestras de pacientes y testigos en condiciones basales o estimuladas. Los autores de la invención han investigado también las consecuencias de mutaciones *LPIN1* mediante ensayos bioquímicos (actividad enzimática), microscopía confocal y tecnología ImageStream (arquitectura celular/flujo autofágico/actividad de PI3K) y citometría de flujo (vías de señalización). Los autores de la invención también han estudiado la capacidad de diversos estímulos para alterar el flujo de calcio en mioblastos de paciente, una característica típica de la rabdomiólisis.

Se han correlacionado moléculas inflamatorias detectadas en sueros de paciente con la actividad de la enfermedad, y se han relacionado con una hipersensibilidad a ligando de TLR-9. Se ha detectado actividad de IFN-alfa en pacientes con enfermedad activa, una observación que recuerda a las interferonopatías o infecciones víricas. El CpG-A y la inanición, pero no otros agonistas de TLR, indujeron flujo alterado de calcio en mioblastos de paciente, que condujo a la muerte celular. Además, se vieron afectados la señalización y/o el tráfico de TLR-9. Estos hallazgos inesperados estaban asociados con alteraciones en la arquitectura endosómica, muy probablemente debidas a un transporte proteico retrógrado deficiente y/o una actividad de PI3K disminuida y, en consecuencia, a una disminución de la expresión de Rab7b en endosomas. La secreción de IL-6 tras la estimulación por CpG-A resultó suprimida cuando se habían tratado previamente los mioblastos con un oligonucleótido inhibidor (ODN-i) rico en G, lo que confirma la participación directa de TLR9. Los autores de la invención también han demostrado que el tratamiento previo con cloroquina y primaquina es suficiente para suprimir la secreción de IL-6 y la movilización de calcio intracelular en mioblastos de paciente estimulados con CpG-A. Además, la quelación de calcio intracelular mediante el uso de Dantrium sódico inhibió la elevación del calcio intracelular. Los autores de la invención han demostrado que mutaciones *LPIN1* alteran llamativamente la homeostasis del sistema endosómico, lo que conduce a defectos tanto en el flujo autofágico como en el tráfico de TLR-9. Los autores de la invención también han demostrado que en pacientes tratados con antagonista de TLR9 se inducen una reducción del dolor muscular y una disminución dramática de citocinas proinflamatorias (IL-8, RANTES, MCP-1) en sueros.

Por consiguiente, en la presente memoria se describe un compuesto seleccionado del grupo consistente en antagonistas de TLR9 e inhibidores de la expresión de TLR9, para su uso en el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita.

En la presente memoria, el término "sujeto" denota a un mamífero. Normalmente, un sujeto conforme a la presente descripción se refiere a cualquier sujeto (preferiblemente humano) que padece rabdomiólisis o es susceptible de padecerla. En particular, el término "sujeto" se refiere a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, formas juveniles de rabdomiólisis grave y recurrente.

En particular, el término "sujeto" se refiere a un sujeto que padece, o es susceptible de padecer, formas juveniles de rabdomiólisis grave y recurrente relacionadas con lipina-1.

En la presente memoria, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren tanto al tratamiento profiláctico como al preventivo, así como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluido el tratamiento de sujetos en riesgo de contraer la enfermedad o sospechosos de haber contraído la enfermedad, así como de sujetos que están enfermos o se les ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recaída clínica. Se puede administrar el tratamiento a un sujeto que padece un trastorno médico o que en último término puede contraer el trastorno, con el fin de prevenirlo, curarlo, retrasar su aparición, reducir su gravedad o mejorar uno o varios síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o bien para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Se entiende por "régimen terapéutico" el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo el patrón de administración utilizado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. Las expresiones "régimen de inducción" o "período de inducción" se refieren a un régimen terapéutico (o una parte de un régimen terapéutico) que se utiliza para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un nivel elevado de fármaco a un sujeto durante el período inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o por entero) un "régimen de carga", que puede incluir la administración de una dosis del medicamento mayor que la que un médico emplearía durante un régimen de mantenimiento, la administración de un medicamento con frecuencia mayor que aquella con la que un médico

administraría el medicamento durante un régimen de mantenimiento, o ambas cosas. Las expresiones "régimen de mantenimiento" o "período de mantenimiento" se refieren a un régimen terapéutico (o una parte de un régimen terapéutico) que se utiliza para mantener a un sujeto durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo para mantener en remisión al sujeto durante largos períodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ejemplo administrar un medicamento a intervalos regulares, por ejemplo semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en caso de recaída o tratamiento tras haber alcanzado un criterio predeterminado particular [por ejemplo, manifestación de la enfermedad, etc.]).

En la presente memoria, el término "rabdomiólisis" tiene su significado general en la técnica, y se refiere a la rabdomiólisis tal como está descrita en las clasificaciones M62.8, T79.5 y T79.6 de la Organización Mundial de la Salud. El término "rabdomiólisis" se refiere a una afección médica compleja que implica una rápida disolución de músculo esquelético dañado o lesionado. Esta disrupción de la integridad del músculo esquelético conduce a la liberación directa de componentes musculares intracelulares, entre ellos mioglobina, creatina cinasa (CK, por sus siglas en inglés), aldolasa y lactato deshidrogenasa, así como electrolitos, al torrente sanguíneo y al espacio extracelular. La rabdomiólisis varía desde una enfermedad asintomática con elevación de los niveles de CK hasta una afección potencialmente mortal asociada con aumentos extremos de CK, desequilibrios de electrolitos, insuficiencia renal aguda (IRA) y coagulación intravascular diseminada. Aunque la rabdomiólisis es originada muy frecuentemente por una lesión traumática directa, la afección también puede ser consecuencia de fármacos, toxinas, infecciones, isquemia muscular, trastornos de electrolitos y metabólicos, trastornos genéticos tales como mutaciones de lipina-1, esfuerzo o reposo prolongado en cama y estados inducidos por temperatura, tales como el síndrome neuroléptico maligno (SNM) y la hipertermia maligna (HM). Una necrosis masiva, que se manifiesta como debilidad de las extremidades, mialgia, hinchazón y comúnmente pigmenturia macroscópica sin hematuria, es el denominador común tanto de la rabdomiólisis traumática como de la no traumática (Torres *et al.*, 2015; Zimmerman y Shen, 2013; Zutt *et al.*, 2014). El término "rabdomiólisis" también se refiere a formas juveniles de rabdomiólisis grave y recurrente, que son trastornos hereditarios caracterizados por la presencia de mioglobinuria, altos niveles séricos de creatinina cinasa y lesión renal aguda [1, 2]. El término "rabdomiólisis" también se refiere a la rabdomiólisis relacionada con lipina-1 y a formas juveniles de rabdomiólisis grave y recurrente relacionadas con lipina-1 causadas por mutaciones *LPIN1*.

En la presente memoria, el término "TLR9" tiene su significado general en la técnica, y se refiere al receptor tipo Toll 9, un miembro de una familia de receptores inmunitarios innatos, los TLR, que detectan "señales de peligro", activan vías de señalización e inducen respuestas inflamatorias [37, 38, 39]. Los TLR están presentes en la superficie celular o en compartimentos endosómicos, siendo esto último el caso del TLR9 [40]. El término "TLR9" también se refiere a CD289 (por "Cluster of Differentiation" (grupo de diferenciación) 289).

La expresión "antagonista de TLR9" se refiere a un compuesto que bloquea o inactiva TLR9 selectivamente. En la presente memoria, la expresión "bloquea o inactiva selectivamente" se refiere a un compuesto que preferiblemente se une a TLR9 y lo bloquea o inactiva con una afinidad y potencia, respectivamente, mayores que su interacción con los otros subtipos o isoformas de la familia TLR (tales como TLR3, TLR7 y TLR8). Se contemplan compuestos que prefieren TLR9, pero que también pueden bloquear o inactivar otros subtipos de TLR, tales como antagonistas parciales o totales. La expresión "antagonista de TLR9" se refiere a cualquier compuesto que puede bloquear directa o indirectamente la cascada de transducción de señal relacionada con el TLR9. El "antagonista de TLR9" también puede estar constituido por compuestos que inhiben la unión del ligando de TLR9 oligonucleótido de CpG (oligonucleótido de citidina-fosfato-guanosina) a TLR9, tales como compuestos que tienen la capacidad de unirse al oligonucleótido de CpG con alta afinidad y especificidad o compuestos que compiten con el oligonucleótido de CpG. La expresión "antagonista de TLR9" también se refiere a la inhibición de la activación endosómica de TLR9, ya sea por inhibición de la acidificación endosómica, evitando así la maduración proteolítica de los TLR endosómicos, o por intercalación en ligandos de ácido nucleico, evitando así su unión a los TLR. Normalmente, un antagonista de TLR9 es una molécula orgánica pequeña, un oligonucleótido, un polipéptido, un aptámero o un intra-anticuerpo.

Los expertos en la materia conocen bien pruebas y ensayos para determinar si un compuesto es un antagonista de TLR9, tal como se describe en Hoque *et al.*, 2013; Matin *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kader *et al.*, 2013; David *et al.*, 2013; Kandimalla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; y los documentos US 7.498.409; WO 2005/007672; WO 2011/009015; WO 2012/022948; WO 2009/023819; WO 2011/041311; WO 2011/159958 y CN101712957.

Los antagonistas de TLR9 son bien conocidos en la técnica, como lo ilustran Hoque *et al.*, 2013; Matin *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kader *et al.*, 2013; David *et al.*, 2013; Kandimalla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; y los documentos US 7.498.409; WO 2005/007672; WO 2011/009015; WO 2012/022948; WO 2009/023819; WO 2011/041311; WO 2011/159958 y CN101712957.

En particular, el antagonista de TLR9 es un oligonucleótido de tipo CPG-ODNi (oligonucleótido inhibidor con citidina-fosfato-guanosina), tal como CpG-ODN 2088; CpG-ODN c41; IMO3100; IRS954 (DV1079); ALX-746-351; un antagonista oligodesoxinucleótido de fosforotioato monocatenario tal como DV056 y oligonucleótidos descritos en Matin *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kader *et al.*, 2013; David *et al.*, 2013; Kandimalla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011;

Wang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; y los documentos WO 2012/022948; WO 2009/023819; WO 2011/041311; WO 2011/159958; CN101712957.

En particular, el antagonista de TLR9 es un compuesto, tal como (-)-morfina y derivados de (+)-morfina tales como COV08-0064; COV08-0093; polímeros de unión a ácido nucleico y otros agentes de unión a ácido nucleico, entre ellos antimaláricos tales como cloroquina, primaquina e imidazoquinolinas; 4-aminoquinolinas; quinazolinas; CMZ 203-84; CMZ 203-85; CMZ 203-88; CMZ 203-88-1; CMZ 203-89; CMZ 203-91; aminoquinolinas tales como hidroxiclороquina y sulfato de hidroxiclороquina (Plaquenil); quinacrina; bafilomicina A; CPG52364 y compuestos descritos, por ejemplo, en Hoque *et al.*, 2013; y los documentos WO 2005/007672; WO 2011/009015; WO 2012/022948; WO 2011/041311.

En particular, el antagonista de TLR9 descrito en la presente memoria es un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Se pueden aislar estos ligandos mediante la aplicación de SELEX ("Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment" o Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) a una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En dicha biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, con una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisadas en Jayasena S. D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo restringida conformacionalmente y presentada por una proteína de plataforma, tal como la tiorredoxina A de *E. coli*, que se selecciona de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas *et al.*, 1996). Entonces, después de generar aptámeros dirigidos contra TLR9 como se ha descrito en lo que antecede, el experto en la materia puede seleccionar fácilmente aquellos que inhiben TLR9.

En particular, el compuesto descrito en la presente memoria es un inhibidor de la expresión de TLR9.

Cuando se usa en el contexto de la expresión de un gen o ácido nucleico, el término "expresión" se refiere a la conversión de la información contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o bien una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN mensajeros que son modificados mediante procesos tales como encapsulado, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas (por ejemplo, TLR9) modificadas, por ejemplo, mediante metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación.

Un "inhibidor de expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene el efecto biológico de inhibir la expresión de un gen.

Los inhibidores de la expresión de TLR9 para su uso en la presente descripción pueden estar basados en construcciones oligonucleotídicas antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, entre ellos las moléculas de ARN antisentido y las moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del ARNm de TLR9 al unirse al mismo y evitar así la traducción proteica o aumentar la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de proteínas TLR9, y por tanto su actividad, en una célula. Por ejemplo, mediante técnicas convencionales de fosfodiéster se pueden sintetizar oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases, complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcripción de ARNm que codifica TLR9, por ejemplo, y administrarlos mediante inyección intravenosa o infusión, por ejemplo. Los métodos para utilizar técnicas antisentido para aliviar específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia es conocida son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321 y 5.981.732).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de TLR9 para su uso en la presente descripción. Se puede reducir la expresión génica de TLR9 poniendo en contacto el sujeto o la célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbp), o un vector o constructo que provoque la producción de un ARN bicatenario pequeño, de modo que la expresión de TLR9 quede específicamente inhibida (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para seleccionar un ARNbp o vector codificante de ARNbp, adecuado, son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S.M. *et al.* (2001); Hannon, G J. (2002); McManus, M.T. *et al.* (2002); Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002); las patentes de EE. UU. n.ºs 6.573.099 y 6.506.559; y las publicaciones de patente internacional n.ºs WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de TLR9 para su uso en la presente descripción. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia, de la molécula de ribozima, con el ARN diana complementario, seguida de escisión endonucleolítica. Por tanto, las moléculas de ribozima con motivo de horquilla o de cabeza de martillo modificadas mediante ingeniería, que catalizan de manera específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de TLR9 son útiles dentro del alcance de la

presente descripción. Los sitios específicos de escisión por ribozima dentro de cualquier diana de ARN potencial se identifican inicialmente escaneando la molécula diana en busca de sitios de escisión por ribozima, que normalmente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificados, se pueden evaluar secuencias cortas de ARN de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión, en cuanto a las características estructurales predichas, tales como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia oligonucleotídica sea inadecuada. También se puede evaluar la idoneidad de las dianas candidatas analizando su capacidad de hibridación con oligonucleótidos complementarios, mediante el uso de, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión de TLR9 se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas de síntesis química tales como, por ejemplo, la síntesis química mediante fosforamida en fase sólida. Como alternativa, se pueden generar moléculas de ARN antisentido mediante la transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifiquen la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporen promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones a los oligonucleótidos descritos en la presente memoria, como medio de aumentar la estabilidad intracelular y el período de semivida. Las modificaciones posibles incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de uniones fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de uniones fosfodiesterasa dentro del esqueleto principal del oligonucleótido.

Los ARNip oligonucleotídicos antisentido y ribozimas descritos en la presente memoria pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ARNip oligonucleotídico antisentido o del ácido nucleico ribozímico a las células, y preferiblemente a células que expresan TLR9. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida en relación con el grado de degradación que se produciría en ausencia del vector. En general, los vectores descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que han sido manipulados mediante la inserción o incorporación del ARNip oligonucleotídico antisentido o las secuencias de ácido nucleico de ribozimas. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus del tipo virus símico (SV) 40; poliomavirus; virus del herpes; virus del papiloma; virus de vaccinia; poliovirus; y virus de ARN tales como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que genes no esenciales han sido reemplazados por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico en el ADN, con posterior integración pro-vírica en el ADN celular anfitrión. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus con deficiencia de replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de producir una partícula infecciosa). Estos vectores retrovíricos de expresión, alterados genéticamente, tienen utilidad general para la transducción de genes *in vivo* con alta eficiencia. En KRIEGLER (A Laboratory Manual, W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1990) y en MURRY ("Methods in Molecular Biology", vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991) se ofrecen protocolos estándar para producir retrovirus con deficiencia de replicación (con inclusión de los pasos de incorporación de material genético exógeno a un plásmido, transfección, con plásmido, de una línea celular de empaquetamiento, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recolección de partículas víricas desde medios de cultivo de tejido e infección de las células diana con partículas víricas).

Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adenoasociados (VAA), que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. Los VAA pueden diseñarse mediante ingeniería para que sean deficientes en la replicación y capaces de infectar una amplia gama de tipos celulares y especies. Presentan además ventajas tales como estabilidad frente al calor y los solventes de lípidos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, entre ellas las células hematopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Según se ha descrito, los VAA pueden integrarse en el ADN celular humano de una manera específica para el sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retrovírica. Además, se ha realizado el seguimiento de infecciones con AAV de tipo silvestre en cultivo de tejido durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica de los VAA es un suceso relativamente estable. Los VAA también pueden funcionar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. En la técnica se han descrito ampliamente vectores plasmídicos, y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, SANBROOK *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años se han utilizado vectores plasmídicos como vacunas de ADN para introducir *in vivo* en células genes que codifican antígeno. Resultan particularmente ventajosos de ello porque no presentan los mismos problemas de seguridad

que muchos de los vectores víricos. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula anfitrión, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso común incluyen pUC18, pUC19, pRC/CMV y pBlueScript. Los expertos ordinarios en la materia conocen bien otros plásmidos. Además, se pueden diseñar a medida plásmidos utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligadura para eliminar y añadir fragmentos de ADN específicos. Los plásmidos pueden ser administrados a través de diversas vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, se puede inyectar el plásmido de ADN por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También se puede administrar mediante aerosoles intranasales o gotas, supositorios rectales y por vía oral. También se puede administrar en la epidermis o en una superficie mucosa usando un cañón génico. Se pueden administrar plásmidos en una solución acuosa, secados sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN, entre ellos, pero sin limitación, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

Normalmente, los compuestos descritos en lo que antecede se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto descrito en lo que antecede se entiende una cantidad del compuesto suficiente para tratar la rabdomiólisis con una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria será decidido por el médico tratante dentro del alcance de un criterio médico fundado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de diversos factores, entre ellos el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentemente con el compuesto específico empleado; y factores análogos bien conocidos en las ciencias médicas. Por ejemplo, está dentro de la pericia de la técnica comenzar la administración del compuesto con dosis inferiores a las requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado, y aumentar gradualmente la dosis hasta que se consiga el efecto deseado. No obstante, la dosis diaria de los productos puede variar dentro de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg al día, para un adulto. Normalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del compuesto descrito en la presente memoria, para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto que está siendo tratado. Un medicamento contiene normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto descrito en la presente memoria, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del compuesto descrito en la presente memoria. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosis desde 0,0002 mg/kg de peso corporal y día hasta aproximadamente 20 mg/kg, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal y día hasta 7 mg/kg.

En particular, el compuesto descrito en la presente memoria puede ser utilizado en una concentración entre 0,01 μM y 20 μM , en particular, el compuesto descrito en la presente memoria puede ser utilizado en una concentración de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 μM .

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere al compuesto descrito en la presente memoria en combinación con uno o varios compuestos anti-rabdomiólisis, para su uso en el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita.

La expresión "compuestos anti-rabdomiólisis" tiene su significado general en la técnica, y se refiere a compuestos utilizados en la terapia de la rabdomiólisis, tales como compuestos utilizados para preservar la función renal y restaurar los trastornos metabólicos, tales como fluido intravenoso (FIV), solución salina isotónica, solución de Ringer con lactato, diuréticos, bicarbonato, manitol, corticosteroides, acetazolamida, antioxidantes, paracetamol y L-carnitina. La terapia de la rabdomiólisis también está relacionada con la hemodiálisis, alcalinización de la orina y la terapia de reemplazo renal continuo (TRRC) (Zimmerman y Shen, 2013; Zutt *et al.*, 2014). La expresión "compuestos anti-rabdomiólisis" también se refiere a fármacos y compuestos anticalcio que inhiben el flujo entrante de calcio al citoplasma, tales como Dantrium (dantroleno), bromocriptina, fenitoína, bepridilo, bloqueantes de canal de calcio tales como agentes dihidropiridínicos tales como nifedipino (ADALATE), amlodipino (AMLOR), felodipino (FLODIL), isradipino (ICAZ), lacidipino (CALDINE), nicardipino (LOXEN), nitrendipino (BAYPRESS) y nimodipino (NIMOTOPE); y agentes no dihidropiridínicos tales como verapamilo (clase de las fenilalquilaminas) y diltiazem (clase de las benzotiazepinas).

Conforme a la presente descripción, el compuesto descrito en la presente memoria se administra de manera secuencial o concomitante con uno o varios compuestos anti-rabdomiólisis.

La presente descripción se refiere también a un método para tratar la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita, que comprende el paso de administrar a dicho sujeto el compuesto descrito en la presente memoria.

En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método para seleccionar un compuesto candidato para su uso como fármaco para tratar la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende los pasos de:

- proporcionar un TLR9, proporcionar una célula, muestra de tejido o un organismo no humano que expresa un TLR9,
- proporcionar un compuesto candidato tal como una molécula orgánica pequeña, un oligonucleótido, un polipéptido, un aptámero o un intra-anticuerpo,
- 5 - medir la actividad de TLR9 y el flujo entrante de calcio,
- seleccionar positivamente compuestos candidatos que inhiben la actividad de TLR9 o inhiben el flujo entrante de calcio.

10 Son bien conocidos en la técnica métodos para medir la actividad de TLR9. Por ejemplo, medir la actividad de TLR9 implica determinar una Ki para el TLR9 clonado y transfectado de manera estable en una línea celular CHO, medir uno o varios de los segundos mensajeros del TLR9 (MyD88, IRAK, TRAF6 y TAK1), medir mediadores inflamatorios de TLR9 tales como NF- κ B, IL-6 y genes estimulados por interferón tales como IF27 y SIGLEC-1, y utilizar la línea celular de TLR9 HEK-Blue que expresa una fosfatasa alcalina placentaria secretada (SEAP, por sus siglas en inglés) que responde a TLR9, inducible por NF- κ B, medir el flujo de calcio intracelular en presencia o en ausencia del compuesto candidato (Hoque *et al.*, 2013; Matin *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kader *et al.*, 2013; David *et al.*, 2013; Kandimalla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; y documentos US 7.498.409; WO 2005/007672; WO 2011/009015; WO 2012/022948; WO 2009/023819; WO 2011/041311; WO 2011/159958; CN101712957).

20 Son bien conocidos en la técnica pruebas y ensayos para seleccionar y determinar si un compuesto candidato es un antagonista de TLR9 (Hoque *et al.*, 2013; Matin *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kader *et al.*, 2013; David *et al.*, 2013; Kandimalla *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013; y documentos US 7.498.409; WO 2005/007672; WO 2011/009015; WO 2012/022948; WO 2009/023819; WO 2011/041311; WO 2011/159958; CN101712957). Se pueden emplear ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la potencia y la selectividad de los compuestos candidatos para inhibir la actividad de TLR9.

25 Las actividades de los compuestos candidatos, su capacidad para unirse a TLR9 y su capacidad para inhibir la actividad de TLR9 se pueden ensayar utilizando células B aisladas, monocitos, células asesinas naturales (en inglés, "natural killer" o NK), células dendríticas plasmacitoides (CDp), mioblastos o células HEK293 que expresan TLR9, línea celular CHO clonada y transfectada de manera estable con el TLR9 humano.

30 Las actividades de los compuestos candidatos y su capacidad para unirse a TLR9 se pueden evaluar mediante la determinación de una Ki para el TLR9 clonado y transfectado de manera estable en una línea celular CHO, la medición de uno o varios de los segundos mensajeros de TLR9 (MyD88, IRAK, TRAF6 y TAK1), la medición de mediadores inflamatorios de TLR9 tales como NF- κ B, IL-6 y genes estimulados por interferón tales como IF27 y SIGLEC-1, y el uso de la línea celular de TLR9 HEK-Blue que expresa una fosfatasa alcalina placentaria secretada (SEAP) que responde a TLR9, inducible por NF- κ B, en presencia o en ausencia del compuesto candidato. La capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la actividad de TLR9 se puede evaluar midiendo indicadores tales como el producto génico endógeno cuya expresión es inducida por NF- κ B, tal como una citocina que incluye IL-12, IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-6 y otras citocinas inflamatorias, y midiendo la disminución del flujo de calcio intracelular.

Se pueden emplear células que expresan otro TLR distinto de TLR9 para evaluar la selectividad de los compuestos candidatos.

40 Los métodos para medir el flujo entrante de calcio son bien conocidos en la técnica (Guo *et al.*, Endocrinology. 2010; 151(8):3502-13). Las pruebas y ensayos para seleccionar y determinar si un compuesto candidato es un fármaco anticalcio o un compuesto que inhibe la entrada de calcio en el citoplasma se puede realizar mediante un ensayo de cuantificación de calcio, tal como el ensayo Fluo-4, como se describe en el ejemplo.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden usar o preparar en una composición farmacéutica.

45 En particular, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita.

Normalmente, se puede combinar el compuesto descrito en la presente memoria con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

50 El término "farmacéuticamente" o la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción desfavorable cuando son administradas a un mamífero, especialmente un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido, no tóxico, de cualquier tipo.

55 En las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma unitaria de administración, como mezcla con soportes

5 farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas unitarias de administración adecuadas comprenden formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal, y formas de administración rectal.

10 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación apta para ser inyectada. Estos pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o de disodio, cloruro de sodio, de calcio o de magnesio y similares, o mezclas de sales de este tipo) o composiciones secas, en especial liofilizadas, que tras la adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

15 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en un grado que permita una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y de almacenamiento, y debe estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

20 Las soluciones que comprenden compuestos descritos en la presente memoria como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y de uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

25 El compuesto descrito en la presente memoria se puede formular en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales por adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También se pueden obtener sales formadas con los grupos carboxilo libres, a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

30 El vehículo también puede ser un disolvente o medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluencia adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como la lecitina, mediante la conservación del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el empleo de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos, en la cantidad requerida, al disolvente apropiado junto con varios de los demás ingredientes enumerados más arriba, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, dentro de los enumerados más arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado, a partir de una solución de esto, previamente sometida a filtración esterilizante.

40 Una vez formuladas, se administrarán las soluciones de un modo compatible con la formulación farmacéutica, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, por ejemplo del tipo de las soluciones inyectables descritas más arriba, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

45 50 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar tamponada adecuadamente en caso necesario, y primeramente se ha de hacer isotónico el diluyente líquido, con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción. Necesariamente se producirán algunas variaciones en la dosis, dependiendo del estado del sujeto a tratar. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis adecuada para un sujeto particular.

Además de los compuestos descritos en la presente memoria formulados para la administración parenteral, tal como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo,

comprimidos u otros sólidos para la administración por vía oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

5 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden incluir cualquier compuesto adicional que se emplee en el tratamiento de la rabdomiólisis. Por ejemplo, la terapia anti-rabdomiólisis puede incluir compuestos que se utilizan para preservar la función renal y restaurar los trastornos metabólicos, tales como fluido intravenoso (FIV), solución salina isotónica, solución de Ringer con lactato, diuréticos, bicarbonato, manitol, corticosteroides, acetazolamida, antioxidantes, paracetamol y L-carnitina; y fármacos y compuestos anticalcio que inhiben el flujo entrante de calcio al citoplasma.

10 En particular, dichos compuestos activos adicionales pueden estar contenidos en la misma composición, o bien se pueden administrar por separado.

En particular, la composición farmacéutica descrita en la presente memoria se refiere a la preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita.

La presente descripción también proporciona kits que comprenden el compuesto descrito en la presente memoria. Los kits que contienen el compuesto descrito en la presente memoria tienen utilidad en métodos terapéuticos.

15 Se ilustrará adicionalmente la presente descripción mediante las figuras y ejemplos que siguen. No obstante, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente descripción.

Figuras:

Figura 1: La presencia de inflamación en pacientes por lipina-1 se correlaciona con la actividad de la enfermedad, e interviene en ella la hiperactivación de TLR9.

20 A. B. La presencia de moléculas inflamatorias en sueros está asociada con la enfermedad activa. C. La inflamación está asociada con hipersensibilidad de células de paciente (células dendríticas (CD) y macrófagos) a ligandos de TLR9 sintéticos. D. La hipersensibilidad frente a agonistas de TLR9 conduce a una rápida maduración de CD. E. La hipersensibilidad frente a agonistas de TLR9 conduce a la activación de la señalización IFN de tipo I en los
25 pacientes. F. La inflamación está asociada con hipersensibilidad de células de paciente (mioblastos) a ligandos de TLR9 sintéticos. G. El tratamiento previo con los antagonistas o inhibidores de TLR9 cloroquina y primaquina es suficiente para suprimir la secreción de IL-6 en mioblastos estimulados con CpG-A

Figura 2: Deficiente actividad de PAP1 en CD de pacientes.

Figura 3: El tratamiento con hidroxicloroquina (Plaquenil®, 6 mg/kg/día) induce una disminución espectacular de citocinas proinflamatorias (IL-8, RANTES, MCP-1) en sueros de paciente.

30 **Ejemplos:**

Ejemplo 1:

Material y métodos

Pacientes

35 Se realizaron experimentos en suero y células dendríticas (CD) y macrófagos de 9 pacientes portadores de dos mutaciones heredadas recesivamente en el gen LPIN1 y 20 testigos sanos de edad y sexo equiparables. Todos los pacientes habían presentado al menos un episodio de rabdomiólisis grave [21, 22]. Se obtuvieron del banco de células del Hospital Cochin mioblastos de 4 testigos de edad y sexo equiparables. Este trabajo fue aprobado por el Comité ético institucional con responsabilidad sobre los autores, tras declaración al Departamento de investigación clínica y del desarrollo, y se obtuvo el consentimiento informado de los padres.

40 Biopsias musculares y mioblastos humanos primarios

Se aislaron mioblastos primarios humanos y se cultivaron como se describe. Se aislaron mioblastos CD56+ mediante separación celular por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC (de Biosciences) y se mantuvieron rutinariamente en medio F10 suplementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 20%.

45 Generación de CD derivadas de monocitos

50 Se purificaron monocitos utilizando perlas inmunomagnéticas CD14 (Miltenyi Biotec, París, Francia) procedentes de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los 9 pacientes y de los individuos testigo, de la manera que se describe. Se cultivaron monocitos durante 7 días en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FBS inactivado por calor, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (todos de Invitrogen Corporation, París, Francia), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés, Miltenyi Biotec) 50 ng/mL e

interleucina (IL)-4 (Miltenyi Biotec) 100 ng/mL para generar células dendríticas inmaduras tal como se describe. Se cosecharon las CD inmaduras y se transfirieron (10^6 células/pocillo) a placas de 96 pocillos y se incubaron con lipopolisacárido LPS (500 ng/mL), flagelina (10 ng/mL), zimosano (1 μ g/mL), CpG (5 μ M), imiquimod (0,5 μ g/mL), poli(I:C) (1 μ g/mL) o Pam3CSK4 (100 ng/mL), todos de Invivogen (Toulouse, Francia), durante 12 horas.

5 Ensayo de citocinas

Después de 12 horas de estimulación de CD mediante TLR a 37 °C en aire humidificado que contenía 5% de CO₂, se midieron en los sobrenadantes de cultivo las concentraciones de IL-8 humana, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α , IL-1 β , IL-10, IL-4, proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), RANTES (factor regulado por activación, expresado y secretado por células T normales, por sus siglas en inglés) y proteínas inflamatorias de macrófago (MIP)-1- α y β , con un kit para ensayo de citometría con perlas (CBA, por sus siglas en inglés) de citocina humana (BD Biosciences, San José, California) conforme a las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se mezclaron 50 μ L de sobrenadante con 50 μ L de perlas de captura mixtas, y se generó una curva estándar. Después de 3 horas de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las muestras y se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y luego se analizaron mediante citometría de flujo (ARIA II; BD Biosciences) con el *software* de análisis CBA (FCAP Array versión 3.0; Soft Flow, St. Louis Park, Minnesota). Los resultados se expresan en picogramos por mililitro.

Análisis de expresión génica

Se aisló el ARN total de células CMSP, CD y mioblastos utilizando el minikit RNeasy, y se preparó el ADNc utilizando el kit de transcripción inversa Quantitect después de agotar el ADN genómico. Se evaluó mediante RCPc-TR (reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real), utilizando ensayos de expresión génica Taqman, la expresión de un conjunto de 6 genes estimulados por interferón (ISG, por sus siglas en inglés) en células CMSP, CD y mioblastos, y se normalizó frente a GAPDH. Los cebadores y sondas utilizados fueron los siguientes: IFI27 - Hs01086370_m1, IFI44LHs00199115_m1, IFIT1 - Hs01675197_m1, RSAD2 - Hs00369813_m1, SIGLEC1 - Hs00988063_m1, ISG15 - Hs01921425_s1, GAPDH - Hs03929097_g1 marcado con colorante FAM y amplificado en una mezcla de reacción universal. Para los genes regulados que no eran del tipo I, los cebadores y sondas utilizados fueron los siguientes: CXCL9 Hs00171065_m1, IL-12A Hs01073447_m1 e IL-6 Hs00985639_m1. La RCP cuantitativa en tiempo real se realizó por duplicado utilizando el sistema Light Cycler VIIA7 (Roche). El valor RQ es igual a $2^{\Delta\Delta ct}$, donde $\Delta\Delta ct$ se calcula mediante la fórmula: (CT objetivo - CTGAPDH) de la muestra de prueba - (CT objetivo - CTGAPDH) de la muestra calibradora. Cada valor se obtiene de tres réplicas técnicas.

30 Inmunotransferencia de tipo Western

Se lisaron CD y mioblastos en 100 μ L de tampón de muestra (SDS al 2%, glicerol al 10%, Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, azul de bromofenol al 0,025%, DTT 0,05 M). Se resolvieron los lisados de proteínas celulares en geles SDS-PAGE al 4%-20% (Biorad), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) y se bloqueó la membrana con leche desnatada al 5%. Se realizó inmunotransferencia de proteínas con anti-lipina-1 monoclonal (RD, AF3885), anti-LC3 (clon: 51-11) (MBL, M115-3) anti-p62 (β), y se utilizaron anti-Rab7b como anticuerpo primario, β -actina (AC-15) (Santa Cruz Biotechnology, sc-69879) como control de carga e IgG anti-ratón, de cabra, Alexa Fluor 680 (A21057, Invitrogen) como anticuerpo secundario. Las membranas fueron escaneadas mediante un Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences).

Actividad de fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP)

Se midió la actividad de PAP a 37°C, durante 20 minutos, como se ha descrito anteriormente. Se midió la actividad total de PAP en presencia de MgCl₂ 1 mM. Se midió la actividad de PAP2 (independiente de Mg²⁺) en las mismas condiciones, salvo que se había quelado el MgCl₂ mediante EDTA 2 mM. La actividad de PAP1 dependiente de Mg²⁺ se calculó restando la actividad de PAP2 de la actividad enzimática total. Una unidad de actividad PAP se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto/minuto. La actividad específica se define como unidades por miligramo de proteína.

Microscopía de fluorescencia

Se realizó análisis celular mediante microscopía de fluorescencia sobre CD y mioblastos extendidos en placas sobre distintos soportes, entre ellos cubreobjetos revestidos con fibronectina, portaobjetos con microplantilla para el análisis de células uniformes. Se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron como se ha descrito más arriba. Se extendieron CD en el día 7 sobre cubreobjetos de 12 mm revestidos con fibronectina, durante 3 horas en medio completo, a 37°C. Se fijaron las células en PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron en saponina al 0,2%/BSA al 0,2% en PBS, se inactivaron en glicina 0,2 M, pH 7, y se incubaron con anticuerpos. Cuando correspondía, se extendieron en placas las células sobre portaobjetos con microplantilla y se incubaron a 37°C para permitir la polarización. Se tomaron imágenes con un objetivo de inmersión en aceite Leica SP8 40X. Las imágenes fueron analizadas utilizando los programas de *software* ImageJ e Imaris.

Movilización del calcio

Se midió la movilización intracelular del calcio en mioblastos utilizando el ensayo Fluo-4 de Invitrogen conforme a las instrucciones del fabricante y tal como se ha definido más arriba. Se cargaron las células con Fluo-4 1 μ M durante 30 minutos, a 37°C, en 5% de CO₂/95% de O₂, como se ha descrito anteriormente (ref.). Después se transfirieron las placas a una pletina con temperatura controlada (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE. UU.) en un microscopio invertido Olympus IX-70. Se visualizaron los cultivos utilizando un objetivo de inmersión en agua, de fluorita, con apertura numérica 40 × 0,7 (TC-SP8 Leica).

Antagonistas o inhibidores de TLR9

Para confirmar la participación directa de TLR9, se estimularon mioblastos con CpG-A (ligando de TLR9) en presencia del oligonucleótido inhibidor (ODN-i) rico en G o tras tratamiento previo con cloroquina o el respectivo testigo de disolvente.

Ensayo de actividad Vps34 y producción de PtdIns3P

Se detectó la actividad Vps34 mediante la visualización de la producción de PtdIns3P en mioblastos y CD. Se sembraron respectivamente mioblastos y CD en cubreobjetos de vidrio o revestidos con fibronectina. Transcurridas 24 horas se transfectaron las células con pEGFP-2xFYVE, utilizando reactivo jetPrime (Polyplus). 16 horas más tarde se fijaron en PFA los cubreobjetos y se sometieron a tratamiento para inmunofluorescencia con el fin de detectar la sonda GFP-2xFYVE, y a tratamiento con anticuerpo anti-LAMP1 para detectar los compartimentos endosómicos y lisosómicos tardíos.

Análisis de autofagia

Se tiñeron mioblastos con anticuerpo anti-LC3 y finalmente se suspendieron en 50 μ L de tampón (PBS fría con FCS al 1% y azida de sodio al 0,05%) en tubos de microcentrifuga de 0,6 mL. Antes de hacer pasar las muestras, se calibró el Image Stream utilizando perlas de velocidad. Las muestras se analizaron en el orden de primeramente testigos de fluorescencia sin marcar, de un solo color (sin colorante de ADN), y finalmente las muestras experimentales. Para cada muestra se registraron al menos 10.000 células en las muestras experimentales y 2.000 células en los testigos de un solo color. Se apagó el campo brillante durante el registro de los testigos de un solo color. Los archivos de datos se guardaron como archivos .rif (archivos sin procesar). Los archivos .rif generados a partir de INSPIRE se analizaron con el *software* IDEAS 4.0.735. Se utilizaron archivos de testigo de un solo color para crear archivos compensados (.cif), seguidos de la generación de archivos de datos (.daf). Para obtener células individuales, se delimitaron los dobletes o acúmulos de células y restos, para eliminarlos, utilizando la característica de área en campo brillante frente a relación de aspecto. A continuación se acotaron de estas células individuales las células enfocadas, basándose en la característica de raíz de la media cuadrática del gradiente (GRMS, por sus siglas en inglés) en campo brillante (GRMS >300). Después se representaron gráficamente estos subconjuntos frente a las intensidades logarítmicas del canal con LC3 (marcador de autofagosoma) y Lyso-ID o Lamp1 (marcador lisosómico), y se acotaron en poblaciones LC3+Lyso+ (positivos dobles que, en algunas poblaciones celulares se dividieron adicionalmente en LC3^{alto}Lyso^{alto} y LC3^{medio}Lyso^{medio}), LC3^{alto}Lyso^{bajo} (más positivas para LC3), LC3^{bajo}Lyso^{alto} (más positivas para el marcador lisosómico) y LC3^{bajo}Lyso^{bajo} (bajas tanto para LC3 como para lisosomas). Los niveles de autofagia se calcularon midiendo el % de colocación en positivos dobles de las células totales, representando gráficamente estos LC3^{alto}Lyso^{alto} (positivos dobles) en cuanto a similitud de detalles brillantes (BDS, por sus siglas en inglés) entre marcadores LC3 y lisosomales, frente a la frecuencia normalizada de células. La BDS de positivos dobles originó principalmente histogramas bimodales, y la delimitación se basó en el pico más brillante (BDS^{alto}, principalmente por encima de 1,5 o 2). Después se convirtieron en una característica estas máscaras de puntos y se utilizaron para representaciones gráficas frente a la frecuencia normalizada de células.

Medición de ATP

Se determinaron los niveles de ATP con el kit de ensayo de bioluminiscencia HSII (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EE. UU.) conforme a las instrucciones del fabricante. Se lavaron en PBS tibia células sembradas por triplicado. Se combinaron con luciferasa los lisados y mediante un luminómetro con formato de microplaca se cuantificó la emisión de luz resultante. También se cuantificaron las proteínas utilizando el kit Bradford (Sigma) y se corrigieron los valores de luminiscencia con relación al nivel de proteína.

Absorción de CTxB

Se lavaron brevemente con PBS las células y se trataron mediante pulsos con Alexa 594-CTxB 1 μ g/mL durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con PBS, se persiguieron las células en el medio sin CTxB durante los tiempos indicados.

ARNip

La supresión de la expresión del gen LPIN1 en células dendríticas y mioblastos de testigos donantes se llevó a cabo utilizando ARNip específico del gen para evitar la traducción adicional de la proteína [31].

Gotas lipídicas

Se visualizó la acumulación de gotas lipídicas (GL) utilizando tinción Bodipy en los miotubos esqueléticos, como se ha descrito con anterioridad [31].

Yoduro de propidio (YP) y anexina V

5 Se adquirió yoduro de propidio (YP) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). Se adquirieron tampón de unión a anexina V, y anexina V, de BD Biosciences (San José, CA, EE. UU.). Los ensayos de citometría de flujo se realizaron en la instalación básica de citometría de flujo de los autores. Se utilizaron anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (BD Biosciences) e YP para detectar células que estaban experimentando apoptosis. Resumiendo, se cosecharon células por centrifugación (200 g durante 5 minutos a 4°C) después de los
10 tratamientos experimentales. Para la tinción, se lavaron dos veces las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y se resuspendieron en tampón de unión 1x a una concentración de 1×10^6 células/mL. Después se transfirieron 100 μ L de solución a un tubo de cultivo de 5 mL y se añadieron 5 μ L de anexina V-ITCF y 5 μ L de YP. Se agitaron suavemente en vórtex las células y se incubaron a oscuras durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Antes del análisis por citometría de flujo, se añadieron 400 μ L de tampón de unión 1x, y se analizaron las células en un citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences, San José, EE. UU.) utilizando como parámetro de delimitación la luz dispersada frontalmente frente a la luz dispersada lateralmente.

Ratones Lpin1^{fl/d/fl/d}

Se obtuvieron ratones Lpin1^{fl/d/fl/d} del Jackson Laboratory. Para la producción *in vitro* de CD-MO, se aislaron células precursoras de médula ósea de huesos grandes de ratones de 6 a 16 semanas de edad. Se cultivaron las células durante 7 días en IMDM suplementado con SVF al 10%, glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 50 μ M y sobrenadante J558 que contenía 20 μ g/mL de GM-CSF. El Comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de París Descartes, París, aprobó todos los protocolos experimentales con animales.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Prism 4 para Mac (Graph Pad Software). Las barras de error representan valores de EEM y p calculados con una prueba de Mann-Whitney de dos colas, salvo que se indique otra cosa.

Resultados

La presencia de inflamación en pacientes por lipina-1 se correlaciona con la actividad de la enfermedad, e interviene en ella la hiperactivación de TLR9.

30 Los autores comenzaron a recopilar pruebas de inflamación en pacientes con mutaciones de lipina-1, mediante la detección de muestras de suero mediante un ensayo múltiple de citometría de flujo que permite la cuantificación de un amplio espectro de mediadores inflamatorios. Mientras que la mayoría de las citocinas y quimiocinas analizadas eran indetectables en sueros de los individuos testigos o de pacientes con enfermedad inactiva, los pacientes con evolución crónica (n = 6) o a los que se había realizado la extracción durante un brote (n = 1) mostraron niveles significativamente más elevados de RANTES, MCP-1 e IL-8. Más sorprendentemente, se detectó actividad de IFN-alfa en pacientes con enfermedad activa, una observación que recuerda a las interferonopatías o infecciones víricas (Figuras 1A y B). A continuación, los autores examinaron la sensibilidad a estímulos asociados con patógenos y realizaron pruebas de provocación de células inmunitarias innatas de pacientes e individuos testigo con ligandos sintéticos de receptor tipo Toll (TLR), inductores bien conocidos de inflamación. Sorprendentemente, la estimulación con CpG-A solamente, un enérgico ligando de TLR9, de CD mutadas en lipina-1 y macrófagos derivados de monocitos, exacerbó la secreción de mediadores inflamatorios (Figura 1C). Reforzando este resultado inesperado, CD derivadas de pacientes maduraron más rápidamente tras la estimulación con CpG-A, como lo refleja la expresión superficial más intensa de CD83 (Figura 1D). Además, la expresión de los seis genes estimulados por interferón (ISG) ensayados (Figura 1E) fue invariablemente mayor en células de paciente que en testigos, especialmente en lo que respecta a IF27 (un incremento de hasta 300 veces) y en menor medida al gen SIGLEC-1 (un incremento de hasta 30 veces). Sorprendentemente, en pacientes con enfermedad crónica los seis ISG ensayados permanecieron persistentemente elevados en células no estimuladas. Debido al papel central de las CD plasmocitoides (CDp) en la secreción de IFN, los autores también buscaron una señal de IFN en estas células. Como se esperaba, la estimulación de CDp con CpG-A dio lugar a una secreción de IFN significativamente incrementada en células de paciente en comparación con los testigos. La hipersensibilidad a ligandos de TLR9 se extendía a los principales tipos celulares que expresan lipina-1, entre ellos las células del músculo esquelético: mioblastos (Figura 1F) y miotubos, pero no fibroblastos. Como confirmación de la participación directa de TLR9, la secreción de IL-6 resultó suprimida tras la estimulación por CpG-A cuando se trataron previamente los mioblastos con oligonucleótido inhibidor (ODN-i) rico en G. Los autores han demostrado asimismo que el tratamiento previo con cloroquina y primaquina es suficiente para atenuar o suprimir la secreción de IL-6 en mioblastos estimulados con CpG-A (Figura 1G). Por último, se podría señalar la hipersensibilidad de células de paciente a ligandos naturales de TLR9 después de exponer los mioblastos a HSV-1 inactivado por UVA (Sato *et al.*, 2006). Después de la infección, se observó una elevación significativa de la citocina inflamatoria IL-6 en mioblastos de paciente, en comparación con los testigos.

Para obtener pruebas directas del papel causal de la lipina-1, los autores investigaron si la deficiencia de lipina-1 estaba implicada en la hipersensibilidad frente a ligandos de TLR9, transfectando a mioblastos de paciente un plásmido que codificaba lipina-1-GFP. Las células transfectadas estimuladas con CpG-A secretaron, en comparación con los testigos, un nivel similar de IL-6. Por el contrario, cuando se provocó con CpG-A a CD derivadas de médula ósea de ratones *Lpin1^{fl/d}* o de ratas con lipina-1 desactivada ("noqueada"), se observó un nivel de IL-6 comparable, tanto en CD de animales silvestres como en animales con lipina-1 noqueada. Este resultado sugiere que la hipersensibilidad frente a ligandos de TLR9 estaba limitada a la deficiencia de lipina-1 humana, y no se reproducía en los modelos en roedores.

La deficiente actividad de PAP1 en las células inmunitarias innatas de pacientes es responsable de un tráfico de TLR9 hacia lisosomas, y señalización, acelerados.

Para obtener indicios acerca de la activación aberrante de TLR9 en células de paciente, los autores analizaron las vías de señalización IRF-7 y NF- κ b durante la estimulación de curso temporal con CpG-A o agonistas de TLR irrelevantes. Los autores observaron un reclutamiento y activación más temprano de moléculas específicamente reclutadas para esta vía. Puesto que la expresión génica y proteica de TLR9 era similar en pacientes y testigos, la atención de los autores se centró en el tráfico de TLR9 hacia endosomas y lisosomas tardíos, un proceso fisiológico del que es bien conocido que está estrechamente regulado y relacionado con su activación. Un seguimiento por microscopía confocal del curso temporal de CpG-A o TLR9 fluorescentes reveló que, en ausencia de cualquier estimulación, ambos estaban colocalizados significativamente con Lamp-1 solo en células de paciente, siendo esta diferencia más acusada con el tiempo: T0, 10% frente a 40% $p < 0,0001$; T20, 45% frente a 65%, $p < 0,0001$. Para clarificar la contribución directa de lipina-1 a esta observación, los autores investigaron las consecuencias de mutaciones en la expresión y las funciones. Es importante destacar que se expresaba lipina-1 en CD y macrófagos, según se determinó mediante transferencias Western, y que las mutaciones indujeron, o bien una proteína inestable o bien una proteína truncada en el extremo C-terminal. La obtención de imágenes confocales confirmó que se mantenía la expresión de lipina-1, pero que su distribución subcelular había variado drásticamente con respecto al estado de tipo silvestre, especialmente con una localización nuclear más escasa en comparación con las células testigo. A causa de las mutaciones, la actividad residual específica de PAP1 era, como se esperaba, casi indetectable en células de paciente (Figura 2). Es importante destacar que la sobreexpresión de lipina-1 de tipo silvestre en células de paciente corrigió la hipersensibilidad hacia agonistas de TLR9, mientras que la sobreexpresión de proteínas mutantes la indujo, lo que proporciona pruebas directas de un papel causal de las mutaciones de lipina-1 en la perturbación observada en la biología celular.

La hipersensibilidad hacia ligandos de TLR9 contribuye al daño muscular en pacientes.

Para evaluar la conexión entre el daño muscular y la inflamación, los autores exploraron la participación de ligandos de TLR en el control de la dinámica intracelular del Ca^{2+} , ya que su aumento intracelular es el sello distintivo de la rabdomiólisis. Los niveles de Ca^{2+} intracelular registrados utilizando imágenes in vivo de células en reposo eran equivalentes entre las células testigo y las de paciente. Como se esperaba, el tratamiento con ionomicina indujo un rápido flujo de calcio en los mioblastos testigo y de paciente, mientras que la estimulación con CpG-A indujo un aumento inmediato de la concentración intracelular de calcio solo en células de paciente. Este efecto observado en células de paciente era específico de ligandos de TLR9, ya que no se observó respuesta tras la exposición a LPS o a imiquimod tanto en células de paciente como en células testigo. El tratamiento previo con cloroquina 10 μ M o con ODNi suprimió por completo, en células de paciente, la movilización intracelular de calcio en presencia de CpG-A. La quelación del calcio intracelular mediante Dantrium también inhibió la elevación del calcio intracelular. Estos datos indican que una activación aberrante de TLR9 es responsable del aumento del flujo de calcio intracelular en células de paciente, y potencialmente de la rabdomiólisis. Para obtener pruebas adicionales del papel que desempeña la inflamación en el daño muscular, los autores midieron la producción de ATP en mioblastos después de la estimulación con CpG-A, y hallaron un deterioro de la producción de ATP después de la estimulación con estímulos inflamatorios en células de paciente, en comparación con testigos. Para confirmar el efecto perjudicial de los ligandos de TLR9 sobre mioblastos de paciente, los autores incubaron mioblastos con dosis crecientes de CpG-A y midieron la mortalidad celular en distintos puntos temporales permitidos por el ensayo de viabilidad. Los mioblastos de paciente eran sensibles exclusivamente a ligandos de TLR9.

A continuación, los autores se preguntaron si la autofagia contribuía de manera independiente al efecto de los ligandos de TLR9 en el desencadenamiento de la rabdomiólisis, o lo potenciaba, ya que se ha publicado la intervención directa de una deficiencia del aclaramiento autofágico en la rabdomiólisis inducida por estatinas en ratones. Los autores estudiaron la inducción de autofagia mediante el examen de los niveles del marcador de autofagosoma, la cadena ligera 3 de proteína-1 asociada a microtúbulos (LC3)-II. En mioblastos testigo, la inducción de autofagia por inanición de suero y aminoácidos condujo a la esperada inducción de LC3-II, que dejó de manifestarse tras la alimentación. Los mioblastos de paciente indujeron la formación de autofagosomas en respuesta al ayuno, pero mantuvieron altos niveles de LC3-II incluso después de reanudar la alimentación. Curiosamente, el tratamiento con rapamicina, que inhibe mTOR e induce autofagia, indujo un aumento modesto en el nivel de LC3-II en los testigos, aunque menor que el observado en mioblastos deficientes en lipina-1 en condiciones basales. Los autores estimaron también el flujo autofágico mediante la cuantificación de los niveles de p62, un sustrato autofágico selectivo. En comparación con los testigos, los mioblastos deficientes en lipina-1 acumularon el doble de p62. Estos resultados sugieren que la lipina-1 es prescindible en la formación de

autofagosomas, pero necesaria para el aclaramiento de la carga de autolisomas. A continuación, los autores estudiaron si la hipersensibilidad a la ligación de TLR9 observada en los mioblastos deficientes en lipina-1 exacerbaba el defecto en el aclaramiento de autofagosomas. Sin embargo, el tratamiento de mioblastos de pacientes con CpG-A no afectó ni a la formación de autofagosomas ni al aclaramiento de autofagosomas.

- 5 Para obtener más información acerca del papel que desempeña la deficiencia de lipina-1 en el aclaramiento de autofagosomas, los autores examinaron la arquitectura autolisosómica global en ausencia de lipina-1.

La arquitectura endosómica global se encuentra alterada en células de pacientes con mutaciones en lipina-1.

- 10 Los autores se preguntaron de qué manera afectaba la ausencia de lipina-1 al tráfico de TLR-9 en la enfermedad relacionada con lipina-1. Para abordarlo, analizaron mediante microscopía confocal la integridad global de los compartimentos celulares en CD de pacientes. Como se esperaba, la tinción de CD testigo con anticuerpos específicos para Rab14 y EEA1 (antígeno 1 de endosoma temprano, por sus siglas en inglés) confirmó la colocalización de los dos marcadores en la periferia celular, lo que también se encontró para Syntaxin6 y EEA-1. Sin embargo, en las células de paciente, estas vesículas se habían acumulado en un compartimento central, probablemente correspondiente a la red trans-Golgi (RTG), en lugar de en la periferia. Además, en algunas células de paciente se pudieron observar vesículas positivas para Rab14 en la periferia, donde mostraban una colocalización significativa y sumamente inusual con los marcadores asociados a lisosoma (LAMP)-1 y LAMP-2. La estricta regulación de la señalización de TLR9 está gobernada por diversos actores: por ejemplo, recientemente se ha identificada a la GTPasa pequeña (relacionada con Ras en el cerebro) Rab7b, que comparte una homología muy elevada con Rab7, como regulador negativo de la señalización de TLR9 en células inmunitarias, por potenciar el tráfico del mismo hacia endosomas/lisosomas tardíos y su degradación.

La pérdida de actividad de PAP-1 conduce a una actividad deficiente de PI3K y una localización incorrecta de Rab7b.

Se encontró una reducción de PI3K en CD de pacientes en comparación con células testigo, con una reducción consiguiente de Rab7b en CD de pacientes (derecha) en comparación con el testigo.

- 25 La pérdida de la actividad de PAP-1 conduce a un transporte retrógrado deficiente.

- 30 Se ha demostrado con anterioridad que Rab7b está implicado en el control de la proteína de transporte retrógrado a través de endosomas tardíos hacia la red trans-Golgi. Los autores examinaron en primer lugar el efecto sobre el transporte de CTxB de una localización incorrecta de Rab7b en la deficiencia de lipina-1. En células testigo, la CTxB se acumuló en la RTG tras una persecución de 15 minutos, y mostró una buena colocalización con GM130 tras una persecución de 30 minutos, lo que confirma el transporte de CTxB desde la MP a través de la RTG. En las células con SMAP2 agotado con ARNip #1, el transporte de CTxB desde los RE hacia el Golgi, no desde la MP hacia los RE, se vio significativamente afectado. Después de una persecución de 60 minutos, la CTxB todavía se acumulaba en los RE y no estaba colocalizada con GM130. Tras contar el número de células en las que la CTxB no había alcanzado el Golgi, más del 80% de las células con SMAP2 agotado con ARNip #1 mostraron el defecto del transporte de CTxB desde los RE al Golgi. Los otros dos ARNip, el #2 y el #3, también afectaron desfavorablemente al transporte de CTxB.

Ejemplo 2:

- 40 Se trató a dos pacientes con hidroxicloloquina (Plaquenil®, 6 mg/kg/día). A los tres meses de tratamiento, los autores de la invención observaron una disminución del dolor muscular y una disminución espectacular de citocinas proinflamatorias (IL-8, RANTES, MCP-1) en sueros (Figura 3).

Referencias

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente descripción.

- [1] J.M. Sauret, G. Marinides, G.K. Wang, Rhabdomyolysis, *American family physician*, 65 (2002) 907-912.
- 45 [2] G. Cervellin, I. Comelli, G. Lippi, Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features, *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM/FESCC*, 48 (2010) 749-756.
- [3] R.P. Luck, S. Verbin, Rhabdomyolysis: a review of clinical presentation, etiology, diagnosis, and management, *Pediatric emergency care*, 24 (2008) 262-268.
- 50 [4] M.L. Shapiro, A. Baldea, F.A. Luchette, Rhabdomyolysis in the intensive care unit, *Journal of intensive care medicine*, 27 (2012) 335-342.
- [5] M.H. Zhang, Rhabdomyolysis and its pathogenesis, *World journal of emergency medicine*, 3 (2012) 11-15.

- [6] G.S. Hotamisligil, N.S. Shargill, B.M. Spiegelman, Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, 259 (1993) 87-91.
- [7] H. Xu, G.T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C.J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J.S. Ross, L.A. Tartaglia, H. Chen, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *The Journal of clinical investigation*, 112 (2003) 1821-1830.
- [8] S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W. Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *The Journal of clinical investigation*, 112 (2003) 1796-1808.
- [9] A. Mamoune, M. Bahuau, Y. Hamel, V. Serre, M. Pelosi, F. Habarou, M.A. Nguyen Morel, B. Boisson, S. Vergnaud, M.T. Viou, L. Nonnenmacher, M. Piraud, P. Nusbaum, J. Vamecq, N. Romero, C. Ottolenghi, J.L. Casanova, P. de Lonlay, A Thermolabile Aldolase A Mutant Causes Fever-Induced Recurrent Rhabdomyolysis without Hemolytic Anemia, *PLoS genetics*, 10 (2014) e1004711.
- [10] D. Mathis, S.E. Shoelson, Immunometabolism: an emerging frontier, *Nature reviews. Immunology*, 11 (2011) 81.
- [11] T. Herlin, B. Fiirgaard, M. Bjerre, G. Kerndrup, H. Hasle, X. Bing, P.J. Ferguson, Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed syndrome, *Annals of the rheumatic diseases*, (2012).
- [12] H.A. Majeed, M. Al-Tarawna, H. El-Shanti, B. Kamel, F. Al-Khalaileh, The syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia. Report of a new family and a review, *European journal of pediatrics*, 160 (2001) 705-710.
- [13] L.M. Kuijk, J.M. Beekman, J. Koster, H.R. Waterham, J. Frenkel, P.J. Coffey, HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1 β release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation, *Blood*, 112 (2008) 3563-3573.
- [14] M. Valdearcos, E. Esquinas, C. Meana, L. Pena, L. Gil-de-Gomez, J. Balsinde, M.A. Balboa, Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated Fatty acids in macrophages, *The Journal of biological chemistry*, 287 (2012) 10894-10904.
- [15] P.J. Ferguson, M. Sandu, Current understanding of the pathogenesis and management of chronic recurrent multifocal osteomyelitis, *Current rheumatology reports*, 14 (2012) 130-141.
- [16] S.W. Sauer, J.G. Okun, M.A. Schwab, L.R. Cnric, G.F. Hoffmann, S.I. Goodman, D.M. Koeller, S. Kolker, Bioenergetics in glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a role for glutaryl-coenzyme A, *The Journal of biological chemistry*, 280 (2005) 21830-21836.
- [17] S. Kolker, D.M. Koeller, J.G. Okun, G.F. Hoffmann, Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, *Annals of neurology*, 55 (2004) 7-12.
- [18] C.C. Chao, S. Hu, Tumor necrosis factor- α potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures, *Developmental neuroscience*, 16 (1994) 172-179.
- [19] J. Lamp, B. Keyser, D.M. Koeller, K. Ullrich, T. Braulke, C. Muhlhausen, Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells, *The Journal of biological chemistry*, 286 (2011) 17777-17784.
- [20] A. Zeharia, A. Shaag, R.H. Houtkooper, T. Hindi, P. de Lonlay, G. Erez, L. Hubert, A. Saada, Y. de Keyzer, G. Eshel, F.M. Vaz, O. Pines, O. Elpeleg, Mutations in LPIN1 cause recurrent acute myoglobinuria in childhood, *American journal of human genetics*, 83 (2008) 489-494.
- [21] C. Michot, L. Hubert, M. Brivet, L. De Meirleir, V. Valayannopoulos, W. Muller-Felber, R. Venkateswaran, H. Ogier, I. Desguerre, C. Altuzarra, E. Thompson, M. Smitka, A. Huebner, M. Husson, R. Horvath, P. Chinnery, F.M. Vaz, A. Munnich, O. Elpeleg, A. Delahodde, Y. de Keyzer, P. de Lonlay, LPIN1 gene mutations: a major cause of severe rhabdomyolysis in early childhood, *Human mutation*, 31 (2010) E1564-1573.
- [22] C. Michot, L. Hubert, N.B. Romero, A. Gouda, A. Mamoune, S. Mathew, E. Kirk, L. Viollet, S. Rahman, S. Bekri, H. Peters, J. McGill, E. Glamuzina, M. Farrar, M. von der Hagen, I.E. Alexander, B. Kirmse, M. Barth, P. Laforet, P. Benlian, A. Munnich, M. Jeanpierre, O. Elpeleg, O. Pines, A. Delahodde, Y. de Keyzer, P. de Lonlay, Study of LPIN1, LPIN2 and LPIN3 in rhabdomyolysis and exercise-induced myalgia, *Journal of inherited metabolic disease*, (2012).
- [23] J. Bergounioux, A. Brassier, C. Rambaud, O. Bustarret, C. Michot, L. Hubert, J.B. Arnoux, A. Laquerriere, S. Bekri, S. Galene-Gromez, D. Bonnet, P. Hubert, P. de Lonlay, Fatal rhabdomyolysis in 2 children with LPIN1 mutations, *The Journal of pediatrics*, 160 (2012) 1052-1054.
- [24] G.G. Schweitzer, S.L. Collier, Z. Chen, J.M. Eaton, A.M. Connolly, R.C. Bucelli, A. Pestronk, T.E. Harris, B.N. Finck, Rhabdomyolysis-Associated Mutations in Human LPIN1 Lead to Loss of Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity, *JIMD reports*, (2015).

- [25] J. Donkor, M. Sariahmetoglu, J. Dewald, D.N. Brindley, K. Reue, Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns, *The Journal of biological chemistry*, 282 (2007) 3450-3457.
- [26] G.S. Han, W.I. Wu, G.M. Carman, The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme, *The Journal of biological chemistry*, 281 (2006) 9210-9218.
- 5 [27] B.N. Finck, M.C. Gropler, Z. Chen, T.C. Leone, M.A. Croce, T.E. Harris, J.C. Lawrence, Jr., D.P. Kelly, Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway, *Cell metabolism*, 4 (2006) 199-210.
- [28] H.B. Kim, A. Kumar, L. Wang, G.H. Liu, S.R. Keller, J.C. Lawrence, Jr., B.N. Finck, T.E. Harris, Lipin 1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes to inhibit secretion of inflammatory factors, *Molecular and cellular biology*, 30 (2010) 3126-3139.
- 10 [29] T.R. Peterson, S.S. Sengupta, T.E. Harris, A.E. Carmack, S.A. Kang, E. Balderas, D.A. Guertin, K.L. Madden, A.E. Carpenter, B.N. Finck, D.M. Sabatini, mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway, *Cell*, 146 (2011) 408-420.
- [30] M.C. Sugden, P.W. Caton, M.J. Holness, PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC, *The Journal of endocrinology*, 204 (2010) 93-104.
- 15 [31] C. Michot, A. Mamoune, J. Vamecq, M.T. Viou, L.S. Hsieh, E. Testet, J. Laine, L. Hubert, A.F. Dessein, M. Fontaine, C. Ottolenghi, L. Fouillen, K. Nadra, E. Blanc, J. Bastin, S. Candon, M. Pende, A. Munnich, A. Smahi, F. Djouadi, G.M. Carman, N. Romero, Y. de Keyser, P. de Lonlay, Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts, *Biochimica et biophysica acta*, 1832 (2013) 2103-2114.
- 20 [32] P. Zhang, M.A. Verity, K. Reue, Lipin-1 Regulates Autophagy Clearance and Intersects with Statin Drug Effects in Skeletal Muscle, *Cell metabolism*, (2014).
- [33] M. Valdearcos, E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gomez, C. Guijas, J. Balsinde, M.A. Balboa, Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages, *Journal of immunology*, 186 (2011) 6004-6013.
- 25 [34] A.R. Navratil, A.M. Brummett, J.D. Bryan, M.D. Woolard, Francisella tularensis LVS induction of prostaglandin biosynthesis by infected macrophages requires specific host phospholipases and lipid phosphatases, *Infection and immunity*, (2014).
- [35] C. Meana, L. Pena, G. Lorden, E. Esquinas, C. Guijas, M. Valdearcos, J. Balsinde, M.A. Balboa, Lipin-1 Integrates Lipid Synthesis with Proinflammatory Responses during TLR Activation in Macrophages, *Journal of immunology*, 193 (2014) 4614-4622.
- 30 [36] H. Kanda, S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, M. Kasuga, MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity, *The Journal of clinical investigation*, 116 (2006) 1494-1505.
- [37] C.A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, Innate immune recognition, *Annual review of immunology*, 20 (2002) 197-216.
- 35 [38] E.L. Pearce, E.J. Pearce, Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence, *Immunity*, 38 (2013) 633-643.
- [39] G.R. Robbins, H. Wen, J.P. Ting, Inflammasomes and metabolic disorders: old genes in modern diseases, *Molecular cell*, 54 (2014) 297-308.
- [40] R. Barbalat, S.E. Ewald, M.L. Mouchess, G.M. Barton, Nucleic acid recognition by the innate immune system, *Annual review of immunology*, 29 (2011) 185-214.
- 40 [41] M. de Bernard, R. Rizzuto, Toll-like receptors hit calcium, *EMBO reports*, 15 (2014) 468-469.
- [42] R. Jahn, T.C. Sudhof, Membrane fusion and exocytosis, *Annual review of biochemistry*, 68 (1999) 863-911.
- [43] C. Bucci, O. Bakke, C. Progida, Rab7b and receptors trafficking, *Communicative & integrative biology*, 3 (2010) 401-404.
- 45 [44] M. Yang, T. Chen, C. Han, N. Li, T. Wan, X. Cao, Rab7b, a novel lysosome-associated small GTPase, is involved in monocytic differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 318 (2004) 792-799.
- [45] C. Progida, L. Cogli, F. Piro, A. De Luca, O. Bakke, C. Bucci, Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN, *Journal of cell science*, 123 (2010) 1480-1491.

- [46] M. Borg, O. Bakke, C. Progida, A novel interaction between Rab7b and actomyosin reveals a dual role in intracellular transport and cell migration, *Journal of cell science*, (2014).
- [47] J.E. Vance, Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells, *Traffic*, (2014).
- 5 [48] F. Kano, T. Arai, M. Matsuto, H. Hayashi, M. Sato, M. Murata, Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinositol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis, *Biochimica et biophysica acta*, 1813 (2011) 784-801.
- [49] K.O. Schink, C. Raiborg, H. Stenmark, Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling, *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 35 (2013) 900-912.
- 10 [50] R. Zoncu, R.M. Perera, D.M. Balkin, M. Pirruccello, D. Toomre, P. De Camilli, A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes, *Cell*, 136 (2009) 1110-1121.
- [51] C. Raiborg, K.G. Bache, A. Mehlum, H. Stenmark, Function of Hrs in endocytic trafficking and signalling, *Biochemical Society transactions*, 29 (2001) 472-475.
- 15 [52] N. Fili, V. Calleja, R. Woscholski, P.J. Parker, B. Larijani, Compartmental signal modulation: Endosomal phosphatidylinositol 3-phosphate controls endosome morphology and selective cargo sorting, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 15473-15478.
- [53] D. Poccia, B. Larijani, Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion, *The Biochemical journal*, 418 (2009) 233-246.
- 20 [54] D.J. Gillooly, I.C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N.J. Bryant, J.M. Gaullier, R.G. Parton, H. Stenmark, Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells, *The EMBO journal*, 19 (2000) 4577-4588.
- [55] A. Jeschke, N. Zehethofer, B. Lindner, J. Krupp, D. Schwudke, I. Haneburger, M. Jovic, J.M. Backer, T. Balla, H. Hilbi, A. Haas, Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 3-phosphate regulate phagolysosome biogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112 (2015) 4636-4641.
- 25 [56] I. Ribeiro, L. Yuan, G. Tanentzapf, J.J. Dowling, A. Kiger, Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance, *PLoS genetics*, 7 (2011) e1001295.
- [57] T. Sasser, Q.S. Qiu, S. Karunakaran, M. Padolina, A. Reyes, B. Flood, S. Smith, C. Gonzales, R.A. Fratti, Yeast lipin 1 orthologue pah1p regulates vacuole homeostasis and membrane fusion, *The Journal of biological chemistry*, 287 (2012) 2221-2236.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en antagonistas de TLR9 e inhibidores de la expresión de TLR9 para su uso en el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita.
- 5 2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1 en donde dicho antagonista de TLR9 es una molécula orgánica pequeña, un oligonucleótido, un polipéptido, un aptámero o un intra-anticuerpo.
3. El compuesto para su uso según la reivindicación 2 en donde dicha molécula orgánica pequeña se selecciona del grupo que consiste en cloroquina, primaquina, imidazoquinolinas, 4-aminoquinolinas, quinazolinas, CMZ 203-84, CMZ 203-85, CMZ 203-88, CMZ 203-88-1, CMZ 203-89, CMZ 203-91, hidroxiclороquina, quinacrina, bafilomicina A y CPG52364.
- 10 4. El compuesto para su uso según la reivindicación 2 en donde dicho oligonucleótido es ODNi de CPG.
5. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en combinación con uno o varios compuestos anti-rabdomiólisis.
6. El compuesto para su uso según la reivindicación 5 en donde dicho compuesto anti-rabdomiólisis es un compuesto que inhibe el flujo entrante de calcio, tal como Dantrium.
- 15 7. Un método para seleccionar un compuesto candidato para su uso como fármaco para el tratamiento de la rabdomiólisis en un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende los pasos de:
 - proporcionar un TLR9, proporcionar una célula, muestra de tejido o un organismo no humano que expresa un TLR9,
 - 20 - proporcionar un compuesto candidato tal como una molécula orgánica pequeña, un oligonucleótido, un polipéptido, un aptámero o un intra-anticuerpo,
 - medir la actividad de TLR9 y el flujo entrante de calcio,
 - y seleccionar positivamente compuestos candidatos que inhiben la actividad de TLR9 o inhiben el flujo entrante de calcio.

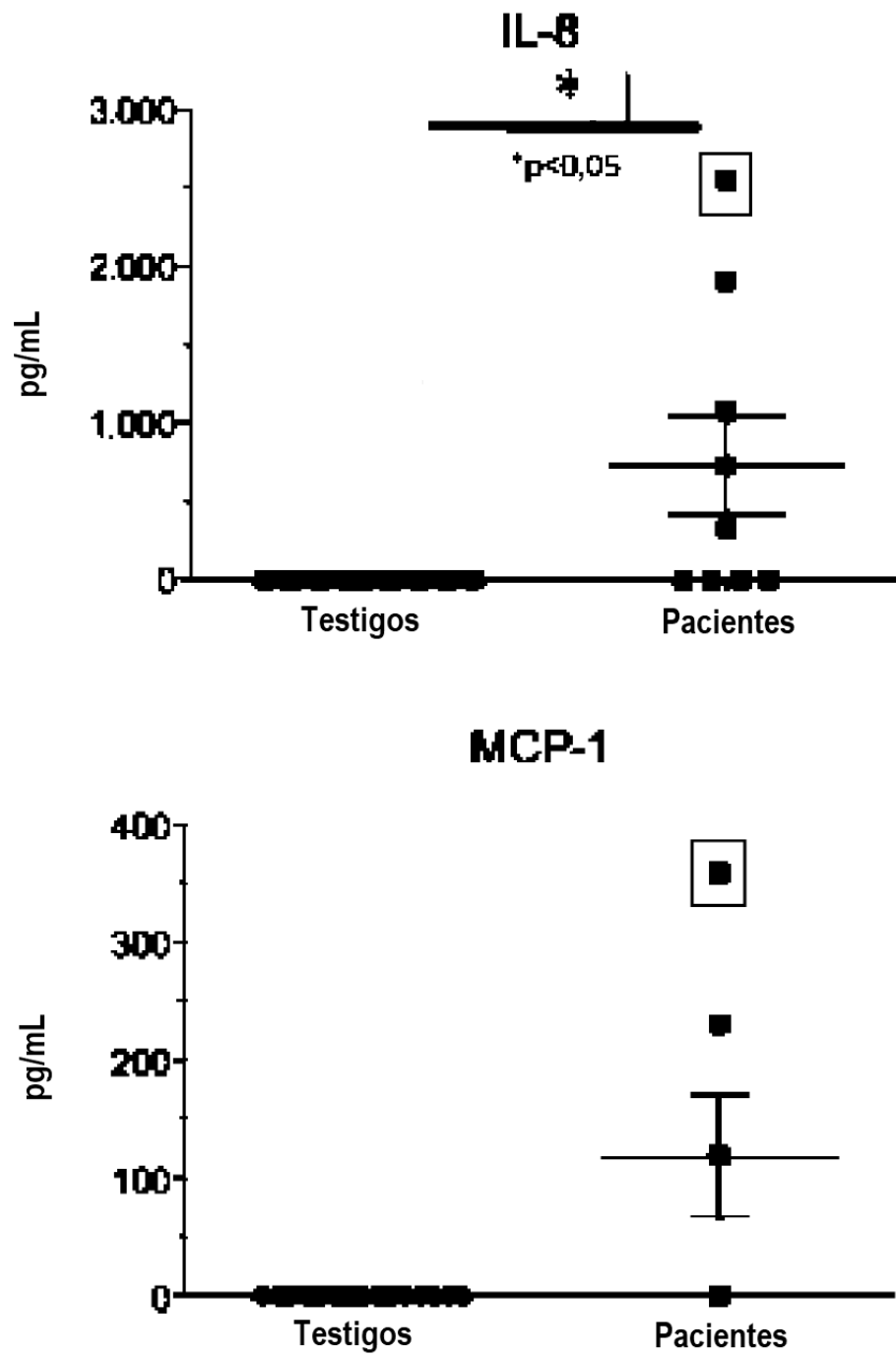


Figura 1A

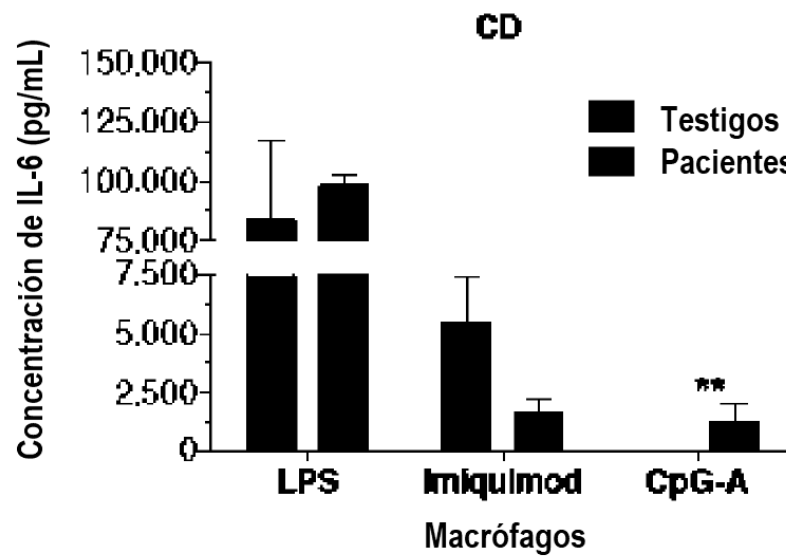
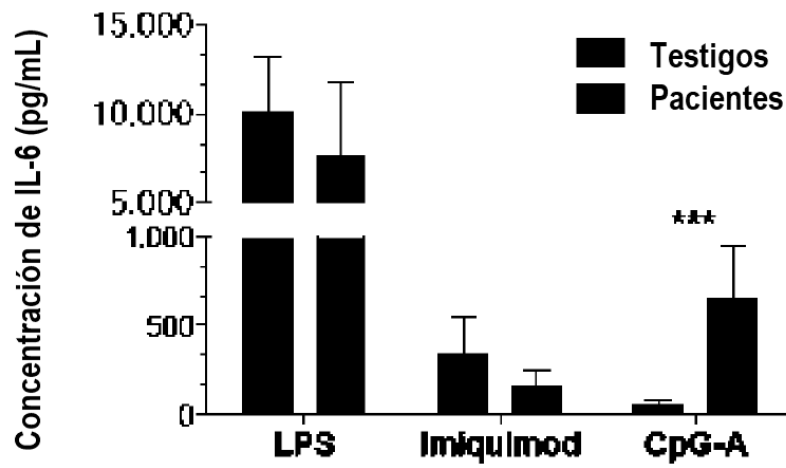


Figura 1C

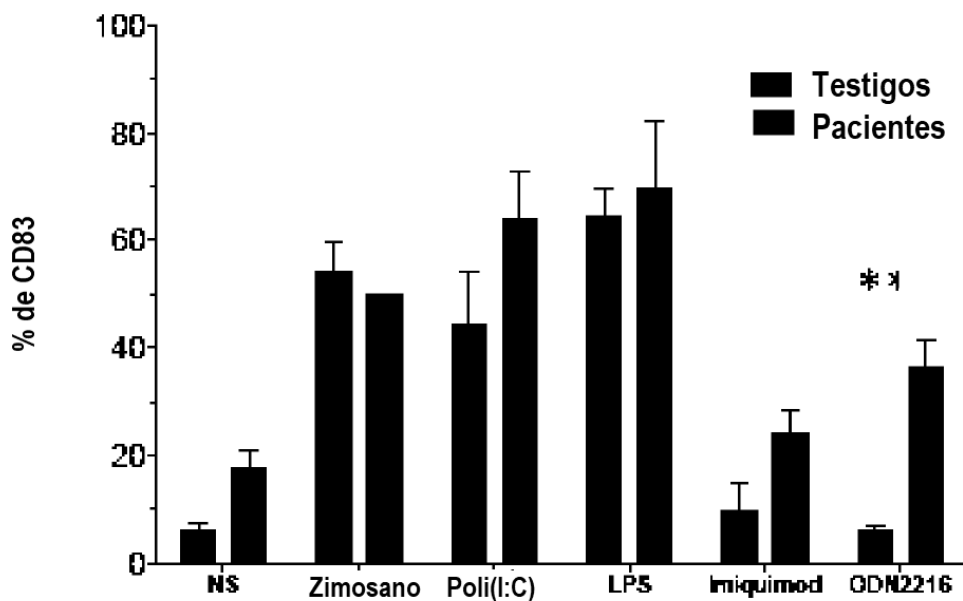


Figura 1D

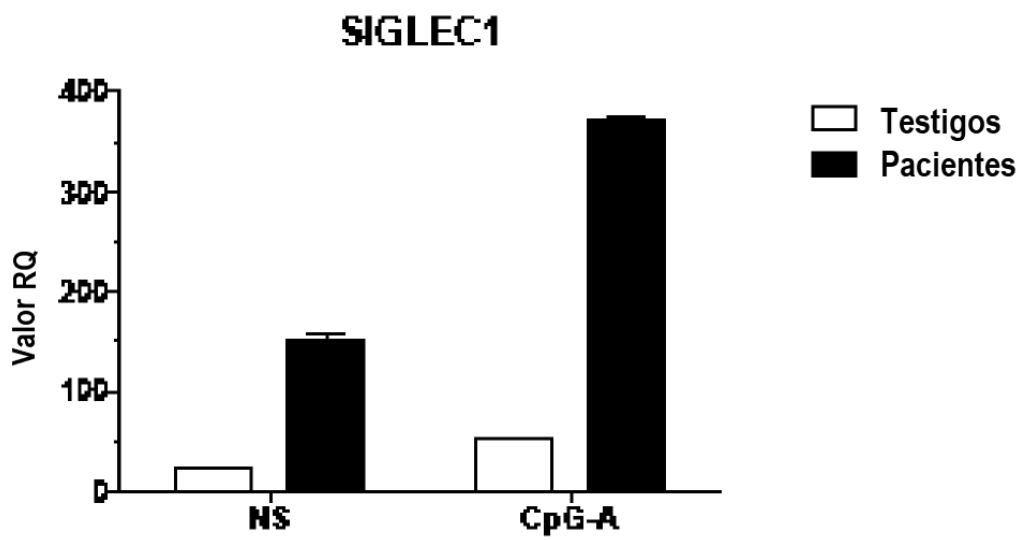
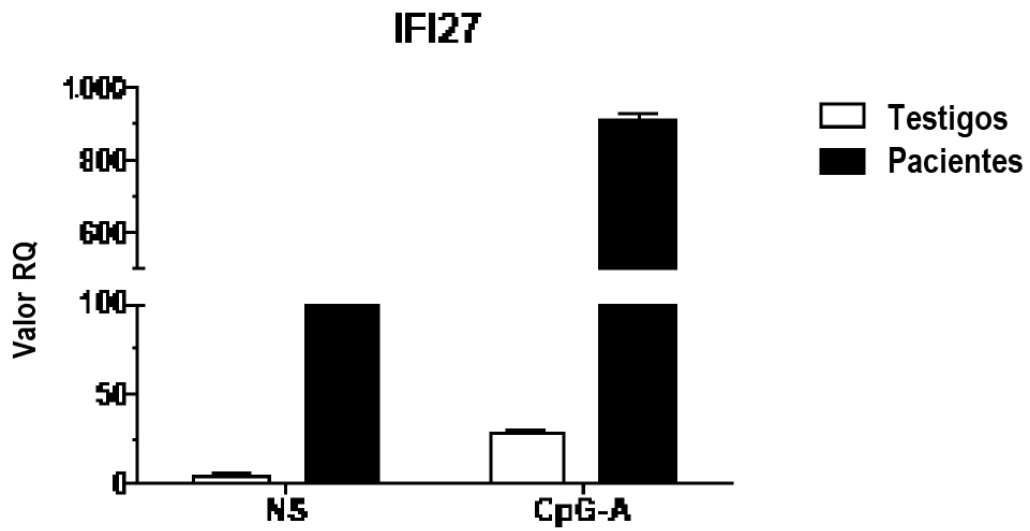


Figura 1E

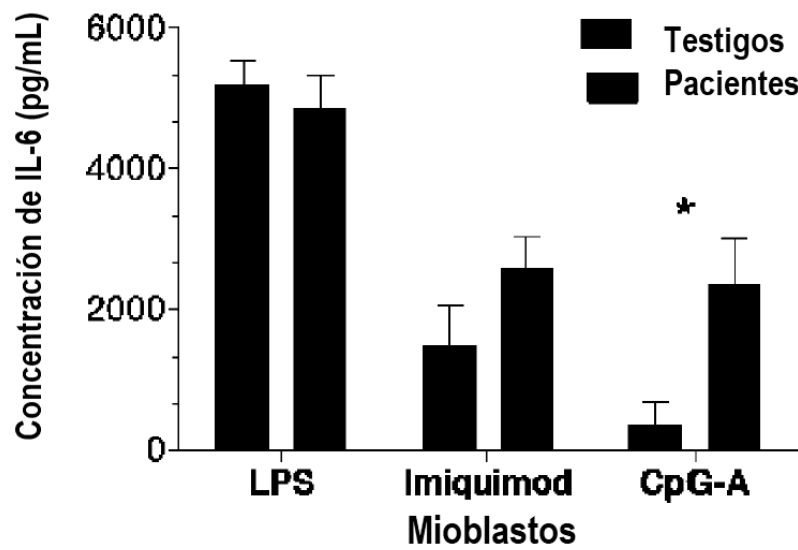


Figura 1F

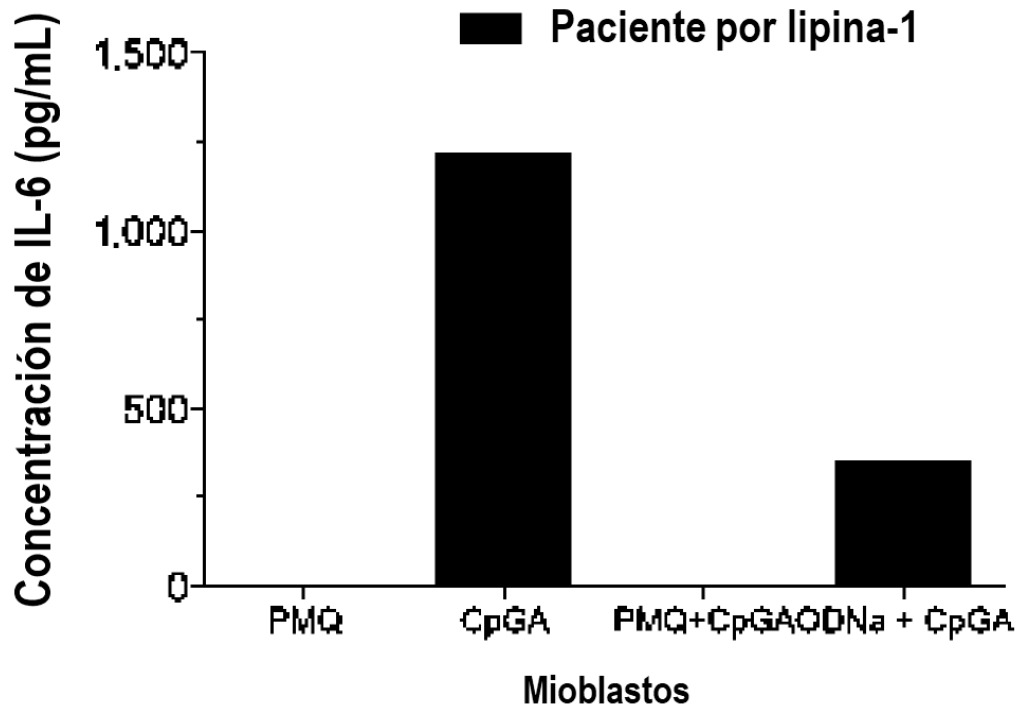


Figura 1G

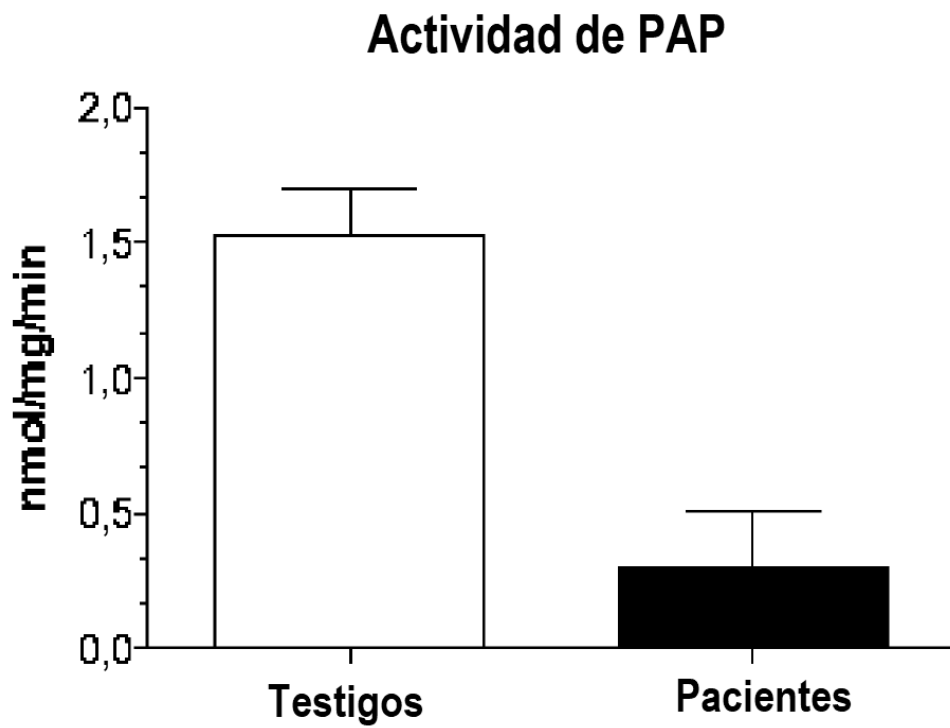


Figura 2

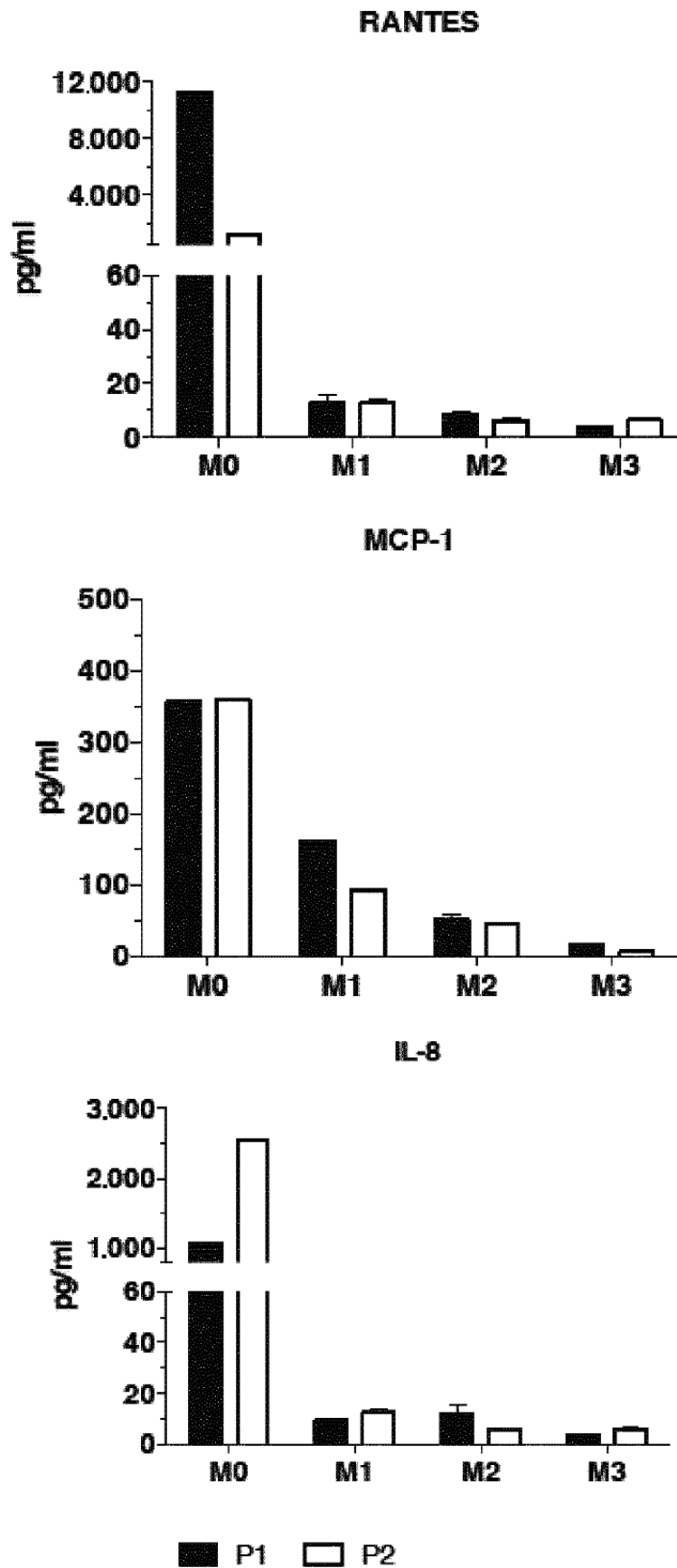


Figura 3