



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 690**

(51) Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02729732 .4**

(86) Fecha de presentación : **29.05.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1395681**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

(54) Título: **Aplicaciones farmacológicas de los ensayos de ADN mitocondrial.**

(30) Prioridad: **29.05.2001 US 293523 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2007**

(73) Titular/es: **The University of British Columbia  
University-Industry Liaison Office  
nº 103-6190 Agronomy Road  
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, CA**

(72) Inventor/es: **Cote, Helene;  
Montaner, Julio y  
O'Shaughnessy, Michael, V.**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 269 690 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

Aplicaciones farmacológicas de los ensayos de ADN mitocondrial.

5 **Campo de la invención**

La invención es en el campo del diagnóstico y la terapéutica que incluye a los ácidos nucleicos.

**Antecedentes de la invención**

10 Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI) representan la piedra angular del tratamiento antirretroviral en la infección por VIH. A través de su incorporación en las moléculas de ADN viral de elongación transcritas por la transcriptasa inversa de VIH, inhiben eficazmente la replicación viral. Sin embargo, los NRTI también pueden inhibir la ADN polimerasa gamma humana (POL $\gamma$ ) (Martin *et al.*, 1994) y, por tanto, la replicación del ADN mitocondrial (ADNmt) que conduce a la disminución del ADNmt y a la toxicidad farmacológica (Brinkman *et al.*, 1998; Lewis y Dalakas, 1995; Kakuda, 2000). Esta toxicidad mitocondrial (TM) conduce a varios efectos adversos, incluyendo la acidosis láctica, miopía, cardiomiopatía, neuropatía, esteatosis hepática, toxicidad nefrítica y pancreatitis (Lewis y Dalakas, 1995; otros). La amplia variedad de síntomas clínicos producidos por los NRTI recuerda a la serie compleja de síntomas producidos por enfermedades que resultan de mutaciones del ADNmt (para revisión, véase Wallace, 1999).

Estudios iniciales sobre miopatía inducida por zidovudina han demostrado una disminución en el ADNmt total aislado de biopsias de músculo tanto en seres humanos (Arnaudo *et al.*, 1991) como en ratas (Lewis *et al.*, 1992). Estudios *in vitro* con diversos análogos de nucleósidos anti-VIH han demostrado también que los NRTI producen una reducción en el contenido mitocondrial de células linfoblastoides humanas (Chen *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1994), células CEM (Medina *et al.*, 1994) y células HepG2 (Pan-Zhou *et al.*, 2000). Recientemente, se notificaron grandes deleciones en el ADNmt hepático pero no disminución del ADNmt en asociación con un caso letal de acidosis láctica durante el tratamiento antirretroviral (Bartley *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la disminución (o deleción) del ADNmt puede producir una disminución en el ARN mitocondrial, la síntesis de proteínas codificadas por el ADNmt y finalmente, una disfunción mitocondrial (Lewis *et al.*, 1992). En el nivel celular, las consecuencias de una toxicidad de este tipo son la disminución de la fosforilación oxidativa, la acumulación de lípidos intracelulares y la acumulación de ácido láctico. En el nivel fisiológico, esto puede traducirse en hiperlactemia que puede o no ir acompañada por otros síntomas de toxicidad mitocondrial, tales como fatiga, rápida pérdida de peso, anomalías lipídicas y esteatosis hepática. Es probable que la hiperlactemia crónica sea un reflejo de un deterioro del aclaramiento del lactato hepático (Brinkman, 2000) que puede o no encontrar su etiología en la propia toxicidad de los análogos de nucleósidos. Considerando la naturaleza a largo plazo del tratamiento antirretroviral, este síndrome recientemente identificado de hiperlactemia parece haberse observado con un aumento de la frecuencia de los pacientes infectados por VIH en el tratamiento antirretroviral (Lonergan *et al.*, 2000; Gerard *et al.*, 2000). Su presentación, gravedad y frecuencia son distintos de los de acidosis láctica aguda, un efecto adverso raro de los NRTI que a menudo es letal (Fortgang *et al.*, 1995; Megarbane *et al.*, 2000). Sin embargo, si la hiperlactemia es un factor de riesgo para la acidosis láctica todavía sigue sin estar claro.

El diagnóstico y el tratamiento de los pacientes con esta hiperlactemia inducida por NRTI siguen siendo problemáticos. Por ejemplo, puede constituir un reto diagnosticar el estado debido a los tempranos síntomas de toxicidad de fatiga y desgaste son relativamente comunes en los pacientes con SIDA y pueden asemejarse a la progresión de la enfermedad. Una vez reconocida la toxicidad mitocondrial, el tratamiento puede consistir en terminar el tratamiento con NRTI y mejorar la monitorización en el estado del paciente y los niveles de ácido láctico en sangre (Brinkman, 2000; Moyle, 2000). El diagnóstico de la disfunción mitocondrial puede realizarse mediante biopsia muscular o hepática, pero esto puede no ser práctico para la detección y monitorización rutinarias. Una medición aleatoria del ácido láctico venoso (RVLA) es un marcador útil, pero su fiabilidad está limitada por su sensibilidad a factores externos que son difíciles de controlar. La monitorización del RVLA en una cohorte de pacientes positivos para el VIH tratados con antirretrovirales ha demostrado que las mediciones consecutivas del RVLA fueron constantes dentro de los individuos y frecuentemente fueron superiores al intervalo normal (Harris *et al.*, 2000). Además, se ha encontrado una correlación significativa entre el RVLA anómalo y el tratamiento con estavudina (D4T) e hidroxiurea, así como una duración de tiempo con D4T (Harris *et al.*, 2000). Sin embargo, niveles elevados de RVLA no son específicos para la toxicidad mitocondrial relacionada con nucleósidos y puede tener otras causas, tales como la infección. Hay pocos datos *in vivo* disponibles para las toxicidades relacionadas con nucleósidos observadas con los NRTI distintas a las producidas con zidovudina.

60 Arnaudo, E y Dalakas, M, (1991), describen la miopatía mitocondrial destructiva con características histológicas de fibras rojas rasgadas (FRR) y proliferación de mitocondrias anómalas en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tratados a largo plazo con tratamiento con zidovudina y cantidades reducidas detectadas de ADN mitocondrial en muestras de biopsia muscular por medio de inmunotransferencia tipo Southern blotting.

65 Church *et al.* (2001) describen morfología mitocondrial anómala, actividades enzimáticas mitocondriales reducidas y disminución de ADN mitocondrial en biopsias de músculo de un niño con infección controlada por el virus de la inmunodeficiencia humana que se presentó con deterioro neurológico, acidosis por ácido láctico y aciduria orgánica.

El documento WO01/35096 describe composiciones y métodos para tratar enfermedades asociadas con la función mitocondrial alterada y, en particular, para la diabetes mellitus tipo 2.

## Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un método para monitorizar la toxicidad de un tratamiento farmacológico, que comprende medir el contenido relativo del ADN mitocondrial de las células en un sujeto que se somete a tratamiento con el fármaco. El contenido de ADN mitocondrial puede medirse con relación a la cantidad de ADN nuclear en las células del sujeto. La cantidad de ADN puede medirse por ejemplo mediante una reacción en cadena de la polimerasa, tal como una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, en la que la amplificación del ADN mitocondrial se compara con la amplificación de un ADN de referencia. Los métodos de la invención pueden utilizarse en pacientes humanos que padecen una enfermedad, tal como infección por VIH, tales como los pacientes que se someten a tratamiento con un análogo de nucleósido (tal como D4T). En aspectos alternativos, los métodos de la invención pueden utilizarse para monitorizar la toxicidad mitocondrial de los compuestos de prueba en modelos animales, donde por ejemplo el sujeto de modelo animal se somete a tratamiento con un fármaco. El ensayo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en células extraídas de un tejido, tales como las células obtenidas de biopsias de órganos (que pueden obtenerse, por ejemplo, *post-mortem*).

En un aspecto, por ejemplo, la presente invención describe que el ADNmt de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) está disminuido en pacientes que están experimentando síntomas de toxicidad mitocondrial relacionada con nucleósidos (TM). En consecuencia, se proporciona un ensayo semicuantitativo para detectar y monitorizar la toxicidad mitocondrial relacionada con NRTI de una muestra de sangre venosa. En realizaciones alternativas, los métodos de la invención pueden comprender la etapa de interrumpir el tratamiento del sujeto con un análogo de nucleótido, tal como D4T, cuando el contenido relativo del ADN mitocondrial de las células cae por debajo de un nivel predeterminado, tal como cuando el nivel predeterminado de ADN mitocondrial es del 5, 10, 15, 20, 25, 30 o el 35% de un nivel inicial de ADN mitocondrial, en el que el nivel inicial de ADN mitocondrial se mide antes de que el sujeto se trate con el fármaco, o se mide en un sujeto control.

En particular, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la toxicidad de un tratamiento con un fármaco precursor de ácido nucleico de un sujeto que padece una infección por VIH, que comprende medir el contenido de ADN mitocondrial con relación a la cantidad de ADN nuclear en células en una muestra de sangre periférica de un sujeto que se somete a tratamiento con el fármaco. En una realización adicional, el método de la invención comprende además la etapa de determinar si la razón de ADN mitocondrial con respecto ADN nuclear cae por debajo de un nivel predeterminado de 0,5 de una razón inicial, en el que la razón inicial se mide antes de que el sujeto se trate con el fármaco, o se mide en un sujeto control. Según la invención el nivel predeterminado puede ser de 0,45, 0,40, 0,35 ó 0,30 de la razón inicial.

En el método de la presente invención, la cantidad de ADN puede medirse mediante una reacción en cadena de la polimerasa. Dicha reacción en cadena de la polimerasa puede ser una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, en la que amplificación del ADN mitocondrial se compara con la amplificación de un ADN de referencia. La reacción en cadena de la polimerasa también puede ser una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en la que se detecta un producto de la amplificación con una sonda de hibridación.

Según la presente invención, el sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano, en el que el sujeto humano puede padecer infección por VIH.

Además, según la presente invención el fármaco puede ser un análogo de nucleósido o nucleótido, en el que el análogo de nucleósido puede seleccionarse del grupo que consiste en AZT, ddI, ddC, d4T, 3Tc, Abacavir y D4T y en el que el análogo de nucleótido puede seleccionarse del grupo que consiste en Tenofovir y Cidofovir. Además, según la presente invención el fármaco puede ser un inhibidor de la transcriptasa inversa.

En el método de la presente invención, la consecuencia de dicha toxicidad puede escogerse del grupo que consiste en miopatía, cardiomiopatía, neuropatía, esteatosis hepática, toxicidad nefrótica, pancreatitis, disminución de la fosforilación oxidativa, acidosis láctica, anomalías lipídicas, hiperlactemia, bajo umbral anaerobio en pruebas cardiopulmonares, fatiga y rápida pérdida de peso.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Razones ADNmt / ADNn de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de A) varones negativos para el VIH, B) varones positivos para el VIH / que no han recibido tratamiento con el fármaco (no fueron detectables IP/NNRTI (inhibidores de proteasas / inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa) en las muestras de plasma), C) pacientes positivos para el VIH / con TM sintomática. La barra negra representa la menor razón ADNmt / ADNn medida durante el tratamiento antirretroviral y la barra gris representa la mayor razón alcanzada tras la interrupción del tratamiento antirretroviral inicial.

Figura 2: Análisis longitudinal de niveles de lactato venoso (eje izquierdo) y niveles de ADNmt (eje derecho) y régimen con fármaco antirretroviral (barra inferior) a lo largo del tiempo, para los pacientes con síntomas de TM. La barra está coloreada de gris oscuro cuando los pacientes estaban tomando el régimen farmacológico que condujo a

TM, blanca cuando no estaban tomando ningún fármaco antirretroviral, y sombreado cuando estaban recibiendo un nuevo régimen que no incluye D4T (véase la tabla 1). Estos datos de los fármacos antirretrovirales se basan en la información de los gráficos médicos, en las fechas de prescripción de los fármacos y en los niveles plasmáticos del fármaco. Las regiones gris claro indican muestras en las que se midieron los niveles plasmáticos del fármaco para IP y/o NNRTI en  $> 2$  desviaciones estándar por debajo de la concentración valle promedio (según la monografía del fármaco del fabricante). Obsérvese que por claridad y simplicidad, el tiempo se expresa como los distintos días en los que se recogen las muestras.

Figura 3: Análisis longitudinal de los niveles de ADNmt (eje izquierdo, expresado como la razón ADNmt / ADNn) para pacientes que reciben régimen antirretroviral con estavudina (d4T), didanosina (ddl) y efavirenz (EFV) durante un transcurso de tiempo mostrado en días (eje inferior). A) dos pacientes que no tuvieron efectos adversos. B) Tres pacientes que tuvieron efectos adversos (hiperlactemia, pérdida de peso, +/- neuropatía periférica). Símbolos abiertos = con tratamiento, símbolos cerrados = sin tratamiento debido a efectos secundarios adversos. Los pacientes representados por cuadrados también recibieron hidroxiurea.

Figura 4: Curvas patrón de PCR en tiempo real mediante ciclador de luz típico generadas para el gen nuclear ASPOLG y el gen mitocondrial CCOI, utilizando diluciones seriadas de los extractos de ADN reunidos de voluntarios masculinos negativos para el VIH. Los números (de 30 a 30.000) mostrados en la curva patrón para el gen nuclear indican el número de equivalentes genómicos nucleares incluidos en cada serie. Los mismos números se asignaron en la curva patrón para el gen mitocondrial (aunque no representan un número calculado de copias del gen mitocondrial). El contenido de equivalentes genómicos nucleares del conjunto de ADN negativo para VIH se determinó mediante la calibración con un ADN humano control de concentración conocida de equivalentes genómicos nucleares (como puede estar disponible, por ejemplo, de Roche Applied Science, Laval, Quebec, Canadá).

Figura 5: Diagramas de cajas comparativos de las razones de ADNmt / ADNn entre varones infectados por VIH (media  $\pm$  DE =  $1,28 \pm 0,38$ , N = 24), varones infectados por VIH asintomáticos / varones que no han recibido antirretrovirales (IP/NNRTI no detectable en la muestras de plasma) ( $0,72 \pm 0,19$ , N = 47), y pacientes infectados por VIH / con toxicidad mitocondrial sintomática tratados con antirretrovirales. Para estos últimos se representan las razones de ADNmt / ADNn con tratamiento ( $0,41 \pm 0,08$ , N = 8) y sin tratamiento ( $0,74 \pm 0,13$ , N = 7). Las líneas indican las razones de ADNmt / ADNn máximas y mínimas observadas dentro de cada grupo, los bordes de las cajas indican los cuartiles del 25% y el 75%, la línea media indica la mediana y el cuadrado negro muestra la razón de ADNmt/ ADNn media.

### Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un ensayo para cuantificar el ADN mitocondrial (ADNmt) en células de sangre periférica y determinar así si los niveles de ADNmt están en los niveles indicativos de deficiencia mitocondrial, tal como puede producirse mediante la toxicidad de un tratamiento terapéutico. La invención proporciona ensayos para determinar la cantidad relativa de ADN mitocondrial en un sujeto, tal como un sujeto que se somete a tratamiento farmacológico. El sujeto puede ser, por ejemplo, un paciente humano que se somete a tratamiento para una infección por VIH con un precursor de ácido nucleico, tal como un análogo de nucleósido o nucleótido. Los ensayos de la invención pueden incluir ensayos de PCR, tales como PCR semicuantitativa o cuantitativa que incluye la coamplificación de una secuencia mitocondrial y una secuencia de referencia, tal como una secuencia genómica. La información de tales ensayos puede evaluarse para proporcionar una razón de ADN mitocondrial con respecto a ADN nuclear en las células del sujeto.

Por ejemplo, tales ensayos pueden llevarse a cabo en pacientes con VIH que toman tratamiento antirretroviral. En un aspecto de la invención, los tratamientos antirretrovirales pueden modularse, por tanto, según los resultados de los ensayos con ADNmt de la invención. En aspectos alternativos de la invención, puede someterse a prueba una muestra procedente de pacientes que se someten a tratamiento con precursores de ácido nucleico, tales como análogos de nucleósido o nucleótido. Los análogos de nucleósido pueden incluir, por ejemplo, AZT y ZDV (Retrovir), ddI (Videx y Videx EC) ddC (Hivid), d4T (Zerit), 3TC (Epivir), ABC (Ziagen). Los análogos de nucleósido son cualquier versión modificada de un nucleósido natural. Los análogos de nucleósido pueden tomar la ubicación de los nucleósidos naturales, bloqueando la finalización de una cadena de ADN viral durante la infección de una nueva célula por VIH. Precursores de ácido nucleico alternativos incluyen análogos de nucleótido, tales como Cidofovir (también conocido como HPMPC). Los análogos de nucleósido y otros precursores de ácido nucleico también pueden utilizarse en la quimioterapia contra el cáncer, para inhibir la replicación de las células cancerígenas.

Pueden someterse a prueba muestras procedentes de pacientes que son positivos para el VIH en varios aspectos de la invención, incluyendo tales pacientes que se someten a tratamiento con análogo de nucleósido. De manera similar, los pacientes con cáncer pueden monitorizarse con los ensayos diagnósticos de la invención, incluyendo los pacientes con cáncer que se someten a tratamiento con un precursor de ácido nucleico.

En los ejemplos que ilustran diversos aspectos de la invención, se muestra que el ADN mitocondrial está disminuido en las células de sangre periférica de pacientes que se someten a tratamiento con un precursor de ácido nucleico que padecen hiperlactemia relacionada con el fármaco antirretroviral y otros síntomas de toxicidad mitocondrial tales como fatiga y rápida pérdida de peso. Esta disminución fue anterior a un aumento en los niveles de ácido láctico venoso, una observación que concuerda con que la hiperlactemia que es una consecuencia de la disminución de ADNmt.

En algunas realizaciones, los de la invención podrían proporcionar, por tanto, información clínica antes de que se desarrolle toxicidad mitocondrial o llegue a ser lo suficientemente grave como para que vaya acompañada por hiperlactemia. En algunos casos se muestra que, incluso cortos periodos de tiempo con una concentración plasmática reducida del fármaco, da como resultado un aumento de las razones ADNmt / ADNn, lo que demuestra que las pruebas de la invención pueden llevarse a cabo ventajosamente mientras que los pacientes se están sometiendo activamente a tratamiento.

Se demuestra que la disminución en los niveles de ADNmt es reversible en algunos pacientes, tal como se muestra por los ejemplos del presente documento que ilustran un aumento en las razones de ADNmt / ADNn tras la interrupción del tratamiento antirretroviral. En los ejemplos relevantes, esto va acompañado de una vuelta gradual a los niveles normales de VLA. En los ejemplos se muestra que los niveles de ADNmt fueron significativamente inferiores en el grupo control positivo para VIH que en el negativo para VIH, una diferencia que no se explicó por los recuentos inferiores de CD4 en el cebador. En consecuencia, en un aspecto la invención proporciona una prueba diagnóstica que puede proporcionar información indicativa de infección por VIH. También se encontró que dentro del grupo control positivo para VIH, el almacenamiento antes de la extracción de ADN no mostró correlación significativa con las razones de ADNmt / ADNn medidas (datos no mostrados). En algunos casos, se encontró que pueden producirse síntomas graves cuando los niveles de ADNmt caen por debajo de aproximadamente del 30% al 20% de lo normal. Medidas alternativas de la disminución de ADNmt que pueden sugerir la intervención clínica son razones de ADNmt con respecto a ADNn inferiores a 0,5, 0,45, 0,4, 0,35 ó 0,3.

En realizaciones alternativas, el tratamiento farmacológico puede interrumpirse cuando la razón de ADNmt con respecto a ADNn, tal como se determina en el presente documento, cae por debajo de un valor umbral tal como 0,5, 0,45, 0,4, 0,35 ó 0,3 medido con respecto a una muestra control. Los métodos de la invención pueden comprender tratar al paciente con un análogo de nucleósido alternativo tras interrumpir el tratamiento del sujeto con un nucleósido particular, tal como D4T. Alternativamente, tales pacientes pueden tratarse con agentes terapéuticos mitocondriales, es decir, composiciones beneficiosas para las mitocondrias, tales como precursores o cofactores enzimáticos mitocondriales. En algunas realizaciones, tales agentes terapéuticos mitocondriales pueden seleccionarse, por ejemplo del grupo que consiste en riboflavina (vitamina B2), coenzima Q10, vitamina B1 (tiamina), vitamina B 12, vitamina K, l-acetilcarnitina, N-acetilcisteína y nicotinamida.

En realizaciones alternativas, puede determinarse la tasa de cambio de la concentración de ADNmt a lo largo del periodo del tiempo para proporcionar información diagnóstica adicional. Para algunos pacientes, una disminución relativamente rápida en la cantidad relativa de ADNmt puede ser indicativa de la toxicidad del fármaco o un estado de enfermedad. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 3B, una disminución relativamente rápida del orden del 50% o más (o más del 40% en algunos casos) en la cantidad relativa de ADNmt en comparación con el ADNn durante un periodo inferior a de ocho a diez días puede ser indicativo de que un paciente tendrá finalmente efectos adversos a partir de un fármaco y, por tanto, puede ser necesario que se monitorice más estrechamente, y finalmente puede ser necesario que se cambie a tratamiento alternativo o que se interrumpa el tratamiento farmacológico.

Como era el caso para otros estudios de hiperlactemia (Lonergan *et al.*, 2000; Gerard *et al.*, 2000; John *et al.*, 2001), todos los pacientes estaban recibiendo D4T como parte de su régimen farmacológico en el momento en que se desarrolló toxicidad. Se descubrió sorprendentemente que las razones de ADNmt / ADNn medidas mientras estaban sin tratamiento antirretroviral fueron muy similares a las observadas una vez que los pacientes reanudaron el tratamiento que contenía nucleósidos que excluía el D4T. (Tabla 1, figura 2, pacientes 3, 4, 5). En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona la interrupción de un tratamiento farmacológico cuando se detecta una disminución umbral de ADNmt, junto con un cambio a un fármaco alternativo. Por ejemplo, los pacientes pueden cambiarse de un régimen con análogo de nucleósido a un régimen con un análogo de nucleósido alternativo.

En un estudio retrospectivo de 1995 se ha calculado que la frecuencia de acidosis láctica se encuentra entre uno y dos casos por 1000 personas-año tratadas con NRTI (Fortgang *et al.*, 1995). Sin embargo, otro estudio con una definición del caso más amplia de hiperlactemia acompañada o bien por síntomas abdominales o no contabilizados por alanina transferasa elevada calculó la incidencia en 20,9 casos por 1000 personas-año de tratamiento con NRTI (Lonergan *et al.*, 2000). Una gran proporción de pacientes que recibieron tratamiento antirretroviral en la cohorte muestran hiperlactemia crónica de leve a moderada, la mayor parte de ellos asintomática. El ensayo de la invención puede utilizarse para monitorizar y evaluar las consecuencias clínicas de la toxicidad mitocondrial y la hiperlactemia crónica en tales pacientes.

En un aspecto de la invención, se proporcionan protocolos que evitan la necesidad de determinar el número de copias de ADNmt *per se*, facilitando en cambio una determinación de la cantidad relativa de ADNmt, tal como la cantidad con relación a una secuencia de ADNn. En algunos aspectos, este enfoque puede simplificar los ensayos diagnósticos de la invención. Por ejemplo, tal como se muestra en la figura 4, los números (de 30 a 30.000) que representan los equivalentes genómicos nucleares se asignan a patrones de amplificación de ADNn, tal como se determina mediante la calibración con un ADN humano control de concentración de equivalentes genómicos nucleares conocida. Los mismos números se asignan arbitrariamente a las curvas patrón correspondientes para el gen mitocondrial (aunque no representan un número de copias calculado del gen mitocondrial). En un enfoque alternativo, los números que representan los equivalentes genómicos nucleares pueden asignarse arbitrariamente a los patrones de amplificación del ADNn, basándose únicamente en el grado de dilución de la muestra (de manera que el número refleje el número de copias relativo de equivalentes genómicos nucleares, pero no el valor absoluto de tales equivalentes), y

estos números arbitrarios pueden asignarse de manera similar a los patrones de amplificación del ADNmt. Los resultados de los ensayos de la invención pueden expresarse entonces mediante la razón de ADNmt con respecto a ADNn, sin necesidad de determinar el número de copias de ADNmt absoluto. En tales realizaciones, puede ser preferible utilizar una concentración inicial de ADN de muestra que proporcione un molde de PCR suficiente de manera que el número de ciclos de amplificación esté dentro del intervalo que proporciona los resultados más fiables, tal como desde un mínimo de cualquier número entero desde 5 hasta 15 hasta un máximo de cualquier número entero desde 15 hasta 40.

Un procedimiento para comparar la abundancia relativa de secuencias de AN (ácido nucleico), que comprende:

a) medir la cinética de amplificación de una secuencia de AN nuclear en una condición de reacción de amplificación nuclear en una cebadora muestra control nuclear y en una segunda muestra control nuclear, para obtener mediciones control de amplificación nuclear, en las que la cebadora y segunda muestras control nucleares tienen diferentes concentraciones de la secuencia de AN nuclear;

b) construir un conjunto de datos de secuencia control de AN nuclear procedente de las mediciones control de amplificación nuclear, para obtener una relación patrón modelo entre la cinética de amplificación y la concentración para la secuencia de AN nuclear;

c) medir la cinética de amplificación de una secuencia de AN mitocondrial en una condición de reacción de amplificación mitocondrial en una cebadora muestra control mitocondrial y en una segunda muestra control mitocondrial, para obtener mediciones control de amplificación mitocondrial, en las que la cebadora y la segunda muestras control mitocondriales tienen diferentes concentraciones de la secuencia de ADN mitocondrial;

d) construir un conjunto de datos de secuencia control de AN mitocondrial a partir de las mediciones control de amplificación mitocondrial, para obtener una relación patrón modelo entre la cinética de amplificación y la concentración para la secuencia de AN mitocondrial;

e) medir la cinética de amplificación de la secuencia de AN nuclear en las condiciones de reacción de amplificación nuclear en una muestra de prueba, para obtener una medición de amplificación nuclear de la muestra de prueba;

f) aplicar la relación patrón modelo entre la cinética de amplificación y la concentración para la secuencia de AN nuclear para la medición de amplificación nuclear de la muestra de prueba, para obtener una medición de la concentración de la secuencia de AN nuclear de la muestra de prueba;

g) medir la cinética de amplificación de la secuencia de AN mitocondrial en las condiciones de reacción de amplificación mitocondrial en la muestra de prueba, para obtener una medición de amplificación mitocondrial de la muestra de prueba;

h) aplicar la relación patrón modelo entre la cinética de amplificación y la concentración para la secuencia de AN mitocondrial para la medición de amplificación mitocondrial de la muestra de prueba, para obtener una medición de la concentración de la secuencia de AN mitocondrial de la muestra de prueba;

i) comparar la medición de la concentración de la secuencia de AN nuclear de la muestra de prueba con la medición de la concentración de la secuencia de AN mitocondrial de la muestra de prueba, para determinar la concentración relativa de la secuencia de AN mitocondrial en comparación con la secuencia de AN nuclear en la muestra de prueba.

En aspectos alternativos de la invención, las células para su uso en los ensayos de la invención pueden obtenerse, por ejemplo mediante biopsia, a partir de una variedad de tejidos, tales como de corazón, cerebro, riñón, adiposo o hepático.

En realizaciones alternativas, las pruebas diagnósticas de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico de un estado de enfermedad. Por ejemplo, la medición de la cantidad relativa de un ADN mitocondrial en células en una muestra procedente de un sujeto, tal como una muestra de sangre periférica, puede proporcionar información relativa a enfermedades o síntomas, tales como la esterilidad masculina, insuficiencia orgánica, infección por hepatitis A, B o C, infección por VIH, artritis, una enfermedad neurológica (incluyendo, pero sin limitarse a la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington). El diagnóstico de tales estados puede emprenderse, por ejemplo, cuando los estados se tratan con un fármaco, tal como un precursor de ácido nucleico, o cuando los estados están producidos por tal fármaco.

En aspectos alternativos, la invención proporciona kits que tienen componentes para su uso en los métodos de la invención. Tales kits pueden comprender componentes de la PCR, tal como se expone en detalle más adelante, incluyendo cebadores de PCR específicos para una secuencia de ADNmt y para una secuencia de ADNn. Tales kits también pueden incluir instrucciones escritas para llevar a cabo los métodos de la invención tal como se describe en el presente documento.

En realizaciones alternativas, puede utilizarse una variedad de técnicas para medir la cantidad relativa de un ADN mitocondrial en células. Los métodos de la PCR cuantitativa se describen, por ejemplo, en los siguientes documentos, la patente de los Estados Unidos número 6.180.349 concedida a Ginzinger, *et al.* de 30 de enero de 2001; patente de los Estados Unidos número 6.033.854 concedida a Kurnit, *et al.* de 7 de marzo de 2000; y patente de los Estados Unidos número 5.972.602 concedida a Hyland, *et al.* el 26 de octubre de 1999.

#### Ejemplo 1

Tal como se ilustra en los ejemplos siguientes, la toxicidad mitocondrial relacionada con nucleósidos está asociada con una disminución significativa en el contenido de ADNmt en las células sanguíneas, un efecto que es reversible con la interrupción del tratamiento. Se proporciona un ensayo para monitorizar la toxicidad mitocondrial, por ejemplo en pacientes con tratamiento antirretroviral. Los métodos de la invención pueden adaptarse para evaluar la toxicidad de otros fármacos y para monitorizar la salud mitocondrial de los pacientes con enfermedades heredadas que afectan a los niveles de ADNmt.

#### Materiales y métodos

Se estudiaron retrospectivamente muestras sanguíneas longitudinales procedentes de 8 pacientes cuyo tratamiento antirretroviral se interrumpió debido a síntomas de toxicidad mitocondrial. Sus síntomas incluyeron hiperlactemia moderada, fatiga, rápida pérdida de peso y bajo umbral anaerobio en pruebas cardiopulmonares. Se extrajo de las células el ADN total y se amplificó y se cuantificó tanto un gen nuclear como un gen mitocondrial mediante PCR en tiempo real utilizando sondas de hibridación. Los niveles de ADNmt se expresaron como una razón del ADN mitocondrial con respecto al nuclear (ADNmt / ADNn).

#### Recogida de la muestra y extracción de ADN

Se recogieron capas leucocíticas de las muestras sanguíneas utilizadas para la determinación de la carga viral plasmática y se almacenaron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las capas virales plasmáticas se midieron utilizando el ensayo con Monitor Amplicor Ultra-Sensitive VIH-1 (Roche Molecular Diagnostic Systems, Branchburg, New Jersey). El ADN total se extrajo de 200  $\mu\text{L}$  de capas leucocíticas utilizando el kit QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN, Mississauga, Ontario, Canadá) según el protocolo del fabricante y se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de tampón de elución. Para las curvas patrón, se recogieron muestras similares de 24 voluntarios varones negativos para el VIH y se extrajo y se recogió el ADN. El contenido de equivalentes genómicos nucleares (eq.g.) del conjunto de ADN negativo para VIH se determinó mediante la calibración con el kit de ADN humano de concentración de eq.g. nucleares conocida (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec, Canadá).

#### Medición aleatoria de ácido láctico venoso

Se recogieron varias muestras venosas para la determinación del ácido láctico en tubos de fluoruro de sodio / oxalato de potasio, con torniquete normal y sin instrucciones específicas para el paciente aparte de evitar cerrar el puño o apretar la mano. El intervalo de referencia del laboratorio es de 0,7 a 2,1 mmol/L.

#### PCR cuantitativa en tiempo real

Para el gen CCOI del ADNmt, se utilizaron los cebadores CCOHF 5'-TTCGCCGACCGTTGACTATT-3' y CCOI 2R 5'-AAGATTATTACAAATGCATGGGC-3' para la amplificación por PCR y se utilizaron como sondas de hibridación los oligonucleótidos CCOIPR1 marcado con en 3' fluoresceína 5'-GCCAGCCAGGCAACCTTCTAGG-F-3' y CCOIPR2 marcado en 5' con LC Red640 5'-L-AACGACCACATCTACAACGTTATCGTCAC-P-3', estando bloqueado el extremo 3' de este último con una molécula de fosfato. Para el gen ASPOL $\gamma$  del ADNn, se utilizaron los cebadores ASPG3F 5'-GAGCTGTTGACGGAAAGGAG-3' y ASPG4R 5'-CAGAAGAGAATCCCGGCTAAG-3' para la PCR y se utilizaron como sondas de hibridación los oligonucleótidos ASPGPR1 marcado en 3' con fluoresceína 5'-GAGGCGCTGTTAGAGATCTGTCAGAGA-F-3' y ASPGPR2 bloqueado en 3' con fosfato y marcado en 5' con LC Red640 5'-LGGCATTTCCTAAGTGGAAGCAAGCA-P-3'. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron separadamente y por duplicado para cada gen, utilizando el kit de sondas de hibridación LightCycler FastStart DNA Master (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec, Canadá). Las reacciones de PCR contenían  $\text{MgCl}_2$  5 mM, 0,5  $\mu\text{M}$  de cada cebador, 0,1  $\mu\text{M}$  de sonda marcada en 3' con fluoresceína, 0,2  $\mu\text{M}$  de sonda marcada en 5' con LC Red640 y 4  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:10 del extracto de ADN en el tampón de elución. La amplificación por PCR consistió en una única etapa de desnaturalización / activación de la enzima de 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , seguido por 45 ciclos de 0 s/ $95^{\circ}\text{C}$ , 10 s/ $60^{\circ}\text{C}$ , 5 s/ $72^{\circ}\text{C}$ , con una velocidad de transición de temperatura de  $20^{\circ}\text{C}/\text{s}$ . Los parámetros de ganancia fueron  $F1 = 1$ ,  $F2 = 8$  y se realizó una única obtención de fluorescencia al final de cada etapa de hibridación. Se incluyó una curva patrón externa de 30, 300, 3000 y 30000 eq.g. nucleares en cada serie de LightCycler y se utilizaron los mismos valores de eq.g. nucleares tanto para el gen nuclear (ASPOL $\gamma$ ) y el mitocondrial (CCOI). Los datos se analizaron utilizando el segundo máximo derivado de cada reacción de amplificación y se relacionándolo con su respectiva curva patrón. Los resultados de la PCR cuantitativa se expresaron como la razón relativa de eq.g de ADNmt medios de las mediciones por duplicado con respecto a los eq.g de ADNn medios de las mediciones por duplicado para un extracto dado (ADNmt / ADNn), una razón establecida arbitrariamente en torno a 1,0 por el hecho de que se utilizaron los mismos valores de eq.g. nucleares para generar ambas curvas patrón.

En algunas realizaciones, los métodos de PCR de la invención pueden ser reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real en la que un producto de la amplificación se detecta con una sonda de hibridación, tal como se describió anteriormente utilizando el kit de sondas de hibridación LightCycler FastStart DNA Master (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec, Canadá) o técnicas alternativas comercialmente disponibles tal como la tecnología ABI Taqman® (utilizando por ejemplo un instrumento ABI Prism 7700 para detectar la acumulación de productos de la PCR de manera continua durante el procedimiento de PCR, Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Pueden adoptarse métodos de PCR alternativos y variaciones sobre los métodos anteriores, tal como se describe, por ejemplo, en las siguientes patentes de los EE.UU. 6.180.349 (Ginzinger *et al*; 30 de enero de 2001); 6.033.854 (Kuit *et al*; 7 de marzo de 2000); 5.972.602 (Hyland; 26 de octubre de 1999); 5.476.774 y 5.219.727 (Wang; 19 de diciembre de 1995 y 15 de junio de 1993); 6.174.670 (Wittwer *et al*; 16 de enero de 2001); 6.143.496 (Brown; 7 de noviembre de 2000); 6.090.556 (Kato; 18 de julio de 2000); 6.063.568 (Gerdes *et al*; 16 de mayo de 2000).

#### Niveles plasmáticos del fármaco

Se determinó la concentración de inhibidores de proteasa (IP) (indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir y lopinavir) e inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI) (nevirapina, delavirdina y efavirenz) en muestras de plasma almacenadas que se recogieron para pruebas de la carga viral. Esto se realizó utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (HP 1100, Agilent Palo Alto, CA) acoplada con espectrometría de masas en tándem (API-2000 LC/MS/MS System, AB/MDS-Sciex, Foster City, CA). En resumen, los IP y los NNRTI se extrajeron con acetonitrilo y las proteínas plasmáticas precipitadas se separaron mediante filtración con filtros Ultrafree-MC (Millipore, Bedford, MA). Los fármacos en el filtrado se separaron parcialmente mediante HPLC en una columna Zorbax XDB C-18 (Agilent Palo Alto, CA) y se cuantificaron mediante métodos convencionales en el espectrómetro de masas. Las muestras se recogieron en tubos de ácido-citrato-dextrosa (ACD) que diluyen algo la sangre y el tiempo en el que se administró la última dosis fue desconocido. Por estos motivos, se consideró que los niveles plasmáticos del fármaco constituyan una evaluación cualitativa de si los antirretrovirales se tomaban de manera regular y alcanzaban la circulación sanguínea.

#### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Wilcoxon de los rangos con signo para evaluar diferencias emparejadas entre las mediciones (tabla 3). Se utilizó el coeficiente de correlación rho de Spearman no paramétrico para evaluar la correlación entre las pruebas clínicas y las razones de ADNmt / ADNn.

#### Resultados

Los síntomas de toxicidad mitocondrial (N = 8) se asociaron con razones de ADNmt / ADNn notablemente bajos, del 70% inferior que los controles negativos para VIH (N = 24) y del 45% inferior que los controles positivos para VIH / que no han recibido antirretrovirales (N = 47). Las razones de ADNmt aumentaron significativamente tras la interrupción del tratamiento (p = 0,016). La disminución en el ADNmt precedió al aumento en los niveles de ácido láctico venoso y de manera similar, la recuperación tras el tratamiento en el ADNmt pareció preceder a un retorno a los niveles normales de lactato. No se observó correlación significativa entre el recuento de CD4 (p = 0,170) o el recuento de plaqueta (p = 0,141) y las razones de ADNmt / ADNn.

#### Características del paciente

Se estudiaron retrospectivamente 8 individuos infectados por VIH incluidos en el Drug Treatment Program "Programa de tratamiento farmacológico" en el B.C. Centre for Excellence in HIV/AIDS en el Hospital de St. Paul (tabla 1). Los pacientes experimentaron síntomas de toxicidad mitocondrial (TM) que incluyeron hiperlactemia crónica, fatiga, rápida pérdida de peso y bajo umbral anaerobio durante las pruebas de ejercicio cardiopulmonar (datos no mostrados). Dos de los pacientes estaban tomando un régimen farmacológico que consistía en 4 análogos de nucleósido, 2 estaban tomando hidroxiurea y todos estaban recibiendo D4T en el momento en que se desarrollaron sus síntomas de TM. Como resultado de esta toxicidad farmacológica, a todos les interrumpió su tratamiento antirretroviral el médico que les trataba y sus niveles de lactato se monitorizaron mediante RVLA a lo largo del tiempo. En el momento de la interrupción del tratamiento, 7/8 tenían una carga viral plasmática, lo que estaba por debajo del límite de detección de 50 copias/mL de plasma. Tras parar el tratamiento antirretroviral, los síntomas de TM desaparecieron gradualmente en todos los pacientes. El tiempo medio sin tratamiento fue de 15,6 semanas y 5/8 pacientes reanudaron posteriormente el tratamiento con un régimen farmacológico diferente que excluía D4T y DDI, y lograron una carga viral en plasma indetectable. Dos de los pacientes (4 y 5) tuvieron enzimas hepáticas elevadas antes de iniciar su régimen antes de la interrupción. El resto mostró niveles de albúmina, INR y enzimas hepáticas normales antes de desarrollar los síntomas de TM (datos no mostrados).

#### Razones de ADNmt /ADNn y tratamiento antirretroviral

Se recogieron muestras de sangre longitudinales de 8 pacientes (entre 6 y 17 muestras distintas por paciente, que cubrían un periodo de 22 a 28 meses) antes, durante y tras la interrupción del tratamiento antirretroviral y se determinaron sus razones de ADNmt / ADNn (figura 1c, 2; tabla 2). Como control, se determinaron las razones de ADNmt / ADNn para 24 varones sanos negativos para el VIH y 47 varones que no habían recibido el fármaco positivos para VIH (figura 1a, b; tabla 2).



En la tabla 3 se presenta una comparación estadística de las razones obtenidas con los diversos grupos. La razón media de ADNmt / ADNn de los controles negativos para VIH fue significativamente superior que la del grupo positivo para VIH / que no había recibido el fármaco. En el cálculo de la media de la interrupción tras el tratamiento, se consideraron todas las muestras, incluyendo las de aquellos a los que se recetó IP y NNRTI y en las que los niveles plasmáticos del fármaco fueron o bien indetectables o se midieron en  $> 2$  desviaciones estándar por debajo de la concentración valle promedio (según la monografía del fabricante del fármaco) (figura 2). Las muestras de interrupción tras el tratamiento incluyeron todas las muestras recogidas tras la interrupción del tratamiento sin limitaciones en el tiempo. El paciente 1 se excluyó de este análisis ya que no hubo capas leucocíticas disponibles del periodo sin antirretrovirales. Cinco de los 8 pacientes reanudaron finalmente el tratamiento antirretroviral que excluía los análogos de nucleósido D4T y DDI de los nuevos regímenes (tabla 1). Todas las muestras recogidas durante este tiempo se incluyeron en el cálculo de la razón media sin D4T.

Para los 8 pacientes con TM juntos, la razón media de ADNmt / ADNn observada antes de la interrupción del tratamiento (pero al menos un mes después del inicio de su último tratamiento farmacológico) fue significativamente inferior que las obtenidas para los grupos control negativos para VIH o positivos para VIH / que no habían recibido antirretrovirales ( $p < 0,001$ ). Tanto las razones medias medidas durante la interrupción completa del tratamiento como sin tratamiento con D4T (que incluyen sin ningún antirretroviral, así como con régimen antirretroviral que excluye D4T) fueron muy similares a la media obtenida para los controles positivos para VIH / que no habían recibido el fármaco. De hecho, la razón media de ADNmt / ADNn de todas las muestras recogidas antes de la interrupción del tratamiento fue significativamente inferior que tanto la razón media sin ningún antirretroviral ( $p = 0,016$ ) como la razón media sin D4T ( $p = 0,008$ ) (tabla 3).

Se investigaron varios resultados de pruebas clínicas adicionales en pacientes para determinar si demostraban una relación con la razón de ADNmt / ADNn. No se encontró una correlación significativa entre la razón de ADNmt / ADNn y el recuento de CD4, ni en el grupo positivo para VIH / que no había recibido antirretrovirales ( $p = 0,593$ ) ni el grupo de pacientes con TM ( $p = 0,170$ ). Las plaquetas contienen algunas moléculas de ADNmt por célula (Shuster *et al.*, 1988) lo que puede influir en la razón ADNmt / ADNn. Los datos de las plaquetas no estuvieron disponibles para los grupos control, pero para el grupo con TM no hubo correlación significativa entre la razón y el recuento de plaquetas ( $p = 0,14$ ). De manera similar, para los pacientes con TM, no se encontró correlación entre la razón y el recuento de leucocitos ( $p = 0,21$ ), la alanina aminotransferasa (ALT) ( $p = 0,47$ ), o el INR. Sin embargo, se encontró una débil correlación entre la razón de ADNmt / ADNn y la AST ( $p = 0,02$ ), así como con el nivel del albúmina ( $p = 0,02$ ).

#### *ADNmt y niveles de lactato*

En los pacientes 1, 4 y 8 (figura 2) la disminución de ADNmt precedió claramente a la hiperlactemia (los datos anteriores para el lactato no estaban disponibles para los otros cinco pacientes). De manera similar, en los pacientes 4, 6 y 8, el tiempo requerido para que se recuperaran los niveles de ADNmt fue similar o más corto que el necesario para que se normalizara la hiperlactemia (intervalo de 0,5 - 2,1 mmol/L). En varios casos, la recuperación del ADNmt precedió a la recuperación de la carga viral plasmática (datos no mostrados). Basándose en los datos disponibles limitados de ADNmt / ADNn, se calculó que la semivida máxima del ADNmt oscilaba desde 4,5 semanas (paciente 3) hasta 8 semanas (paciente 4) y se calculó que el tiempo de duplicación por dos máximo del ADNmt oscilaba desde 4 (paciente 5) hasta 16 semanas (paciente 1). Cortos periodo sin tratamiento (tal como se observó para los pacientes 3, 4, 7), así como niveles de fármaco circulante extremadamente bajos (pacientes 4, 6, 7) también afectaron a los niveles de ADNmt de manera ascendente. Basándose en los datos disponibles, el tiempo máximo sin fármacos antes de que los niveles de lactato volvieran al intervalo normal varió desde 4 semanas (paciente 8) hasta 28 semanas (paciente 5). Además, los niveles de lactato permanecieron dentro del intervalo normal durante los meses posteriores a la reanudación de los tratamientos que incluyeron 3TC + abacavir (ABA) o zidovudina (AZT). La diferencia entre los niveles de lactato venoso con y sin tratamiento antirretroviral no alcanzó importancia (tabla 3). Esto se debe lo más probablemente al lapso de tiempo entre los cambios en el tratamiento y los cambios en los niveles de lactato, un lapso que también estaba presente entre los cambios en las razones de ADNmt / ADNn y los niveles de lactato. (Véase la figura 2, pacientes 1 y 4).

25  
 Tabla 1. Características de los ocho pacientes con toxicidad mitocondrial sintomática y sus regímenes de tratamiento antirretroviral.

Paciente	Edad / sexo	Antes de detener el tratamiento			Sin tratamiento		Tras reanudar el tratamiento	
		Régimen farmacológico <sup>a</sup>	Tiempo con D4T <sup>a</sup> (semanas)	Último pVL de VIH-1 <sup>b</sup> (copias/mL)	Tiempo sin tratamiento (semanas)	Mayor pVL de VIH-1 (copias/mL)	Régimen farmacológico	Tiempo hasta pVL de VIH-1 < 50 copias/mL (semanas)
1	47/M	D4T/DDI/3TC/ABA/HU	175	<50	13	223.000	SAQ/RIT/NEV	12
2	41/M	D4T/DDI/3TC/SAQ/DEL/NEL/NEV/ABA/HU	144	<50	45+	178.000	N/A	N/A
3	44/M	D4T/DDI/3TC/ABA	59	90	15	177.000	3TC/ABA/NEV/ABR	18
4 <sup>d</sup>	48/M	D4T/3TC/SAQ/RIT	58	<50	17	584.000	3TC/ABA/NEV/ABR	20
5	41/M	D4T/DDI/EFV	33	<50	17	425.000	3TC/SAQ/RIT/EFV	17
6	57/M	D4T/DDI/EFV	33	<50	17	750.010	AZT/3TC/SAQ/RIT/EFV	17
7	44/M	D4T/DDI/3TC/SAQ/IND/NEV/ABA/ABR	192	<50	28+	63.300	N/A	N/A
8	43/M	D4T/INDIDEL	143	<50	26+	138.000	N/A	N/A

- a) Tiempo en el que al paciente se le ha recetado continuamente D4T como parte de su régimen farmacológico, antes de detener el tratamiento.
- b) Última carga viral plasmática antes de detener la administración de antirretrovirales.
- c) Las abreviaturas utilizadas son: D4T, estavudina; DDI, didanosina; 3TC, lamivudina; ABA, abacavir; SAQ, saquinavir; IND, indinavir; RIT, ritonavir; NEL, nelfinavir; ABR, lopinavir; DEL, delavirdina; NEL, nelfinavir; EFV, efavirenz; HU, hidroxiurea.
- d) Paciente coinfectado con el virus de la hepatitis C.
- e) Tabla 2. Razones de ADN mitocondrial / ADN nuclear medidas para los diferentes grupos

## ES 2 269 690 T3

	Estado de VIH / estado de antirretrovirales	N° (número de ADNmt / ADNn)	ADNmt / ADNn	
			media ± D.E.	(intervalo)
5	negativo para VIH	24 (24)	1,283 ± 0,377	(0,766 - 2,441)
	positivo para VIH / sin recibir antirretrovirales	47 (47)	0,717 ± 0,189	(0,368 - 1,098)
	positivo para VIH con TM / con tratamiento	8 (37)	0,392 ± 0,143	(0,184 - 0,856)
10	positivo para VIH con TM / sin tratamiento	8 (17)	0,712 ± 0,203	(0,394 - 1,228)
	positivo para VIH con TM / sin D4T	8 (38)	0,698 ± 0,171	(0,394 - 1,228)
15	a) N = número de individuos dentro de un grupo dado, el número de ADNmt / ADNn se refiere al número de puntos de datos individuales considerados en el cálculo del valor medio por ese grupo			
20				

Los datos con tratamiento son los reunidos mientras que los pacientes estaban tomando su último régimen desde ≥ 1 mes.

Sin tratamiento significa sin ningún antirretroviral.

Sin D4T significa sin ningún antirretroviral y/o con tratamiento de ARV que no incluye D4T.

TABLA 3

Comparación de valores medios	Datos comparados	Valor de P <sup>a</sup>
Negativo para VIH frente a 8 pacientes con TM / con ARV	Razón de ADNmt / ADNn	< 0,001
Negativo para VIH frente a positivo para VIH / sin recibir ARV	Razón de ADNmt / ADNn	< 0,001
Positivo para VIH / sin recibir ARV frente a 8 pacientes con TM / con ARV	Razón de ADNmt /ADNn	< 0,001
8 pacientes con TM / con ARV frente a sin D4T	Razón de ADNmt / ADNn	0,016
8 pacientes con TM / sin ARV frente a sin ningún ARV	Razón de ADNmt / ADNn	0,008
8 pacientes con TM / con ARV frente a sin ARV	Lactato	0,313
8 pacientes con TM / con ARV frente a sin D4T	Lacto	0,109
a) Determinado mediante la prueba de Wilcoxon de los rangos con signo		

### Ejemplo 2

En un aspecto, se ha encontrado que los ensayos de la invención pueden utilizarse sobre tejidos *post-mortem* para proporcionar información relativa a la insuficiencia orgánica caracterizada por el daño mitocondrial. En este ejemplo, el análisis *post-mortem* de los tejidos se correlacionó bien con la causa de la muerte. En un caso en el que la causa de la muerte fue acidosis láctica y esteatosis hepática, las razones de ADNmt / ADNn se redujeron en el hígado en comparación con las muestras control VIH+ y VIH-. En un caso en el que estaba presente insuficiencia renal en el momento de la muerte, las razones de ADNmt / ADNn se redujeron significativamente en los tejidos renales en comparación con los controles.

## Bibliografía

- Anderson CM, Clevenger W, Decker DK y Graho K. Modulation of mitochondrial Mass and Function for the treatment of diseases and for target and drug discovery. Documento WO 01 /35096 presentado por Mitokor el 13 de noviembre de 2000 y publicado el 17 de mayo de 2001.
- Amaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, DiMauro S, Schon EA. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced miopathy. *Lancet* 1991; 337:508-510.
- Bartley PB, Westacott L, Boots RJ, Lawson M, Potter JM, Hyland VJ, *et al.* Large hepatic mitochondrial DNA deletions associated with L-lactic acidosis and highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15:419-420.
- Berger A, Bruschek M, Grethen C, Sperl W, Kofler B. Poor storage and handling of tissue mimics mitochondrial DNA depletion. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10:55-59.
- Brinkman K, Editorial response: Hyperlactatemia and hepatic steatosis as features of mitochondrial toxicity of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Clin Infect Dis* 2000; 31:167-169.
- Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA, Reiss P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 1999; 354:1112-1114.
- Brinkman K, Hadewynch JM, ter Hofstede HJM, Burger DM, Smeitink JAM, Koopmans PP. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998; 12:1735-1744.
- Chen C-H, Vázquez-Padua M, Cheng Y-C. Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogues on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity. *Mol Pharmacol* 1991; 39:625-628.
- Church YA, Mitchell WG González - Gómez I, Christensen J, Vu TH Dinauro S y Bolés RG. Mitochondrial DNA depletion, near-fatal metabolic acidosis, and liver failure in an VIH- infected child treated with combination antiretroviral therapy. *J. Pediatrics* 2001; 138 (5): 748-751.
- Fortgang IS, Belitsos PC, Chaisson RE, Moore RD. Hepatomegaly and steatosis in VIH-infected patients receiving nucleoside analog antiretroviral therapy. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1433-1436.
- Fouty B, Frerman F, Reeves R. Riboflavin to treat nucleoside analogue-induced lactic acidosis. *Lancet* 1988; 352:291-292.
- Gerard Y, Maulin L, Yazdanpanah Y, de la Tribonniere X, Amiel C, Maurage CA, *et al.* Symptomatic hyperlactatemia: an emerging complication of antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14:2723-2730.
- Haas RHA. Comparison of genetic mitochondrial disease and nucleoside analogue toxicity. *Ann NY Acad Sci* 2000; 918:247-261.
- Harris M, Tesiorowski A, Chan K, Hogg R, Rosenberg F, Chan Yan C, *et al.* Lactic acidosis complicating antiretroviral therapy: frequency and correlates. *Antiviral Ther* 2000; 5 (Supl 2):31 (resumen nº 34).
- Harris M, Tesiorowski A, Thompson C, Kiess M, Rosenberg F, Chan Yan C, *et al.* *Antiviral Ther* 2000; 5(Supl 2): 31 (resumen nº 35).
- John M, Moore CB, James IR, Nolan D, Upton RP, McKinnon EJ, *et al.* Chronic hyperlactatemia in VIH-infected patients taking antiretroviral therapy. *AIDS* 2001; 15:717-723.
- Kakuda TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther* 2000; 22(6):685-708.
- Kakuda TN, Brundage RC, Anderson PL, Fletcher CV. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity as an etiology for lipodystrophy. (1999) *AIDS* 1999; 13:2311-2312.
- Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Med* 1995; 1:417-422.
- Lewis W, González B, Chomyn A, Papoian T. Zidovudine induces molecular, biochemical, and ultrastructural changes in rat skeletal muscle mitochondria. *J Clin Invest* 1992; 89:1354-1360.
- Lonergan JT, Behling C, Pfander H, Hassanein TI Mathews WC. Hyperlactatemia and hepatic abnormalities in 10 human immunodeficiency virus-infected patients receiving nucleoside analogue combination regimens. *Clin Infect Dis* 2000; 31:162-166.

**Martin JL, Brown CE, Matthews-Davis N Reardon JE.** Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and Mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2743-2749.

**Medina DJ, Tsai C-H, Hsiung GD, Cheng Y-C.** Comparison of mitochondrial morphology, mitochondrial DNA content, and cell viability in cultured cells treated with three anti-human immunodeficiency virus dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1824-1828.

**Megarbane B, Brivet F, Guérin JM, Baud FJ.** Acidose lactique et défaillance multi-viscérale secondaire aux thérapies antirétrovirales chez les patients infectés par le VIH. *La Presse Med* 2000; 40:2257-2264.

**Moraes CT, Kenyon L, Hao H.** Mechanisms of human Mitochondrial DNA maintenance: The determining role of primary sequence and length over function. *Mol Biol Cell* 1999; 10:3345-3356.

**Moyle G.** Clinical manifestation and management of antiretroviral nucleoside analog-related mitochondrial toxicity. *Clin Ther* 2000; 22:911-936.

**Pan-Zhou X-R, Cui L, Zhou X-J, Sommadossi J-P, Darley-Usmar VM.** Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:496-503.

**Shadel GS, Clayton DA.** Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Ann Rev Biochem* 1997; 66:409-435.

**Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC.** Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:1360-1365.

**Tang Y, Schon EA, Wilichowski E, Vázquez-Memije ME, Davidson E, King MP.** Rearrangements of human mitochondrial DNA (mtDN): New insight into the regulation of mtDNA copy number and gene expression. *Mol Biol Cell* 2000; 11:1471-1485.

**Wallace DC.** Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* 1999; 283:1482-1488.

**Zheng H, Cooney DA, Sreenath A, Zhan Q, Agbaria R, Stowe EE, Fornace AJ y Johns DG.** Quantitation of mitochondrial DNA in human lymphoblasts by a competitive polymerase chain reaction method: application to the study of inhibitors of mitochondrial DNA content. *Mol Pharmacol* 1994; 46(6): 1063-1069.

## 35 Conclusión

Aunque en el presente documento se han descrito realizaciones de la invención, pueden hacerse muchas adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención según el conocimiento general común de los expertos en esta técnica. Tales modificaciones incluyen la sustitución de equivalentes conocidos para cualquier aspecto de la invención con el fin de lograr el mismo resultado sustancialmente de la misma forma. Los intervalos numéricos son inclusive de los números que definen el intervalo. En la memoria descriptiva, la palabra “que comprende” se utiliza como un término abierto, sustancialmente equivalente a la frase “incluyendo, pero sin limitarse a” y la palabra “comprende” tiene un significado correspondiente. La mención de la bibliografía en el presente documento no se interpretará como un reconocimiento de que tal bibliografía es técnica anterior para la presente invención. La invención incluye todas las realizaciones y variaciones sustancialmente tal como se han descrito anteriormente en el presente documento y con referencia a los ejemplos y los dibujos.

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para monitorizar la toxicidad de un tratamiento con un fármaco precursor de ácido nucleico, que comprende medir el contenido de ADN mitocondrial con relación a la cantidad de ADN nuclear en células en una muestra de sangre periférica de un sujeto que se somete a tratamiento con el fármaco.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de determinar si la razón de ADN mitocondrial con respecto al ADN nuclear cae por debajo de un nivel predeterminado de 0,5 de una razón inicial, en la que la razón inicial se mide antes de que el sujeto se trate con el fármaco, o se mide en un sujeto control.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el nivel predeterminado es 0,45 de la razón inicial.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el nivel predeterminado es 0,40 de la razón inicial.
- 15 5. Método según la reivindicación 2, en el que el nivel predeterminado es 0,35 de la razón inicial.
6. Método según la reivindicación 2, en el que el nivel predeterminado es 0,30 de la razón inicial.
- 20 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cantidad de ADN se mide mediante una reacción en cadena de la polimerasa.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, en la que la amplificación del ADN mitocondrial se compara con la amplificación de un ADN de referencia.
- 25 9. Método según la reivindicación 7, en el que la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, en la que se detecta un producto de la amplificación con una sonda de hibridación.
- 30 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fármaco es un análogo de nucleósido o nucleótido.
11. Método según la reivindicación 10, en el que el análogo de nucleósido se selecciona del grupo que consiste en AZT, ddI, ddC, d4T, 3Tc, Abacavir y D4T.
- 35 12. Método según la reivindicación 10, en el que el análogo de nucleósido es D4T.
13. Método según la reivindicación 10, en el que el análogo de nucleótido se selecciona del grupo que consiste en Tenofovir y Cidofovir.
- 40 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fármaco es un inhibidor de la transcriptasa inversa.
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el sujeto es un paciente humano.
- 45 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el sujeto es un animal no humano.
17. Método según la reivindicación 15, en el que el sujeto está padeciendo una infección por VIH.
- 50 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la consecuencia de dicha toxicidad se escoge del grupo que consiste en miopatía, cardiomiopatía, neuropatía, esteatosis hepática, toxicidad nefrótica, pancreatitis, disminución de la fosforilación oxidativa, acidosis láctica, anomalías lipídicas, hiperlactemia, bajo umbral anaerobio en pruebas cardiopulmonares, fatiga y rápida pérdida de peso.

Figura 1

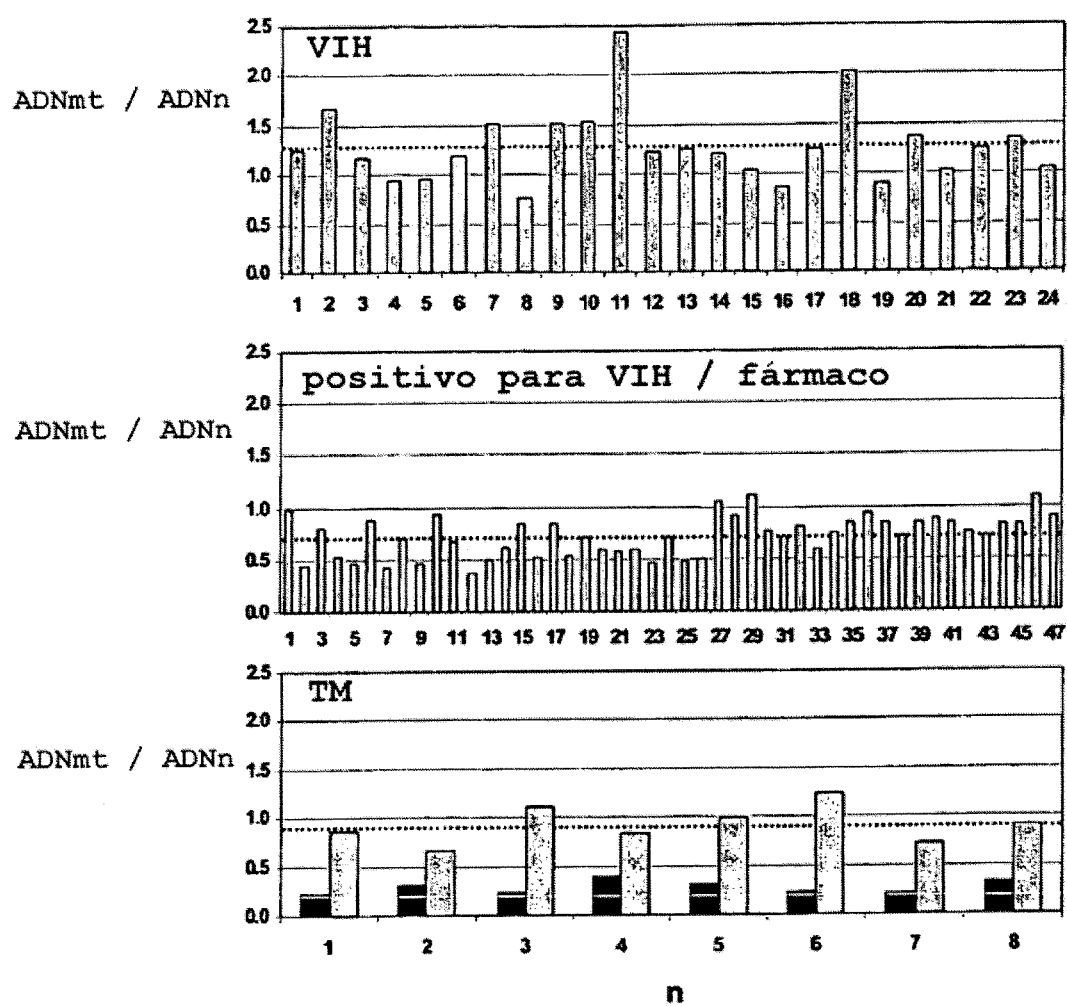
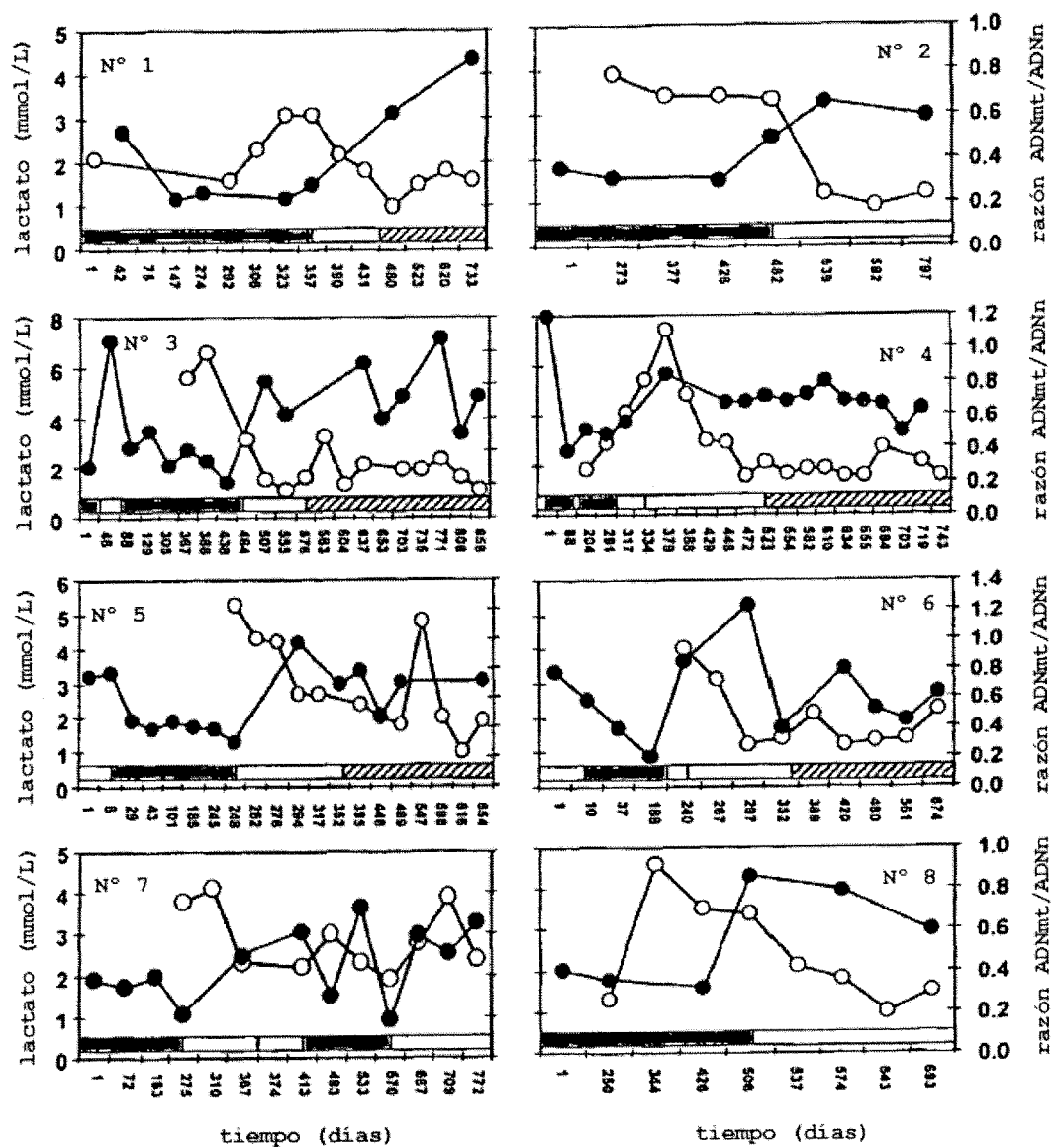


Figura 2





**Figura 3**

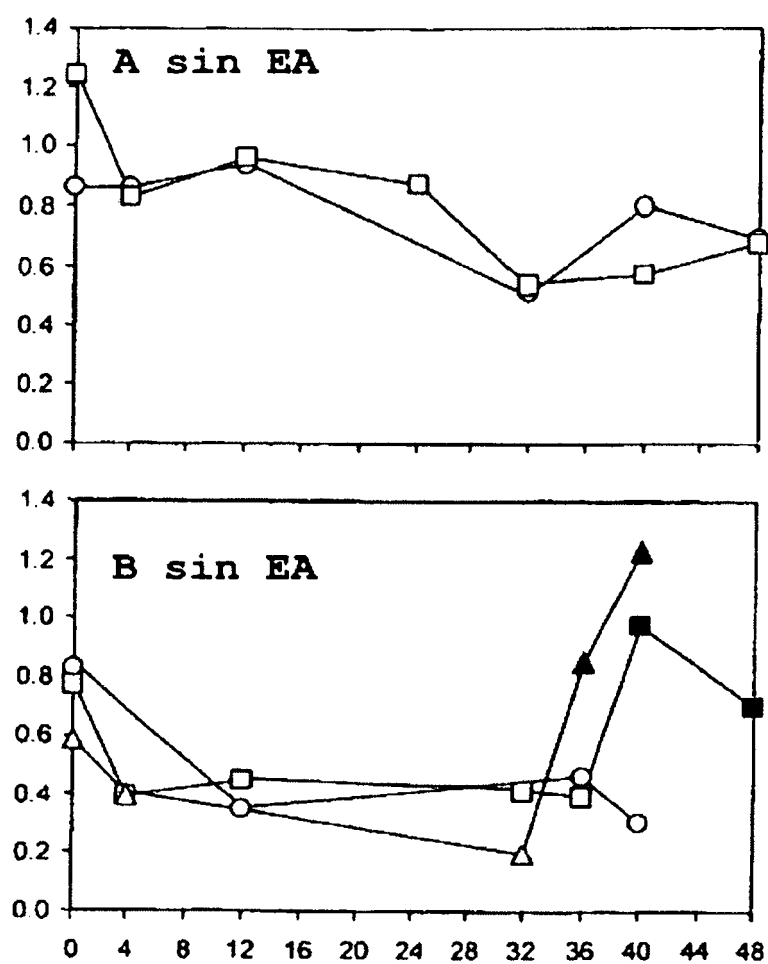


Figura 4

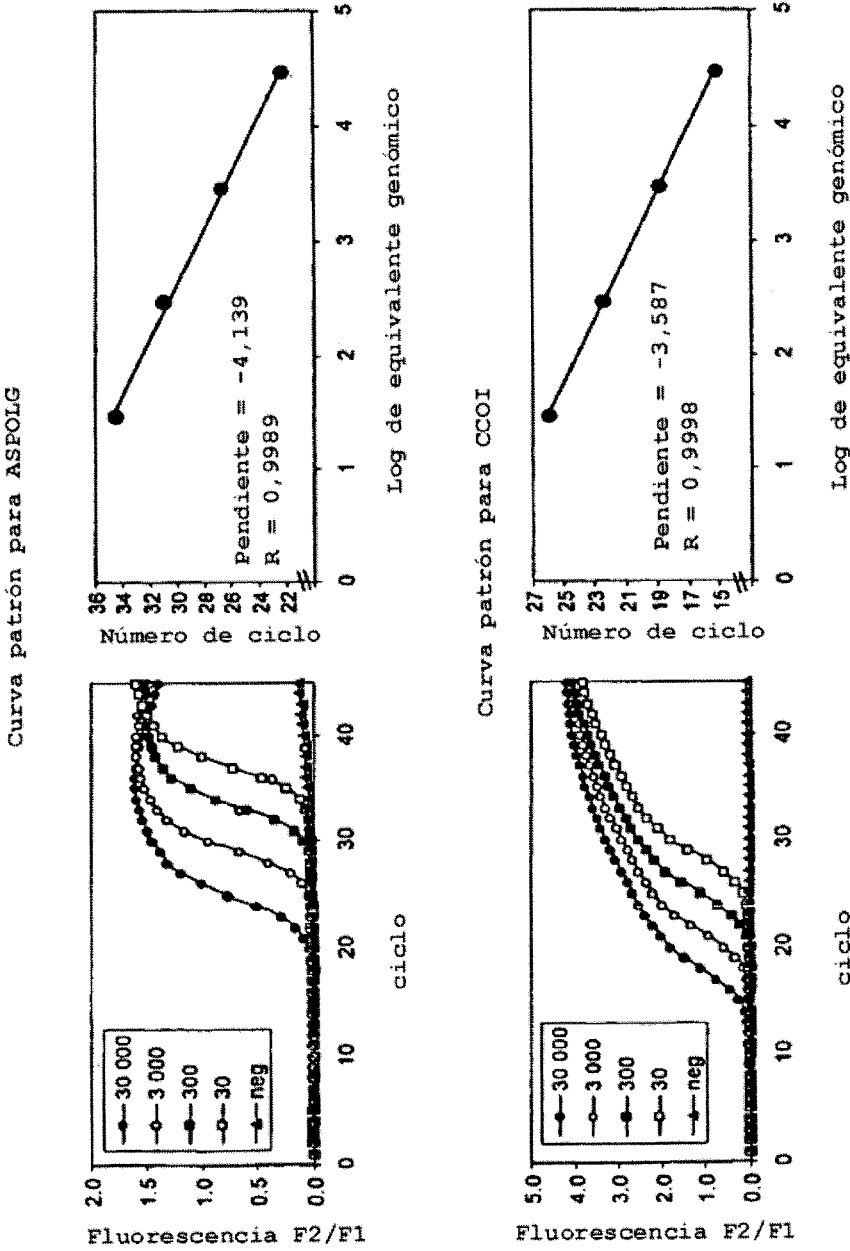
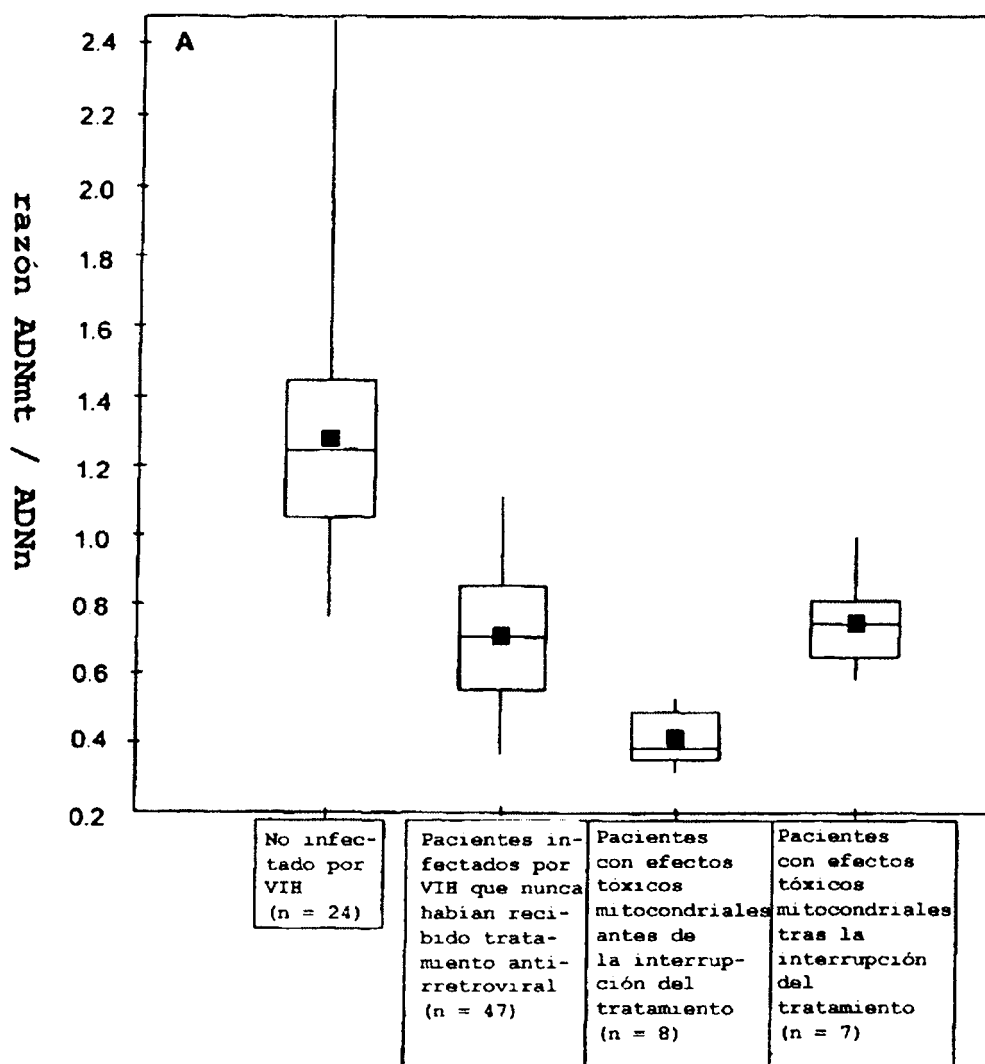


Figura 5



# ES 2 269 690 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> UNIVERSIDAD DE LA COLUMBIA BRITÁNICA	
	COTE, Helene	
5	MONTANER, Julio	
	O'SHAUGHNESSY, Michael	
	<120> PHARMACOLOGICAL APPLICATIONS OF MITOCHONDRIAL DNA ASSAYS	
10	<130> 80021-367	
	<140> PCT/CA02/00796	
15	<141> 29-05-2002	
	<150> US 60/293.523	
	<151> 29-05-2002	
20	<160> 8	
	<170> PatentIn versión 3.1	
25	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
35	<400> 1	
	ttcgccgacc gttgactatt	20
40	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 2	
	aagattatta caaatgcatg ggc	23
55	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
65	<220>	
	<221> característica heterogénea (misc_feature)	

## ES 2 269 690 T3

	<222> (22)..(22)	
	<223> marcado en 3' con fluoresceína	
5	<400> 3	
	gccagccagg caaccttcta gg	22
10	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
20	<220>	
	<221> característica heterogénea	
	<222> (1)..(1)	
	<223> marcado en 5' con LC Red640	
25	<220>	
	<221> característica heterogénea	
	<222> (29)..(29)	
30	<223> extremo 3' bloqueado con fosfato	
	<400> 4	
35	aacgaccaca tctacaacgt tatcgtcad	29
	<210> 5	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
50	gagctgttga cggaaggag	20
	<210> 6	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 6	
65	cagaagagaa tcccggctaa g	21

## ES 2 269 690 T3

	<210> 7	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
10	<220>	
	<221> característica heterogénea	
	<222> (27)..(27)	
15	<223> marcado en 3' con fluoresceína	
	<400> 7	
20	gaggcgctgt tagagatctg tcagaga	27
	<210> 8	
	<211> 25	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<220>	
	<221> característica heterogénea	
35	<222> (1) .. (1)	
	<223> marcado en 5' con LC Red640	
40	<220>	
	<221> característica heterogénea	
	<222> (25) .. (25)	
	<223> extremo 3' bloqueado con fosfato	
45	<400> 8	
	ggcatttcct aagtggaagc aagca	25
50		
55		
60		
65		