



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 343**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05010944 .6**

96 Fecha de presentación : **20.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1724587**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Método para la determinación de factores de riesgo cardiovasculares en sangre desecada.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **GermediQ Forschungs- und
Entwicklungsgesellschaft mbH
König-Heinrich-Weg 48
22459 Hamburg, DE**

72 Inventor/es: **Schwedhelm, Kathrin;
Maas, Heidemarie y
Boger, Gerhild**

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 343 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

La presente invención está en el campo de los métodos para la determinación de factores de riesgo cardiovascular y factores protectores en muestras biológicas.

5 Los factores de riesgo cardiovascular incluyen L-arginina (ARG), argininas y lisinas metiladas, isoprostanos, derivados y metabolitos de isoprostanos, enzimas como matrixmetaloproteinasas (MMPs), o vitaminas. Sin embargo, debe entenderse que este listado es a título de ejemplo y de ninguna forma completo.

10 Entre los factores de riesgo cardiovascular, las argininas metiladas y los inhibidores endógenos dimetilarginina asimétrica (ADMA) y monometil arginina (MMA) son especialmente importantes. Su importancia se basa en el hecho de que son esenciales para la regulación de la síntesis del óxido nítrico (NO) en el cuerpo humano. A su vez, NO es esencial en diversos escenarios fisiológicos, por ejemplo homeostasis del sistema cardiovascular. El desequilibrio del suministro y necesidad de NO es visto como el paso inicial para cambios patofisiológicos que eventualmente conducen a dolencias cardiovasculares como aterosclerosis, hipertensión, y problemas tromboembólicos. La evidencia acumulada sugiere que tal desequilibrio de NO de homeostasis está principalmente ligado a ADMA. ADMA y MMA se originan de la metilación de arginina de una proteína, se liberan de las proteínas durante la degradación de la proteína. Hasta ahora, se ha visto que el ADMA circulante se altera en pacientes que sufren enfermedades cardiovasculares. Se encuentran elevadas concentraciones de ADMA en plasma en varios escenarios clínicos que van desde fallos renales a aterosclerosis, diabetes por hipertensión, preeclampsia, enfermedad de alzheimer o incluso depresión o esquizofrenia. Además, en pacientes con enfermedad cardiovascular elevadas concentraciones de ADMA en plasma predicen independientemente la progresión de aterosclerosis y la mortalidad.

20 Todas las técnicas analíticas actualmente aplicadas para la determinación de factores de riesgo cardiovascular descansan en la detección de estos factores en muestras de plasma, suero y orina. En muestras de sangre y orina humanas, se han evaluado los parámetros ARG, ADMA, SDMA y MMA conjuntamente con los parámetros bioquímicos tales como la proteína C-reactiva (CRP), isoprostanos, MMPs, Mieloperoxidasa, HDL, LDL o colesterol total para valorar el riesgo cardiovascular (Sydow: Z Kardiol 2001, Böger: Cardiovasc Res 2003, Ridker: Am J Cardiol 2003, Schwedhelm: Clin Chem Lab Med 2003). Sin embargo, el uso de sangre humana requiere separación rápida de los constituyentes de la sangre celular para obtener suero o plasma y por ello evitar la degradación de la muestra. Así, se requieren etapas de preparación de muestra que necesitan equipo adicional en el lugar de la obtención de la muestra, tal como centrifugadoras, pipetas, refrigeradores, etc. La necesidad de preparación de muestra hace que la toma de muestra sea compleja y requiera largo tiempo.

30 Los métodos más eficaces y preciso hoy utilizados para cuantificar la ARG y sus análogos metilados se basan en LC-MS o LC-MS/MS, aunque se han desarrollado otros varios métodos para determinar estos importantes factores de riesgo cardiovascular: espectrofotometría, electroforesis capilar, cromatografía líquida, GC-MS o ensayos inmunológicos como ELISA. El equipo para LC-MS o LC-MS/MS está disponible solamente en pocos grandes laboratorios. En consecuencia, las muestras de sangre humana tienen normalmente que ser enviadas desde la oficinas de los médicos o farmacias al laboratorio lo que da lugar a que las muestras sean enviadas en estado congelado lo cual hace la etapa de preparación de muestra crucial para la calidad del análisis.

35 Debido a la importancia de ARG y sus análogos metilados como factores de riesgo cardiovascular, existe una necesidad de un método robusto de preparación de muestras que evite la degradación de los analitos antes de la cuantificación en el laboratorio clínico químico y que permita que un gran número de muestras sea obtenido de forma rutinaria.

40 Es en consecuencia objeto de la invención superar las limitaciones del estado de la técnica y desarrollaron simple pero eficaz método para la determinación de factores de riesgo cardiovascular en muestras biológicas.

Es un objeto adicional de la invención ofrecer medios apropiados para llevar a cabo el el método simple pero eficaz.

45 El primer objeto de la invención se resuelve por el hecho de que el método comprende las etapas de a) toma de muestra, b) alterar la muestra a una muestra de sangre seca, c) llevar a cabo una preparación de muestra donde sea apropiado y d) analizar la muestra. Alterar la muestra a una muestra de sangre seca resuelve especialmente el primer objeto de la invención. Las muestras de sangre seca en sí mismas se conocen desde que R. Guthrie usó filtros para recoger y secar sangre humana de recién nacidos para análisis subsiguientes de fenilalanina para la detección de fenilcetonuria (PKU). Desde entonces, el uso de muestra de sangre seca se ha extendido desde la inspección de recién nacidos a la investigación virológica y epidemiológica. Se ha usado la sangre seca para la detección de trastornos del metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácidos grasos y ácidos orgánicos, para controlar la infección y la eficacia del tratamiento antibiótico (CRP en puntos de sangre seca de pacientes con fibrosis quística, Córdón SM: J Immunol Methods 1991), homocistinuria (homocisteína en puntos de sangre seca de recién nacidos: Febriani AD: Pediatr Int 2004) y PKU (aminoácidos/acilcarnitinas en puntos de sangre seca de recién nacidos; Chace DH: Clin Chem 2003).

55 Esto principalmente en cuanto a la naturaleza de los analitos investigados y los problemas científicos subyacentes. Respecto a la inspección de recién nacidos o a trastornos del metabolismo de aminoácidos, es más importante obtener la información cualitativa sobre la concentración absoluta lo que requiere conocimientos y técnicas complejas. Además, los analitos en las determinaciones del estado de la técnica muestran una concentración

bastante alta en comparación con factores de riesgo cardiovascular como ADMA. Por ejemplo, las concentraciones de ADMA son normalmente de unos 0,5 $\mu\text{mol/L}$ mientras que se encuentra que la fenilalanina está en 30-100 $\mu\text{mol/L}$ en niños sanos en comparación a 1,2 mmol/L en pacientes con fenilcetonuria. Eso significa que dicha inspección tal como se usa por el estado de la técnica empleando sangre seca requiere diferenciación de incrementos de 10 a 60 veces en el analito. En contraste, los factores de riesgo cardiovascular tales como ADMA pueden aumentarse en un factor tan pequeño como 1,3-1,5 y aún indicar un riesgo elevado, haciendo necesarios complicados ajustes del estado de la técnica tales como los descritos en la presente invención para compensar por esto.

Una persona experta en la técnica no habría tenido en cuenta el uso de sangre seca para la determinación de factores de riesgo cardiovascular, especialmente ADMA. La razón para esto es que durante el proceso de desecación de la muestra de sangre, la concentración de ADMA en el plasma cambia debido a una lisis parcial de las células de sangre que conduce a una liberación de ADMA anteriormente contenida en las células. Dado que la concentración de diversos analitos en plasma o suero es diferente a la de los mismos en células sanguíneas, tal lisis llevaría a valores erróneos o variables de las concentraciones de ADMA en plasma o suero. Por ello, el experto en la técnica habría confiado en las muestras de plasma o suero para la determinación de la concentración de ADMA. Además, una mancha de sangre desecada es en general un espécimen altamente impreciso comparado con líquidos tales como sangre, plasma u orina. Esto se debe al hecho de que la cantidad de sangre en la mancha de sangre es una función del hematocrito, diámetro de la mancha de sangre, grado de saturación y grado de hemólisis.

Normalmente, una mancha de sangre antes de la desecación tiene un volumen de solamente 20 a 40 μl . Usar muestra de sangre seca haría complicada la medición de los factores de riesgo cardiovascular.

Particularmente, si la etapa b) del método inventivo comprende la hemólisis de la muestra completa de sangre y/o una inhibición de enzimas y/o una inhibición de actividad proteolítica y/o un impedimento para oxidación, la desventaja de valores erróneos o variables de las concentraciones en plasma/suero de los analitos es evitada ventajosamente. Permitir a la muestra pasar una hemólisis completa está en contraste con el estado de la técnica, ya que la hemólisis se ve generalmente como una fuente de error y por ello los métodos del estado de la técnica tratan de evitarlo rigurosamente. En contraste con esta concepción, la prestación inventiva de hemólisis completa de la muestra de sangre resulta en valores ventajosamente estables. La razón para esto es que la invención cambia la base de referencia para el cálculo de la concentración de ADMA. Gracias a la hemólisis controlada, por ejemplo mediante uso de una sustancia detergente como Triton X100, el ADMA contenido en las células sanguíneas se libera, de forma que la suma de concentraciones de ADMA en plasma y en células sanguíneas es ventajosamente determinada. Esto da lugar a mayores concentraciones de ADMA, reduciendo los requisitos para el método de detección usado. Este cambio de la base de referencia permite una medición más precisa de la concentración exacta de ADMA. Desde un punto de vista científico, el cambio de la base de referencia para el cálculo es admisible. Independientemente de su origen, el ADMA muestra efectos fisiológicos y además, el ADMA contenido en plasma puede ser simplemente un "desbordamiento" del ADMA retenido en las células.

Muchos componentes estudiados como factores de riesgo tienden a degradarse si se conservan a temperatura ambiente o al aire. La determinación de ARG en muestras de sangre humana es posible con mayor corrección, si se inhiben enzimas de degradación de ARG durante la etapa b) del método inventivo. La presencia de arginasas conduce a una rápida disminución de concentraciones de ARG especialmente cuando la muestra se almacena a temperatura ambiente. Esto ocurre también en el proceso de desecado y puede conducir a valores bajos falsos. Ventajosamente, por el uso de inhibidores de arginasa tales como, pero no limitados a, nor-N-hidroxiarginina (nor-NOHA) habrá una inhibición de enzimas. Por ejemplo, el uso de 20 μM nor-NOHA es suficiente para bloquear la degradación de L-arginina y no interfiere con la determinación subsiguiente de L-arginina, ADMA o SDMA por LC-MS o ELISA. La inhibición de oxidación, especialmente la oxidación *ex vivo* de marcadores de tensión oxidativa como isoprostanos y sus metabolitos, conducirá ventajosamente a mediciones estables y precisas. La oxidación puede inhibirse eficazmente por uso de sustancias antioxidantes, como α -hidroxi-TEMPO y/o EDTA. Como las argininas metiladas se derivan de metilación de proteína con la subsiguiente disgregación proteolítica, es importante inhibir asimismo la actividad proteolítica en la muestra. Esto puede conseguirse usando un inhibidor de proteasa tal como pero no limitado a [concentraciones finales]: 1 mM de aprotinina de 0,15 unidades/ml + leupeptina 5 $\mu\text{g/mL}$ (10 μM), pepstatina 1 $\mu\text{g/mL}$, fluoruro sódico 1 mM.

En general, una "muestra" comprende muestras de sangre y derivados de sangre.

Los factores de riesgo cardiovascular a determinar son ADMA y/o SDMA y/o una combinación de ADMA y/o SDMA con al menos una sustancia del grupo que consiste de MMA, ARG, lisinas metiladas, isoprostanos, derivados y/o metabolitos de isoprostanos, enzimas, vitaminas, proteína C-reactiva, oxLDL, péptido natriurético tipo B (BNP), NT-pro-BNP, homocisteína o troponina T. Hasta ahora, solamente se determinan factores únicos de riesgo para investigar la ausencia o presencia de una enfermedad única. Al determinar en una muestra más de un factor de riesgo simultáneamente la invención ofrece la ventajosa posibilidad de obtener una propuesta más fiable de la probabilidad de una enfermedad cardiovascular. Tales puntuaciones de factores o marcadores seocen solamente de forma cualitativa, por ejemplo sobrepeso y tabaquismo son puntuaciones para enfermedades cardiovasculares. Además, el método inventivo puede fácilmente adaptarse para evaluar ADMA en combinación con otros factores de riesgo cardiovascular o factores protectores en varios fluidos corporales incluyendo sangre, orina y saliva.

5 En una realización de la invención, la etapa d) se realiza mediante el uso de al menos una de las siguientes técnicas de medición: espectrometría de masas, preferiblemente espectrometría tandem de masas, inmunoensayo, preferiblemente enzimático o radioinmunoensayo, ensayo basado en fluorescencia, ensayo basado en quimioluminiscencia. Ventajosamente, la presente invención permite una combinación de las técnicas de medición precisas, selectivas y sensibles antes mencionadas con la preparación de muestra de bajo gasto de acuerdo con la invención. Sin embargo, en particular asumiendo un progreso en tecnología analítica, otras técnicas pueden también permitir la evaluación de argininas metiladas u otros factores de riesgo cardiovascular como los mencionados antes en muestras de sangre desecada.

10 Dependiendo de la naturaleza de las muestras, se proporciona una preparación de muestra, preferiblemente consistente en una precipitación de proteína, particularmente una precipitación de disolvente que es fácil de manejar y que no altera la cuantificación subsiguiente. Preferiblemente, esta etapa opcional es automatizada. La automatización puede conseguirse usando cualquier método conocido por el experto en la materia.

15 El segundo objeto de la invención se soluciona mediante un filtro de sangre seca para poner en práctica el método antes descrito, que comprende al menos una sustancia del grupo que consiste en antioxidantes, coagulantes, desinfectantes, detergentes e inhibidores. Como se ha mencionado, estas sustancias dificultan ventajosamente una degradación o alteración de la muestra. Además, la adición de un desinfectante al papel de filtro permite el transporte de las manchas de sangre seca que se originan de manchas de material potencialmente infeccioso por servicio de correo ordinario. Tales desinfectantes pueden comprender, pero no están limitados a fenol y sus derivados como timol, o-polifenol; compuestos catiónicos como cloruro de benzalconio, clorhexidina; aldehidos como formaldehído u otros y alcoholes tales como n-propanol.

20 Una solución sencilla a este problema es el uso de diferentes tipos de papel de filtro y membranas que no son permeables a las células sanguíneas que causan una separación de las células y plasma por medio de cromatografía, filtración o fuerzas capilares. Por ejemplo el punto de filtro en el centro del filtro de sangre seca es permeable a las células sanguíneas mientras que el papel circundante no lo es.

25 Impregnar el papel de filtro con una sustancia que conduce a coagulación rápida sin lisis y destrucción de las células sanguíneas y el uso adicional de un simple indicador de color que permite la posterior identificación de áreas del papel de filtro fuera del coágulo de sangre donde solamente sangre libre de células (plasma/suero) se “difunden”. Por este método podrían fácilmente generarse e identificarse áreas de papel de filtro impregnadas solamente por plasma libre de células.

30 La combinación inventiva de técnicas de análisis de gama alta con bajo gasto en muestras de sangre seca permite un método inventivo para realizar ensayos de detección de factores de riesgo cardiovascular que comprende las etapas de a) obtener la muestra y alterar la muestra en una muestra de sangre seca en el lugar de muestreo, b) transportar la muestra de sangre seca a un lugar de análisis, c) analizar la muestra de sangre seca en el lugar de análisis y d) transmitir los resultados al lugar de muestreo para uso posterior. Ventajosamente, el lugar de muestreo no necesita estar equipado con costosos aparatos de análisis, el muestreo y la preparación de muestras son fáciles de manejar y no hay necesidad de tomar precauciones especiales durante el transporte. Los filtros de sangre seca pueden ser enviados por correo ordinario, incluso si en la muestra están contenidas sustancias de riesgo. Además, debido a la centralización del análisis, los operadores en los pocos lugares de análisis tienen la pericia tecnológica para garantizar mediciones de precisión y exactitud óptimas.

40 **Ejemplo 1**

Se recogió sangre capilar y se transfirió directamente a papel de recogida de especímenes (Schleicher & Schuell, 903™). El papel de filtro se secó y se sacó por perforación un círculo de 3 mm (diámetro). Los analitos fueron eluados desde el filtro de papel con 100 µl de estándar interno conteniendo metanol. Los eluados se filtraron a través de una membrana filtrante de 0,22 mm y se secaron. Los analitos fueron subsiguientemente convertidos a sus derivados ester butilo. Abreviando, se añadió 60 µl de cloruro de acetilo en 1-butanol (1:10, vol/vol) y se calentó a 65° durante 17 minutos. Después de completada la reacción, los derivados ester butilo se secaron de nuevo y se reconstituyeron en 200 µl de metanol/agua (1:1, vol/vol) y se sometieron a un análisis espectrométrico de masas. Se realizó el análisis espectrométrico de masas en un TSQ Quantum Discovery MAX (Termo Electrón, Dreieich, Germany) sistema LC-ESI-MS/MS. Se inyectaron 15 µl de muestras vía bucle (bucle de 50 µl) sin usar columna alguna. Se bombeó isocráticamente acetonitrilo/agua (80:20, vol/vol) conteniendo 0,1% de ácido fórmico a 0,2 mL/min a temperatura ambiente (23°C). El tiempo total de ejecución fue 2 min. Se usó nitrógeno como gas nebulizante y secante (350 °C). Para la ionización en electronebulización positiva la aguja de ionización (ESI+) y la tensión de blindaje se fijaron en 5000 y 400 V, respectivamente. Se controló la fragmentación de analitos (control reacción seleccionada, SRM) después de activación inducida por colisión (CIA) con argón (1,0 mTorr): la relación masa/carga (m/z) 231 a m/z 70 a 24 eV para L-arginina, m/z 259 a m/z 228a 18 eV para SDMA, m/z 259 a m/z 214 a 18 eV para ADMA, y, m/z 265a m/z 220 a 18 eV para estándar interno (ADMA hexadeuterado). Se encontró que los niveles de ADMA eran 0,91 +/- 0,2 µM, y los niveles de SDMA eran 0,32 +/- 0,08 µM (n=10).

55 **Ejemplo 2**

60 Se recogió sangre capilar y se transfirió directamente a papel de recogida de especímenes (Schleicher & Schuell, 903™). El papel de filtro se secó y se sacó por perforación un círculo de 5 mm (diámetro). Los analitos fueron

- eluidos desde el filtro de papel con 200 μ l de metanol/agua. Los eluidos se secaron bajo nitrógeno y se reconstituyeron en 50 μ L de agua. Las muestras se centrifugaron a 2000xg y se analizaron 20 μ L del sobrenadante usando un ensayo ELISA comercialmente disponible según las instrucciones del fabricante (DLD Diagnostika GMBH). Abreviadamente, se transfirieron 20 μ L de muestra a los pocillos de una placa de reacción de 96 pocillos.
- 5 Se añadieron a cada pocillo solución tampón de acilación (25 μ L) y la solución tampón de ajuste (25 μ L). La placa de reacción se incubó otra vez durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una alícuota (50 μ L) de las muestras pretratadas se transfirió a los pocillos de la placa de microtitulación y se añadió la solución antisuero (50 μ L) a cada pocillo. La placa de microtitulación fue subsiguientemente incubada durante 15-20 horas a 2-8 °C. Tras la incubación se eliminó la solución de cada pocillo y los pocillos se lavaron con solución tampón de lavado (250 μ L) cuatro veces.
- 10 A continuación la solución de conjugado de enzima (100 μ L) se añadió a cada pocillo y la placa de microtitulación se incubó durante una hora a temperatura ambiente en un vibrador horizontal. Luego los pocillos se lavaron de nuevo cuatro veces con la solución tampón de lavado. Después del lavado se añadió solución sustrato (100 μ L) y la placa de microtitulación se incubó durante 20-30 minutos. La reacción fue parada y se midió la densidad óptica a 450 nm (longitud de onda de referencia 570-650 nm)- Los niveles de ADMA encontrados fueron 0,74 +/- 0,0920 μ M (n=5).

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de factores de riesgo cardiovascular en muestras biológicas que comprende las etapas de
- 5 a) alterar la muestra a una muestra de sangre seca,
b) realizar una preparación de muestra donde sea apropiado, y
c) analizar la muestra
- 10 **caracterizado porque** los factores de riesgo cardiovascular a determinar es ADMA y/o SDMA y/o una combinación de ADMA y/o SDMA con al menos una sustancia del grupo que consiste en MMA, ARG, lisinas metiladas, isoprostanos, derivados y/o metabolitos de isoprostanos, enzimas, vitaminas, proteína C-reactiva, oxLDL, péptido natriurético tipo B, NT-pro-BNP, homocisteína o troponina T, en el que la etapa a) comprende una hemólisis completa de la muestra biológica.
- 15 2. Método de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado porque** la etapa c) se realiza por uso de al menos una de las siguientes técnicas de medición: espectrometría de masas, preferiblemente espectrometría tandem de masas, inmunoensayo, preferiblemente enzimático o radioinmunoensayo, ensayo basado en fluorescencia, ensayo basado en quimioluminiscencia.
3. Método de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado porque** la muestra biológica es una muestra de sangre completa.
4. Método de acuerdo a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la etapa a) comprende la muestra de sangre completa y/o una inhibición de enzimas y/o una inhibición de actividad proteolítica y/o un impedimento para oxidación.
- 20 5. Uso de un filtro de sangre seca para poner en práctica un método de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado porque** el filtro de sangre seca comprende al menos una sustancia del grupo que consiste en antioxidantes, coagulantes, desinfectantes, detergentes e inhibidores.
6. Uso de un filtro de sangre seca de acuerdo a la reivindicación 1, **caracterizado porque** comprende poros con tamaños desiguales de poro para separar células sanguíneas del plasma.