

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 536**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
A01N 1/00 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03773099 .1**
96 Fecha de presentación: **02.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1571970**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **DIAGNÓSTICO Y SUPERVISIÓN DE ENFERMEDADES.**

30 Prioridad:
02.10.2002 US 415908 P
21.07.2003 US 489039 P
15.09.2003 US 503185 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
DMI BIOSCIENCES, INC.
3601 SOUTH CLARKSON, SUITE 420
ENGLEWOOD, CO 80110, US

72 Inventor/es:
BAR-OR, David y
BAR-OR, Raphael

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 536 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

Diagnóstico y supervisión de enfermedades

Campo de la invención

5 La invención se refiere al diagnóstico y supervisión de Esclerosis Múltiple (MS) mediante la cuantificación de Asp-Ala DKP (DA-DKP), N-acetil-Ala-Ser DKP (NAS-DKP), N-acetil-Ala-fosforilada-Ser DKP, Arg-Arg DKP, Gln-Asn DKP. En particular, la invención se refiere a la detección y medición de las dicetopiperazinas Asp-Ala DKP (DA-DKP), N-acetil-Ala-Ser DKP (NAS-DKP), N-acetil-ala-fosforilada-Ser DKP, Arg-Arg DKP, Gln-Asn DKP.

Antecedentes

10 Siempre se necesitan ensayos más simples y rápidos para diagnosticar y supervisar enfermedades y afecciones médicas. Además, muchas enfermedades graves siguen siendo difíciles de diagnosticar y supervisar, y los procedimientos para diagnosticar y supervisar estas enfermedades o afecciones son críticamente necesarios.

Por ejemplo, la esclerosis múltiple (MS) es difícil de diagnosticar debido a que el avance, severidad y los síntomas específicos de MS son bastantes variables e impredecibles. No existen ensayos de laboratorio, síntomas ni descubrimientos físicos que puedan, por sí mismos, determinar si una persona posee MS.

15 Los criterios establecidos desde hace tiempo para diagnosticar MS son:

1. Debe haber evidencia objetiva de dos ataques (es decir, dos episodios de demielinación en el sistema nervioso central (CNS)). Un ataque (también conocido como una exacerbación, arrebato o recidiva) se define clínicamente como la aparición repentina o empeoramiento de un síntoma o síntomas de MS, que duran al menos 24 horas. La evidencia objetiva proviene de los hallazgos de un examen neurológico y ensayos adicionales.

2. Los dos ataques deben estar separados en tiempo (al menos un mes) y espacio (indicado por la evidencia de inflamación y/o daño en diferentes áreas del CNS).

25 3. No debe haber alguna otra explicación para estos ataques o los síntomas que la persona está experimentando. Muchos síntomas que son comunes en MS también pueden ser causados por otras enfermedades. Por ello, el diagnóstico de MS solamente puede realizarse mediante el descarte de posibilidades.

30 En los últimos veinte años, ensayos tales como imágenes por resonancia magnética (MRI), examen de fluido cerebroespinal, y ensayo de respuesta evocada han jugado un papel cada vez más importante en el proceso de diagnóstico. En el año 2001, el Panel Internacional sobre Diagnóstico de Esclerosis Múltiple emitió un conjunto revisado de criterios de diagnóstico (Annals of Neurology, 50:121-127 (2001)). Además de los requerimientos tradicionales aportados más arriba, los criterios revisados proporcionan lineamientos específicos para utilizar los hallazgos de MRI, análisis de fluido cerebroespinal y potenciales visuales evocados para proporcionar evidencia del segundo ataque y de ese modo confirmar el diagnóstico más rápidamente. Estos lineamientos también facilitan el proceso de diagnóstico en aquellos pacientes que poseen avance firme de discapacidad sin ataques precisos. Sin embargo, aún con estos criterios revisados, el diagnóstico de MS es aún difícil, y aún típicamente toma varios meses o aún años.

Debido a la posibilidad de empeoramiento o recurrencia de MS, hacer rápidamente un diagnóstico conclusivo sería muy beneficioso. Ahora están disponibles fármacos para el tratamiento de MS que reducen la velocidad o previenen el avance de la enfermedad en muchos pacientes, y un diagnóstico rápido permitiría la intervención temprana y podría mejorar significativamente el pronóstico para muchos pacientes con MS.

40 El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer es difícil y a menudo se basa en la exclusión de otras causas. Se emplean diversos ensayos cognitivos para identificar posiblemente la enfermedad. Sin embargo, un diagnóstico definitivo es sólo posible mediante una autopsia de cerebro después de la muerte. Claramente, se necesita un ensayo diagnóstico que pueda proporcionar un diagnóstico para pacientes vivos con enfermedad de Alzheimer.

45 La isquemia cerebral es actualmente un diagnóstico clínico. Aunque se han descrito ciertos marcadores bioquímicos, tales como Enolasa, familia S-100 de proteínas y otros, Las técnicas de imágenes disponibles para el médico clínico son más confiables y específicas. Un marcador bioquímico confiable y específico para la isquemia cerebral sería útil en el diagnóstico y supervisión de esta enfermedad.

50 La isquemia cardíaca temprana también es difícil de diagnosticar. Los marcadores cardíacos de necrosis celular, tales como isoenzimas de quinasa creatina (CK-MB), mioglobina, o troponina, son marcadores no confiables de isquemia transitoria de miocardio, particularmente cuando se mide en las primeras 2 a 6 horas después de un evento isquémico. Kontos, M.C. y R.L. Jesse, Am J Cardiol, 2000. 85 (5A): páginas 32B-39B; Ishikawa, Y., et al., Clin Chem, 1997. 43 (3): páginas 467-75; Brogan, G.X., Jr., et al., Acad Emerg Med, 1997. 4 (1): páginas 6-12; Hedges, J.R., et al., Acad Emerg Med, 1996. 3(1): páginas 27-33. Los pacientes que son examinados pronto después de la aparición de los síntomas isquémicos típicamente requieren observación prolongada para descartar infarto de miocardio o

isquemia de miocardio. Gomez, M.A., et al., J Am Coll Cardiol, 1996. 28(1): páginas 25-33; Zalenski, R.J., et al., Arch Intern Med, 1997. 157(10): páginas 1085-91; de Winter, R.J., et al., Ann Emerg Med, 2000. 35(2): páginas 113-20; Peacock, W.I., et al. Ann Emerg Med, 2000. 35(3): páginas 213-20.

5 Se ha descrito un nuevo procedimiento de ensayo de sangre para medir el cobalto exógeno reducido que se une a la albúmina de suero humano en pacientes con isquemia de miocardio. Bar-Or et al., J. Emerg. Med., 2000. 19 (4): páginas 311-5. El ensayo de unión de cobalto a albúmina (ACB) mide la capacidad de unión del cobalto exógeno al extremo terminal amino (extremo terminal N) de albúmina humana. En condiciones normales, los metales de transición, incluyendo cobalto, están estrechamente unidos al extremo terminal N expuesto de la albúmina. Kubal, G., P.J. Sadler, y A. Tucker, Eur J Biochem, 1994. 220(3): páginas 781-7. El ensayo ACB se basa en que las observaciones que las afecciones isquémicas pueden alterar el extremo terminal N de la albúmina y reducir rápidamente su capacidad de unión para metales de transición. Berenshtein et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 1997. 29(11): páginas 3025-34; Bar-Or et al., Eur. J. Biochem., 2001. 268(1): páginas 42-47. Se predecirían las alteraciones inducidas por isquemia a la albúmina minutos u horas antes de que se pudieran detectar niveles anormales de CK-MB, mioglobina, o troponina. Sin embargo, el ensayo ACB se ha aprobado solamente como un ensayo para descartar la isquemia cardíaca, y sería altamente deseable tener un ensayo que pudiera diagnosticar la isquemia, así como descartarla.

20 El bajo peso de nacimiento (LBW) es la principal causa de morbosidad fetal y neonatal en todo el mundo. El LBW en general es aceptado para indicar un peso menor que 2500 gramos en el nacimiento, y puede resultar de un recién nacido que nace en término pero pequeño para la edad gestacional (SGA), nacido en pretérmino y apropiado para la edad gestacional (AGA) o siendo de pretérmino y SGA. Como tal, la epidemiología de LBW es compleja y multifactorial.

25 SGA es una definición estadística, que indica que el peso de nacimiento es menor que el percentil 10 para la edad gestacional. Por definición entonces, el 10% de los recién nacidos son SGA. En la práctica, algunos de estos recién nacidos son pequeños y están bien, cumpliendo con su potencial de crecimiento genético, y no están en riesgo sustancial. Por otro lado, otros recién nacidos con SGA tienen verdadero deterioro en el crecimiento, no cumpliendo con el potencial de crecimiento genético debido a una variedad de factores según lo que se debate más abajo. Se dice que estos recién nacidos sufren de restricción del crecimiento fetal (FGR). En la práctica, algunos niños son presumiblemente AGA y sufren FGR; es decir su peso puede estar en el percentil 20 para la edad gestacional, pero fueron programados genéticamente para pesar en el percentil 80. Estos niños son difíciles de identificar en un sentido práctico, ya que no existe ninguna forma previa de saber cuanto "debería" pesar un individuo.

35 FGR lleva a LBW por deterioro directo del crecimiento fetal, y a menudo además por la necesidad del parto de pretérmino indicado debido al estado fetal comprometido o enfermedad materna asociada (por ejemplo, preeclampsia). La morbosidad debido a LBW y/o premadurez es variada y sustancial y está bien documentada en otros lados. Adicionalmente, datos recientes han sugerido que un medio intrauterino comprometido puede tener una influencia profunda en la salud en la vida adulta, la así denominada hipótesis de Barker u "orígenes fetales de enfermedad". A través de estos diversos mecanismos, la carga de enfermedad atribuible a FGR es enorme.

40 Si bien el feto/neonato es a menudo el foco de preocupación en los embarazos complicados por FGR, es importante recordar que estos embarazos también a menudo son complicados por condiciones que amenazan directamente la salud materna. Mucho más notablemente, la preeclampsia, cuya patofisiología precisa sigue siendo oscura, desde hace mucho tiempo se ha sentido que resulta de la isquemia placentaria. La preeclampsia y sus complicaciones son las causas principales de mortalidad materna en todo el mundo.

45 Si bien el diagnóstico diferencial de FGR es diverso, incluyendo etiologías cromosómicas, tóxicas, virales y otras etiologías, la mayoría de los casos resultan de insuficiencia uteroplacentaria (UPI). UPI puede estar asociada a una variedad de enfermedades maternas (hipertensión, enfermedad renal, lupus eritomatoso sistémico, síndrome antifosfolípido, trombofilia, etc.), complicaciones del embarazo (ruptura placentaria, preeclampsia), o puede ser idiopática. Sin importar la etiología, la supuesta patofisiología subyacente resulta del flujo reducido de sangre placentaria (isquemia) en la circulación materna o fetal, o ambas.

50 Como medida general, se sabe que hay una relación directa entre el peso placentario y el peso fetal, lo que sugiere que los recursos placentarios podrían controlar el crecimiento fetal en alguna medida. Existe un gran número de lesiones patológicas placentarias asociadas a FGR. En general, estas son lesiones que se esperaría que comprometan el flujo de sangre materno y/o fetal. La asociación entre el flujo de sangre materno y/o fetal reducido (isquemia) y FGR también será corroborada por una gran cantidad de datos de flujo de Doppler en embarazos afectados. En muchos casos, estas formas de onda de flujo Doppler anormales se correlacionan bien con la patología placentaria anormal.

55 Si bien se conoce mucho acerca de la patofisiología de FGR, mucho queda por ser entendido. En el medio clínico, aunque se reconocen diversos factores de riesgo para FGR, sus valores predictivos positivos y sensibilidades son limitados. Puede haber dificultad en la diferenciación del feto con FGR del feto con "SGA pero bien". Reconocer esta diferencia es importante para evitar intervenciones innecesarias en buenos embarazo. La identificación temprana de embarazos destinados a ser afectados por FGR podría ayudar a fomentar el seguimiento apropiado. El momento del

parto es también un tema de intenso interés, equilibrando los beneficios de la gestación avanzada contra aquellos de continuidad en un medio isquémico. Finalmente, en un nivel más fundamental, el acceso a un ensayo clínico para identificar la isquemia placentaria y cuantificar su severidad podría ayudar por último a fomentar el tratamiento apropiado o aún la prevención.

5 Según lo observado más arriba, el ensayo ACB para descartar la isquemia se basa en las observaciones de que las afecciones isquémicas pueden alterar el extremo terminal N de la albúmina de suero humano y rápidamente reducir su capacidad de unión para los metales de transición. La naturaleza de las alteraciones del extremo terminal N de la albúmina de suero humano que pueden explicar su reducida capacidad de unión al metal no se han identificado, pero se ha propuesto la escisión de 1-4 aminoácidos como una de las diversas posibilidades. Véase la solicitud PCT
10 WO 00/20840. En particular, se ha llegado a la hipótesis de que la escisión del dipéptido del extremo terminal N (Asp-Ala o DA) de la albúmina de suero humano y la ciclización del dipéptido para formar la dicetopiperazina (DA-DKP) puede explicar parcialmente la observación de la reducida unión del metal al extremo terminal N de la albúmina de suero humano en la isquemia. Bar-Or et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 84:856-862 (15 de junio de 2001). Sin embargo, este artículo no enseña o sugiere que DA-DKP puede utilizarse como un marcador de
15 isquemia.

La solicitud PCT WO 00/20454 divulga un marcador para el daño de radicales libres. El marcador es albúmina de suero humano cuyo sitio de unión metálica al extremo terminal N se ha modificado mediante el daño de radicales libres. La unión metálica reducida al extremo terminal N alterado se utiliza para detectar y medir el daño de radicales libres. Se proponen diversas modificaciones posibles del extremo terminal N de la albúmina de suero humano que
20 podrían explicar la reducida unión metálica, incluyendo la posibilidad de que el dipéptido del extremo terminal N (DA) sea escindido por los radicales libres y que este dipéptido entonces se ciclice para formar DA-DKP. Aunque la detección directa del extremo terminal N alterado de la albúmina de suero humano se sugiere como un procedimiento para detectar y medir el daño de radicales libres, la medición de la DA-DKP hipotética es enseñada o sugerida para este fin.

25 HisPro-DKP era un marcador de diagnóstico conocido (Jackson et al, 1986. Neurol, 36, 1218-1223). Se utilizó Cyclo(His-Pro) como marcador para esquizofrenia (Prasad et al, 1991. Neuropeptides, 20, 187-190). El documento WO02062797 divulga las dicetopiperazinas que inhiben la apoptosis y se dice que son útiles para muchas enfermedades incluyendo esclerosis múltiple.

El documento WO0211676 divulga las DKPs, incluyendo DA-DKP, que son útiles como compuestos terapéuticos
30 para una variedad de enfermedades probablemente mediante la unión a PAF y su receptor. La esclerosis múltiple no está detallada. Estos documentos ven las DKPs, incluyendo DA-DKP, como compuestos terapéuticos pero no como dianas terapéuticas.

El documento US4205057 divulga fragmentos de proteína encefalitogénicos de mielina en CSF como marcador de diagnóstico para esclerosis múltiple.

35 Se han detectado niveles elevados de histidina-prolina dicetopiperazina (HP-DKP) en trastornos neurológicos, incluyendo esquizofrenia no medicada y pacientes que sufren de esclerosis lateral amiotrófica (Prasad, Peptides, 1995 16:1 páginas 151-164), y en pacientes con falla renal (Takahara et al., J. Clinical Endocrinol. Metab. 1983 56:2 páginas 312-319). HP-DKP puede obtenerse de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) o su precursor (preproTRH) mediante mecanismos desconocidos y/o de otras fuentes (Prasad, Peptides, 1995 16:1 páginas 151-
40 164).

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de marcadores bioquímicos objetivos útiles para diagnosticar y supervisar diversas enfermedades y afecciones médicas. Los marcadores incluyen dicetopiperazinas compuestas de
45 dos aminoácidos en el extremo terminal N o los dos aminoácidos en el extremo terminal C de las proteínas asociadas a la enfermedad. La expresión "proteína" se utiliza en la presente memoria para significar proteína, polipéptido, oligopéptido o péptido, y la expresión "proteínas asociadas a la enfermedad" se utiliza en la presente memoria para significar proteínas asociadas a enfermedades o afecciones específicas, incluyendo proteínas de órganos o tejidos (proteínas "específicas del órgano" o "específicas del tejido") afectadas por una enfermedad o afección. Los marcadores también incluyen proteínas truncadas asociadas a la enfermedad de las que faltan los dos
50 aminoácidos del extremo terminal N y/o los dos aminoácidos del extremo terminal C. Estos marcadores se denominan colectivamente en la presente memoria como "marcadores diana".

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar o supervisar Esclerosis Múltiple (MS) que comprende las etapas de obtener una muestra biológica de un paciente que va a ser diagnosticado o supervisado, determinar la cantidad de un marcador en dicha muestra biológica, en la que el
55 marcador es Asp-Ala DKP (DA-DKP), N-acetil-Ala-Ser DKP (NAS-DKP), N-acetil-Ala-fosforilada-Ser DKP, Arg-Arg DKP, Gln-Asn DKP y determinar si la cantidad del marcador en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia, ausencia o estado de MS. Los marcadores diana pueden medirse rápidamente y convenientemente, y estas mediciones proporcionan evidencia objetiva que permitirá que se realice un diagnóstico confiable fácilmente y rápidamente para esclerosis múltiple.

Este procedimiento será muy beneficioso, ya que permitirá que el tratamiento de Esclerosis Múltiple (MS) comience mucho más temprano que no ahora posible. Además, la medición de los marcadores diana permitirá que el estado de Esclerosis Múltiple (MS) sea supervisado permitiendo el tratamiento más efectivo y la evaluación de nuevos fármacos y otros tratamientos.

- 5 Un nivel elevado de DA-DKP y/o NAS-DKP en la muestra biológica es indicativo de MS. También, un nivel elevado de DA-DKP y/o NAS-DKP en la muestra biológica es indicativo de MS activa. Otros compuestos de diagnóstico de MS se detallan en las Tablas 1 y 2.

10 La invención también proporciona nuevos ligandos que poseen especificidad para las dicetopiperazinas. Los ligandos son anticuerpos y/o aptámeros que reconocen específicamente las dicetopiperazinas de la presente invención. Dichos ligandos pueden utilizarse en los procedimientos de la presente invención. También se proporcionan composiciones y kits que contienen los nuevos ligandos.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: Registro de un espectrómetro de masa. La muestra era gonadotropina coriónica beta-humana recombinante procesada mediante cromatografía líquida seguida por espectrometría de masa.
- 15 Figura 2: Registro de un espectrómetro de masa. La muestra era una muestra plasmática de una mujer embarazada (paciente 4) procesada mediante cromatografía líquida seguida por espectrometría de masa.
- Figura 3: Registro de un espectrómetro de masa. La muestra era eritropoyetina recombinante procesada mediante cromatografía líquida seguida por espectrometría de masa.
- Figura 4: Registro de un espectrómetro de masa. La muestra era una muestra plasmática de una mujer embarazada (paciente 4) procesada mediante cromatografía líquida seguida por espectrometría de masa.
- 20 Figura 5: Un dendograma de conglomerado.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención preferentes en la actualidad

La presente divulgación generalmente proporciona procedimientos para diagnosticar y supervisar enfermedades, afecciones y trastornos mediante la cuantificación de marcadores para las enfermedades y afecciones.

- 25 En una realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para diagnosticar y supervisar enfermedades o afecciones caracterizadas por la degradación de proteínas asociadas a la enfermedad. Los productos de degradación incluyen dicetopiperazinas compuestas de los dos aminoácidos del extremo terminal N o los dos aminoácidos del extremo terminal C y las correspondientes proteínas truncadas asociadas a la enfermedad que no tienen dichos aminoácidos terminales. Por consiguiente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que estos productos de degradación son marcadores útiles para diagnosticar y supervisar esclerosis múltiple (MS) según lo que se define en las reivindicaciones anexadas.
- 30

Según lo observado más arriba, la expresión "proteínas asociadas a la enfermedad" se utiliza en la presente memoria para significar proteínas asociadas a la enfermedad, afecciones o trastornos específicos, incluyendo proteínas de órganos o tejidos (proteínas "específicas de órganos" o " específicas de tejido ") afectadas por una enfermedad, afección o trastorno. Los ejemplos de proteínas asociadas a la enfermedad y sus correspondientes enfermedades y afecciones se detallan en las Tablas 1 y 2. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente, sin experimentación indebida, otras proteínas asociadas a la enfermedad, sus correspondientes enfermedades o afecciones, y los marcadores útiles en base a la guía proporcionada en la presente memoria.

35

Los marcadores diana cuantificados en los procedimientos de la presente realización se forman mediante la degradación de las proteínas asociadas a la enfermedad. Se cree que esta degradación se produce en enfermedades o afecciones que incluyen o son causadas por acidosis, especies reactivas del oxígeno (ROS), inflamación, y/o afecciones que causan la protonación de los aminoácidos del extremo terminal N o extremo terminal C de las proteínas asociadas a la enfermedad, tales como la unión de ciertos ligandos al aminoácido del extremo terminal N o extremo terminal C. Las dicetopiperazinas también pueden formarse in vivo debido a la acción de ciertas enzimas (por ejemplo, dipeptidil peptidasas o carboxipeptidasas), y la actividad de estas enzimas puede ser alterada en ciertas enfermedades, afecciones y trastornos. Las dipeptidil peptidasas son amino peptidasas que escinden los dos aminoácidos del extremo terminal N de las proteínas con alguna especificidad, mientras que las carboxipeptidasas escinden aminoácidos del extremo terminal C de las proteínas: La placenta, por ejemplo, es rica en dipeptidil peptidasa IV. Después de la escisión, o en condiciones específicas, las enzimas pueden ser responsables de la ciclización, así como la escisión, de los aminoácidos. Alternativamente, la segunda etapa (ciclización) puede ser no enzimática y puede requerir la protonación del extremo terminal N o extremo terminal C. De ese modo, los marcadores útiles en la presente invención incluyen dicetopiperazinas compuestas de dos aminoácidos del extremo terminal de una proteína asociada a la enfermedad y las proteínas truncadas asociada a la enfermedad sin los dos aminoácidos del extremo terminal N y/o los dos aminoácidos del extremo terminal C.

40

45

50

5 Según lo utilizado en la presente memoria, "X-Y DKP" o "X-Y-DKP" significa una dicetopiperazina (dipéptido cíclico) compuesto de dos aminoácidos, X e Y, en el que X e Y son los dos aminoácidos del extremo terminal N o los dos aminoácidos del extremo terminal C de una proteína asociada a la enfermedad. X e Y pueden ser iguales o diferentes y cada uno puede ser cualquier aminoácido, incluyendo cualquier aminoácido modificado post-translacionalmente. No obstante lo anterior, X-Y DKP puede no ser His- Pro DKP cuando una única dicetopiperazina es el único marcador medido. La Tabla 3 detalla las abreviaciones con única letra y tres letras convencionales para cada aminoácido. Las modificaciones post-translacionales de aminoácidos son bien conocidas e incluyen fosforilación, acilación, cisteinilación, nitrosilación, y glicosilación.

10 Ejemplos de dicetopiperazinas útiles como marcadores en la presente divulgación se detallan en las Tablas 1 y 2 junto con sus correspondientes enfermedades y proteínas asociadas a la enfermedad. Aquellos expertos en la técnica pueden identificar fácilmente, sin experimentación indebida, otras dicetopiperazinas obtenidas de dos aminoácidos del extremo terminal N o dos aminoácidos del extremo terminal C de una proteína asociada a la enfermedad que pueden utilizarse como marcadores diana de diversas enfermedades y afecciones. Los marcadores en la invención se definen en las reivindicaciones anexadas.

15 TABLA 1

Enfermedad	Proteína	DKP del extremo terminal N	PM
Esclerosis Múltiple	proteína básica de mielina (MBP)	N-acetil-Ala-fosfo-Ser	280
	MBP	N-acetil-Ala-Ser	200
	Beta-amiloide	Asp-Ala	186
Artritis reumatoidea	Factor Rh	Glu-Ile	242,3
ARDS*, Fibrosis cística	Pulmonar Proteínas A, B y D asociadas al tensioactivos	(A) Glu-Val (B) Phe-Pro (D)Ala-Glu	2228,24
Diabetes Mellitus	Insulina	Phe-Val	246,34
		Gly-Ile	170,24
Enfermedad de Alzheimer	Beta-amiloide	Asp-Ala	186,15
	proteína tau	Met-Ala	
Enfermedad de Parkinson	alfa-sinucleína	Met-Asp	246,31
		Glu-Lys	257,38
Inflamación (general)**	Albúmina	Asp-Ala	186,15
	Proteína C-reactiva Interleucina 8	Gln-Thr	229,23
		Ala-Val	170,2
Isquemia (general)	Albúmina	Asp-Ala	186,15
Isquemia cerebral	Familia S 100 de las proteínas	Muchos	Muchos
Isquemia placentaria	gonadotropina Beta-coriónica	Gly-Leu	170,24
	eritropoyetina fetal	Ala-Pro	168,18
	proteína A asociada al embarazo	Glu-Ala	
Infarto del miocardio	Mioglobina	Gly-Leu	170,24
	Troponina I	Pro-Glu	226,22
Cáncer de próstata	Antígeno específico de próstata (PSA)	Lys-Ser	215,28
		Ile-Val	

ES 2 369 536 T3

(Cont.)

Pancreatitis	Amilasa	Gln-Tyr	291,3
	Lipasa	Lys-Glu	257,28
Enfisema	alfal-antitripsina	Glu-Asp	244,23
Enfermedad Renal, Cáncer, quimioterapia	Eritropoyetina	Ala-Pro	168,18
Sepsis	Proteína C activada	Ala-Asn	185,17
Hemoglobinopatías, Anemias	Cadena Tetal	Ala-Leu	199,24
	Cadena Zeta	Ser-Leu	215,24
	Cadena Alfa	Val-Leu	227,3
	Cadena Beta	Val-His	236,27
	Cadena Delta	Val-His	236,27
	Cadena Epsilon	Val-His	236,27
	AG Gamma	Gly-His	194,19
Fallo cardíaco congestivo	Péptido natriurético de cerebro	His-Pro	234,25
		Ser-Pro	184,18

TABLA 2

Enfermedad	Proteína	extremo terminal C DKP	PM	
Esclerosis Múltiple	proteína básica de mielina (MBP)	Arg-Arg	312,36	
	MBP	Gln-Asn	242,23	
	Beta-amiloide			
Artritis reumatoidea	Factor Rh	Lys-Arg	284,35	
ARDS*,	Pulmonar	(A) Glu-Phe	276,28	
Fibrosis cística	proteínas A, B y D asociadas a tensioactivos	(B) Ser-Met	218,26	
		(D) Glu-Phe	276,28	
Diabetes Mellitus	Insulina	Cys-Asn	217,24	
		Lys-Ala	199,24	
Enfermedad de Alzheimer	Beta-amiloide	Gln-Asn	242,23	
	proteína tau	Gly-Leu	170,21	
Enfermedad de Parkinson	alfa-sinucleína	Ala-Ala	142,14	
		Ala-Ala	142,14	
Inflamación (general)**	Albúmina	Gly-Leu	170,21	
		Proteína C-reactiva Interleucina 8	Trp-Pro	283,32
			Asn-Ser	201,17
Isquemia (general)	Albúmina	Gly-Leu	170,21	
Isquemia cerebral	Familia S 100 de las proteínas	Muchos	Muchos	

ES 2 369 536 T3

(Cont.)

Isquemia placentaria	gonadotropina Beta-coriónica	Leu-Pro	210,27
	eritropoyetina fetal	Asp-Arg	271,26
	proteína A asociada al embarazo	His-Gly	194,19
Infarto del miocardio	Mioglobina	Gln-Gly	185,18
	Troponina I	Glu-Ser	216,18
Cáncer de próstata	Antígeno específico de próstata (PSA)	Asn-Pro	211,21
		Asn-Pro	211,21
Pancreatitis	Amilasa	Lys-Leu	241,33
	Lipasa	Pro-Cys	200,25
Enfisema	alfal-antitripsina	Asn-Lys	256,3
Enfermedad Renal, Cáncer, quimioterapia	Eritropoyetina	Asp-Arg	271,26
Sepsis	Proteína C activada	Ala-Pro	168,18
Hemoglobinopatías, Anemias	Cadena Tetal		
	Cadena Zeta		
	Cadena Alfa		
	Cadena Beta		
	Cadena Delta		
	Cadena Epsilon		
	AG Gamma		
Fallo cardíaco congestivo	Péptido natriurético de cerebro	Arg-His	293,32
*ARDS = síndrome de distrés respiratorio agudo.			
**Asp-Ala dicetopiperazina (DA-DKP) y/o Gly-Leu dicetopiperazina (GL- DKP) obtenidas de albúmina, una proteína de circulación, serán marcadores generales de inflamación. Otras dicetopiperazinas obtenidas de proteínas asociadas a la enfermedad, incluyendo aquellas encontradas en órganos o tejidos específicos, serán marcadores de inflamación en aquellos órganos y tejidos asociados a aquellas enfermedades y afecciones			

TABLA 3

Aminoácido	Abreviación de tres letras	Abreviación de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina o Ácido glutámico	Glx	Z

(Cont.)

Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Otros marcadores diana útiles formados por la degradación de la proteína asociada a la enfermedad se denominan "proteínas truncadas asociadas a la enfermedad." Según lo observado previamente, estas proteínas truncadas asociadas a la enfermedad carecen de los dos aminoácidos del extremo terminal N y/o los dos aminoácidos del extremo terminal C y, por ello, pueden utilizarse como marcadores diana en los presentes procedimientos. Sin embargo, la proteína truncada asociada a la enfermedad puede no ser albúmina de suero humano que carece de los dos aminoácidos del extremo terminal N. Las proteínas truncadas asociadas a la enfermedad incluyen, por ejemplo, proteína básica de mielina que no tiene los aminoácidos N-acetil-Ala y Ser del extremo terminal N y beta-amiloide que no tiene los aminoácidos Asp y Ala del extremo terminal N, en los que ambos son marcadores diana útiles de esclerosis múltiple. La beta-amiloide truncada que no tienen los dos aminoácidos del extremo terminal N Asp y Ala y la proteína tau truncada que no tiene los dos aminoácidos del extremo terminal C Gly y Leu son ejemplos de los marcadores diana para la enfermedad de Alzheimer. Aquellos expertos en la técnica pueden identificar fácilmente otras proteínas truncadas útiles asociadas a la enfermedad como marcadores diana de diversas enfermedades y afecciones.

En la presente invención, los procedimientos comprenden:

- (a) determinar la cantidad de uno o más marcadores diana de la enfermedad o afección en una muestra biológica obtenida de un paciente que va a ser diagnosticado o supervisado; en la que el marcador es Asp- Ala DKP (DA-DKP), N-acetil-Ala-Ser DKP (NAS-DKP), N-acetil-Ala-fosforilado-Ser DKP, Arg-Arg DKP, Gln-Asn DKP y
- (b) determinar si la cantidad del marcador diana es indicativa de la presencia, ausencia o estado de Esclerosis Múltiple (MS).

En los procedimientos, los marcadores diana pueden cuantificarse en cualquier muestra biológica apropiada obtenida del paciente que va a ser diagnosticado o supervisado. Las muestras biológicas incluyen fluidos corporales apropiados, tales como suero, plasma, sangre, orina, saliva, fluido cerebroespinal, lágrimas, semen, secreciones vaginales, fluido amniótico y sangre de cordón. También pueden utilizarse, lavados, homogenatos tisulares y lisados celulares y, según lo utilizado en la presente memoria, las muestras biológicas incluyen dichas preparaciones.

Las muestras biológicas pueden tomarse de un paciente. La expresión "paciente" incluye cualquier animal, preferentemente mamíferos, y mucho más preferentemente seres humanos. Aquellos expertos en la técnica pueden determinar fácilmente enfermedades o afecciones apropiadas y sus marcadores diana correspondientes para un paciente particular.

La cantidad del marcador diana puede medirse mediante cualquier medio conocido por aquellos expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, mediante espectrometría de masa, inmunoensayos, ensayos químicos, cromatografía líquida sensible sin espectrometría de masa, y una variedad de técnicas fotométricas directas e indirectas. Por ejemplo, puede utilizarse una variedad de procedimientos analíticos para cuantificar el marcador diana mediante espectrometría de masa. Generalmente, el marcador de interés puede aislarse de la muestra biológica mediante una técnica apropiada, tal como cromatografía líquida o electroforesis en gel de dos dimensiones. Entonces el marcador diana puede cuantificarse mediante cualquier procedimiento de detección de espectrometría de masa, tal como espectrometría de masa por ionización por electrospray, cromatografía líquida - espectrometría de masa en tándem (LC-MS), desorción/ionización por láser asistido por matriz - espectrometría de masa (MALDI-MS), MS de tiempo de vuelo por MALDI (MALDI-TOF-MS), etc. Véase, por ejemplo, Lim et al., Analytical Biochemistry, 295: 45-56 (2001). Los marcadores diana pueden cuantificarse mediante la utilización de estándares de marcadores puros de cantidad conocida o mediante comparación con los mismos marcadores diana en el mismo tipo de muestras biológicas de los controles normales.

Los inmunoensayos preferentemente se utilizan para cuantificar los marcadores diana. Los inmunoensayos emplean uno o más ligandos. Un "ligando" es cualquier compuesto o molécula capaz de unirse específicamente a un marcador diana. Según lo utilizado en la presente memoria, "específicamente" significa que el ligando se une al marcador diana selectivamente en presencia de otros compuestos. Los ligandos preferentemente son anticuerpos, aptámeros, lectinas y otras moléculas que específicamente pueden unirse al marcador diana. Dichos ligandos pueden utilizarse en forma separada o en combinación (por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse en combinación con aptámeros). Los ligandos apropiados se describen en las reivindicaciones anexadas como otras realizaciones de la presente invención.

Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los formatos de inmunoensayo apropiados para el uso en los procedimientos de la presente invención. Dichos inmunoensayos incluyen ensayos homogéneos, ensayos heterogéneos, inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA), ensayos competitivos, ensayos inmunométricos (sándwich), ensayos turbidimétricos, ensayos nefelométricos, y similares. Los inmunoensayos pueden llevarse a cabo manualmente o con un analizador automático.

En un inmunoensayo enzimático preferente, un ligando específico del marcador diana se inmoviliza en un sustrato sólido. Los sustratos sólidos apropiados son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, pol-etileno, nylon, poliacrilamida y agarosa. La muestra biológica se pone en contacto con el ligando inmovilizado. Después del lavado, el marcador diana unido al sustrato sólido mediante el ligando unido se hace reaccionar con un segundo ligando (por ejemplo un segundo anticuerpo o una mezcla de anticuerpos) específicos para un epítotope conocido en el marcador diana. Puede utilizarse un segundo ligando puede etiquetarse para cuantificar el marcador diana o un tercer ligando etiquetado u otro compuesto (por ejemplo, proteína A o estreptavidina) para cuantificar el marcador.

Como alternativa, el marcador diana primero puede separarse de otros constituyentes de la muestra biológica, por ejemplo, por cromatografía por afinidad. Para la cromatografía por afinidad, los anticuerpos específicos del marcador diana se unen a una superficie sólida (por ejemplo, cuentas en una columna) y se utilizan para unir el marcador diana en la muestra. Después de lavar la superficie sólida, los marcadores diana se eluyen y se miden (por ejemplo, mediante uno de los procedimientos descritos más arriba, mediante la medición de la absorbancia en 280 nm o mediante cualquier otro procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica).

Las etiquetas apropiadas para cualquiera de los ligandos (por ejemplo primario, secundario o tercer anticuerpo) son bien conocidas en la técnica. Dichas etiquetas incluyen: (i) enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, dehidrogenasa de malato, nucleasa estafilococal, isomerasa delta-5-esteriode, dehidrogenasa alcohol de levadura, dehidrogenasa alfa-glicerofosfato, triosa fosfato isomerasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa); (ii) fluoróforos (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoerutrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina); (iii) radionucleótidos (por ejemplo, indio-111, tecnecio-99m, yodo-125, galio-67 y galio-68); (iv) etiquetas bioluminescentes (por ejemplo, luciferina, luciferasa y aequorina); (v) etiquetas quimioluminescentes (por ejemplo, luminol, isoluminol, éster de acridinio aromático, imadazol, sal de acridinio y éster de oxalato); (vi) etiquetas colorimétricas; (vii) etiquetas de coloide de metal; (viii) partículas de látex y sílice con tinturas incorporadas en las mismas; (ix) tinturas; y (x) etiquetas de afinidad (por ejemplo, biotina). La unión y detección de estas etiquetas puede realizarse mediante la utilización de técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Después se determina si la cantidad/es del marcador/es diana/s en la muestra biológica son indicativas de la presencia, ausencia o estado de una enfermedad o afección. Esto se logra mediante la utilización de cualquier variedad de procedimientos bien conocidos de análisis estadístico. Por ejemplo, puede utilizarse una técnica de agrupamiento, tal como la ejemplificada en el Ejemplo 2. Alternativamente, la determinación puede lograrse mediante la comparación de la/s cantidad/es de el/los marcador/es diana en la muestra con la/s cantidad/es de el/los marcador/es diana en los pacientes normales. "Pacientes normales" son aquellos que no sufren de la enfermedad o afección particular que va a ser diagnosticada o supervisada. Por ejemplo, la cantidad de un marcador diana puede compararse con un intervalo normal. Este intervalo normal se encuentra mediante la determinación de la cantidad del marcador en un gran número de muestras de individuos normales mediante el mismo procedimiento (es decir, mismo tipo de muestra biológica, mismas etapas, mismos reactivos, mismas afecciones) según lo utilizado en el ensayo de la muestra del paciente. Si la cantidad del marcador diana está fuera del intervalo normal, después se indica la presencia de la enfermedad o afección. Alternativamente, la cantidad de un marcador diana puede compararse con un valor límite que es indicativo de la enfermedad o afección. El valor límite puede determinarse mediante el ensayo de un gran número de muestras de individuos normales y de pacientes que se sabe que sufren de una enfermedad o afección particular de interés. Si la cantidad de marcador diana excede el límite, después se indica la enfermedad o afección. Además, la cantidad de un marcador diana y/o la presencia de dos o más marcadores diana fuera de sus intervalos normales o que exceden sus límites también pueden ser indicativos del estado de enfermedad o afección. Al analizar los datos, incluyendo la determinación de un intervalo normal o valor límite, pueden utilizarse procedimientos estadísticos estándar bien conocidos en la técnica. Finalmente, tal como puede apreciarse, los intervalos normales y los valores límite pueden expresarse en las unidades de detección (por ejemplo, niveles de absorbancia o de fluorescencia) como un tema de conveniencia y facilidad para realizar la correlación.

Por ejemplo, según lo observado más arriba, la medición de DA-DKP puede utilizarse en el diagnóstico o supervisión de MS. Los niveles de DA-DKP en pacientes humanos normales están en el intervalo de aproximadamente 50-100 ng/ml. Aquellos expertos en la técnica serán capaces de determinar fácilmente cuando el nivel de DA-DKP es significativamente elevado para indicar esclerosis múltiple mediante la utilización de cualquiera de los procedimientos divulgados en la presente memoria u otros procedimientos estadísticos conocidos.

Los procedimientos anteriores de la presente divulgación pueden utilizarse para diagnosticar o supervisar un número de enfermedades y afecciones. Estas enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a, aquellas identificadas en las Tablas 1 y 2.

En otra realización, la presente divulgación proporciona marcadores bioquímicos objetivos útiles para el diagnóstico y supervisión de esclerosis múltiple (MS) en pacientes. En particular, los siguientes marcadores se han identificado en muestras plasmáticas mediante cromatografía líquida seguida por espectrometría de masa (LC-MS):

1. Primero, un compuesto de masa 175 (masa real de 176) se ha descubierto que faltaba del plasma de los pacientes con MS en comparación con las muestras plasmáticas de seres humanos normales.

2. Un compuesto de masa 145 (masa real de 146) también se ha descubierto que faltaba del plasma de pacientes con MS en comparación con las muestras plasmáticas de seres humanos normales.

3. Un compuesto de masa 185 (masa real de 186) se ha descubierto que es significativamente elevado en el plasma de pacientes con MS que tienen la enfermedad activa en comparación con las muestras plasmáticas de seres humanos normales y de pacientes con MS cuya enfermedad no está activa. Este compuesto se ha identificado como ácido aspártico dipéptido cíclico -alanina dicetopiperazina (DA-DKP). Es interesante observar que este compuesto ha demostrado inhibir el factor de activación de plaquetas e inhibir la producción y/o liberación de interleucina- 8 (véase la solicitud PCT WO 02/11676).

4. Un compuesto de masa 199 (masa real de 200) se ha descubierto que es significativamente elevado en el plasma de pacientes con MS que tienen la enfermedad activa en comparación con las muestras plasmáticas de seres humanos normales y de pacientes con MS cuya enfermedad no está activa. Este compuesto se ha identificado como N- acetil-alanina-serina dicetopiperazina (NASDKP).

De ese modo, la ausencia de uno o ambos de los compuestos de masas 175 y 145 de una muestra plasmática indica que el paciente tiene MS. Un nivel significativamente elevado de una o ambas de las dicetopiperazinas de masas 185 y 199 indica que los pacientes están sufriendo MS activa. Los compuestos de diagnóstico de MS incluyen, pero no se limitan a, todos estos compuestos y las dicetopiperazinas y proteínas truncadas asociadas a la enfermedad de las Tablas 1 y 2.

"MS activa" se utiliza para significar el período cuando se producen manifestaciones clínicas nuevas, adicionales o de empeoramiento (un ataque, exacerbación, arrebato, recidiva). Usualmente se asocia con destrucción de neurona/mielina incrementada, glóbulos blancos sanguíneos elevados (>4/hpf) y tasa de síntesis de IgG (>9) en el fluido cerebroespinal, Plaquetas de demielinación MRI, y "agujeros negros" que representan pérdida neuronal.

Aún en otra realización, la presente divulgación proporciona marcadores bioquímicos objetivos útiles para el diagnóstico o supervisión de la enfermedad de Alzheimer. La presente divulgación proporciona procedimientos para diagnosticar o supervisar la enfermedad de Alzheimer mediante la utilización de un compuesto de diagnóstico de Alzheimer. Los procedimientos se logran mediante la obtención de una muestra biológica de un paciente que va a ser diagnosticado o supervisado y determinación de la cantidad de un compuesto de diagnóstico de Alzheimer en la muestra biológica. Los compuestos de diagnóstico de Alzheimer incluyen, por ejemplo: (i) un compuesto que posee una masa de aproximadamente 175 según lo determinado por cromatografía líquida y espectrometría de masa; y (ii) la dicetopiperazina obtenida de beta-amiloide que es Asp-Ala DKP (MW 186,15). Ambos compuestos de diagnóstico se han encontrado elevados en el plasma de pacientes con Alzheimer y son considerados diagnósticos de la enfermedad. Otros compuestos de diagnóstico de Alzheimer incluyen las dicetopiperazinas y proteínas truncadas asociadas a la enfermedad de las Tablas 1 y 2.

En otra realización, la presente divulgación proporciona procedimientos para el diagnóstico o supervisión de isquemia placentaria en pacientes embarazadas. Estos procedimientos comprenden obtener una muestra biológica de una paciente embarazada y medir la cantidad de un compuesto de diagnóstico de isquemia placentaria, incluyendo aquellos obtenidos de proteínas asociadas al embarazo, en la muestra biológica. Los ejemplos de compuestos de diagnóstico de isquemia placentaria útiles en los procedimientos incluyen, por ejemplo: (i) Gly-Leu dicetopiperazina (GL-DKP) obtenida de gonadotropina cloriónica beta-humana; y (ii) Ala-Pro dicetopiperazina (AP-DKP) obtenida de eritropoyetina fetal. Otros compuestos de diagnóstico de isquemia placentaria incluyen las dicetopiperazinas y proteínas truncadas asociadas a la enfermedad de las Tablas 1 y 2.

Los expertos en la técnica serán capaces de aislar y determinar fácilmente la composición química de aquellos compuestos identificados más arriba solamente mediante sus masas. Una vez que sus composiciones químicas son conocidas, los mismos pueden ensayarse mediante procedimientos distintos de espectrometría de masa, incluyendo aquellos procedimientos descritos más arriba, preferentemente por medio de un inmunoensayo.

En otra realización adicional, la presente divulgación proporciona ligandos útiles en los inmunoensayos descritos más arriba. Los ligandos incluyen anticuerpos, antisuero o una fracción purificada de los mismos, aptámeros y otros compuestos capaces de unirse específicamente a un marcador diana. Los anticuerpos apropiados incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores, y regiones de determinación de complementariedad (CDRs). Los anticuerpos apropiados para el uso en la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos. Los anticuerpos particularmente apropiados son los anticuerpos monoclonales que poseen especificidad para las dicetopiperazinas de la presente invención según lo que se describe en las reivindicaciones anexadas. Debido a que las dicetopiperazinas son pequeños compuestos, las mismas preferentemente se unirán a una molécula vehículo inmunogénica para el uso como un inmunógeno para preparar los anticuerpos específicos contra los mismos. Las moléculas vehículo apropiadas (por ejemplo, KLH) y los procedimientos para unir las moléculas a los mismos son bien conocidos en la técnica. El inmunógeno puede utilizarse para producir anticuerpos monoclonales mediante la utilización de procedimientos de fusión de Kohler y Milstein, Nature 1975 256 páginas 495-497, con modificaciones conocidas por aquellos expertos en la técnica. La expresión "aislado" utilizada en conexión con el ligando significa que el ligando no está dentro de su medio natural si se encuentra en la naturaleza y no se quiere indicar ningún nivel de pureza del ligando.

Los aptámeros pueden utilizarse en lugar de, o en combinación con, los anticuerpos en cualquiera de los inmunoensayos arriba descritos. Los aptámeros son oligonucleótidos que son específicos para las proteínas, péptidos, derivados de proteínas y péptidos, moléculas inorgánicas y otras moléculas no nucleótidas. Véase, por ejemplo, las solicitudes PCT WO 00/070329, WO 01/79562 y WO 99/54506, y la Patente Estadounidense Núm. 5.756.291. Los aptámeros apropiados para el uso en la presente invención según lo que se describe en las reivindicaciones anexadas pueden prepararse mediante la utilización de los procedimientos descritos en estas referencias. En resumen, se sintetiza una población heterogénea de oligonucleótidos de secuencias aleatorias, y un marcador de la invención se mezcla con la población heterogénea de oligonucleótidos. Se forman los complejos con algunas, pero no todas, las secuencias presentes en la población de oligonucleótidos. Los complejos se aíslan, y los oligonucleótidos se recuperan y amplifican (por ejemplo, por PCR). La mezcla resultante de oligonucleótidos puede utilizarse como material de partida para otra ronda de complejización, aislamiento y amplificación, y el proceso se repetirá típicamente varias veces hasta que se obtenga un aptámero de especificidad satisfactoria y/o hasta que se identifique una secuencia de consenso de aptámeros. Las etiquetas apropiadas para los aptámeros incluyen tinturas, enzimas, etiquetas radioactivas, etc.

La presente invención además proporciona composiciones que contienen los ligandos según lo descrito en las reivindicaciones anexadas. Dichos vehículos fisiológicamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como tampones de bicarbonato, tampones de fosfato, solución salina fisiológica, solución de Tinger y similares.

La invención también proporciona kits para cuantificar los marcadores diana según lo que se describe en las reivindicaciones anexadas. Dichos kits opcionalmente contienen diversos reactivos útiles para conducir los procedimientos de la presente invención, incluyendo uno o más ligandos específicos para un marcador diana, un componente etiquetado útil para detectar el marcador diana, tampones, diluyentes, estándares, controles, etc. Los kits también puede contener botellas, viales, tubos, jeringas, placas de microtitulación u otros sustratos sólidos, instrucciones y similares.

Los siguientes Ejemplos tienen como objeto ilustrar las realizaciones de la invención y la presente divulgación y no tienen como objeto limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diagnóstico de isquemia placentaria, no parte de la invención

[0059] Se ha detectado la presencia de diversas dicetopiperazinas en plasma materno. Tienen particular interés las que se obtienen de gonadotropina coriónica β -humana del extremo terminal N (β HCG) y eritropoyetina fetal. Estas son la glicina-leucina dicetopiperazina (GL-DKP) y alanina-prolina dicetopiperazina (AP-DKP), respectivamente. La AP-DKP, en particular, es elevada en el embarazo FGR debido a la elevación de la eritropoyetina fetal en FGR (Tesaró, et al., Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2002. 83(1): páginas 245-51; Jazayeri et al., Am. J. Obstet. Gynecol., 2000. 183(1): páginas 188-90; Jazayeri et al, J. Perinatol., 1999 19(4): páginas 255-9) y su degradación específica en condiciones ácidas (protonación del aminoácido del extremo terminal N (Goolcharran y Borchardt, J. Pharm. Sci., 1998. 87(3): páginas 283-8) y la importancia relativa para la prolina en posición 2 de la secuencia de aminoácidos primaria) para producir AP-DKP.

Los sujetos para el estudio fueron seleccionados de los pacientes denominados práctica de la Medicina Fetal-Maternal (MFM) con embarazos complicados. Los criterios de inclusión para el estudio fueron:

Peso fetal estimado < percentil 10 para la edad gestacional mediante ultrasonido además de:

- Un índice de fluido amniótico (AFI) < 8 o,

- Una relación de velocidad de flujo sanguíneo durante sístole y diástole (S/D) en la arteria umbilical según lo medido con Doppler de onda-pulso > 3 o,
- preeclampsia, según lo definido por los criterios clínicos estándar.

5 Hubo 12 pacientes en el grupo de estudio, incluyendo 11 gestaciones de un sólo feto y una gestación de mellizos. Hubo 5 pacientes en el grupo de control incluyendo 1 gestación de mellizos. Las edades gestacionales en el grupo de estudio al momento de parto fueron entre 26,3-38 semanas con una edad gestacional promedio de 30,2 semanas versus 38 semanas en el grupo de control. Los pesos de nacimiento promedio fueron 1016 gramos en los grupos de estudio versus 3114 gramos en el grupo de control. Los porcentajes de peso de nacimiento para el grupo de estudio promediaron $< 10\%$ versus 43% en el grupo de control. Los estudios de flujo por Doppler de arteria umbilical se obtuvieron en 10 de los 12 pacientes de estudio; de estos, todos eran anormales, donde 2 pacientes tenían flujo diastólico final invertido, 6 tenían flujo diastólico final ausente, y 2 tenían una relación S/D $> 3,0$. Nueve de los 12 pacientes del estudio tuvieron preeclampsia. Dos de los 12 pacientes de estudio tuvieron síndrome de HELLP.

15 Se incubó β HCG recombinante (Sigma) en tampón de fosfato 0,1M, pH 7,4 a 60°C durante 12 horas y se analizaron en cuanto a la presencia de GL-DKP (MW 170,21) mediante cromatografía líquida (LC) seguido por ESI+ espectrometría de masa (ESI+/MS). Los resultados se presentaron en la Figura 1.

En forma similar, se incubó eritropoyetina recombinante (Amgen) en tampón de fosfato 0,1M, pH 7,4 a 60°C durante 12 horas y se analizaron en cuanto a la presencia de AP-DKP (MW 168,18) mediante LC y ESI-/MS. Los resultados se presentaron en la Figura 3.

20 Se tomaron muestras plasmáticas de los pacientes del grupo de estudio y los pacientes del grupo de control y se procesaron mediante LC seguido por ESI/MS. Los resultados para un paciente del grupo de estudio (paciente 4) se presentaron en las Figuras 2 y 4. Tal como puede observarse, se detectaron GL-DKP (obtenida de PHCG) y AP-DKP (obtenida de eritropoyetina fetal).

Ejemplo 2: Clasificación de los pacientes con MS mediante la utilización de Cromatografía líquida - Espectrometría de masa y Agrupamiento

25 Un nuevo procedimiento para determinar el estado de Esclerosis Múltiple (MS) de pacientes se presenta aquí junto con algunos resultados de un pequeño conjunto de ensayos de ambos pacientes con MS y normales. En el presente procedimiento, las muestras de sangre se recolectaron de pacientes normales y con MS y se analizaron mediante el procedimiento de cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS) para determinar la concentración de varios marcadores de MS putativos. Los datos resultantes se analizaron mediante una técnica de agrupamiento matemático
30 que encuentra agrupamientos naturales dentro de los datos para observar si hubo cualquier relación simple entre los niveles de estos marcadores putativos y la presencia, ausencia o estado de MS.

Pacientes

35 Los pacientes con MS fueron diagnosticados mediante estándares de laboratorio y clínicos aceptados. Las señales neurológicas y síntomas, evidencia de imágenes por resonancia magnética de desmielinación, presencia de bandas oligoclonales en fluido cerebroespinal, enumeración de glóbulos blancos y índices de síntesis de IgG se utilizaron para realizar el diagnóstico. La enfermedad activa se definió en base lo anterior en presencia de manifestaciones neurológicas progresivas o agudas.

Preparación de muestras

40 Se recolectaron muestras sanguíneas en tubos heparinizados. Las muestras sanguíneas se separaron a través de centrifugación en plasma y glóbulos rojos. Los glóbulos rojos se descartaron, y el plasma además se refinó pasándolo a través de un filtro de exclusión por tamaño (Centricon 3) para eliminar todos los componentes que fueran mayores que 3.000 daltons. Los filtrados resultantes se analizaron inmediatamente o se congelaron para posterior análisis.

Procedimiento LC-MS

45 La muestras se procesaron en una HPLC (un sistema de Waters 2975) para separar los diversos componentes. La columna utilizada era un intercambio aniónico mono-Q de Amersham. La fase móvil era una solución 50 mM de acetato de amonio, pH 6,7, a 1 ml/min. El flujo se dividió 4:1 después de la columna dejando una corriente de 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ que se dirigió a un espectrómetro de masa Micromass LCT operado en modo de ionización por electrospray negativo (ESI-) mediante la utilización de un voltaje de cono de 20v. Debido a la alta velocidad de flujo y alto contenido acuoso del disolvente, la temperatura de desolvación se fijó en 400°C . Los estándares de DA-DKP y EA-DKP se procesaron con cada conjunto de datos para calibrar las diferencias transitorias en la sensibilidad del instrumento. Las concentraciones estándar utilizadas son 500, 100, 20, y 4 ng/ml de cada DKP. Se descubrió que la detección de las DKPs mediante el espectrómetro de masa era lineal en este intervalo de concentraciones ($r^2 > 0,998$).

Preparación de datos

Si bien no hay calibrantes para algunos de los marcadores putativos descritos más abajo, se supuso que la sensibilidad del instrumento era lineal en todo el espectro y, de ese modo, todas las masas para las que no había ningún calibrante se normalizaron hasta el nivel de 500 ng/ml de DA-DKP.

5 Análisis matemático

El agrupamiento es una técnica de clasificación que identifica los grupos de objetos similares donde la similitud se obtiene únicamente en base a las variables que describen los datos. Idealmente, los grupos se forman de tal manera que los objetos dentro de un grupo son similares uno con otro, mientras que los objetos en grupos diferentes son tan diferentes como es posible.

10 Cuando uno trata de agrupar datos en bruto de datos experimentales cuyas variables están poco graduadas, los componentes con gran magnitud dominarán cualquier métrica de distancia, dando como resultado una ponderación desproporcionada de aquellas variables. Debido a que uno no posee ningún conocimiento a priori de cada importancia de variable, uno gradúa para dar una ponderación igual a cada una de las variables. La graduación dimensional se emplea de manera que cada variable sea cambiada o graduada. Como resultado, las medias son
15 cero y las varianzas son iguales.

A menudo, los experimentos generan conjuntos de datos de alta dimensión que pueden tener fuertes dependencias. A fin de maximizar la posibilidad de una clasificación no trivial, uno desea minimizar el número de dimensiones mediante la extracción de la información más relevante de los datos minimizando al mismo tiempo el ruido. Los procedimientos de extracción de característica incluyen descomposición wavelet, transformación de Fourier, análisis
20 de factor y análisis de componente independiente.

En este trabajo, la extracción de característica se llevó a cabo mediante la utilización de una variante del análisis de factor denominada análisis del componente principal (PCA). En el PCA, los datos se representaron como coeficientes de los vectores eigen de la matriz de covarianza que describe los datos. Además, las resistencias
25 relativas de cada uno de los vectores eigen (también conocidos como componentes principales) están dadas por los valores eigen. Los vectores eigen con los correspondientes valores eigen que están por debajo de algún umbral a menudo pueden omitirse como ruido:

Después de elegir un conjunto de 10 masas putativas para el análisis, se analizaron los datos con un juego de herramientas de agrupamiento en Matlab escritos por Raphael Bar-Or, DMI BioSciences, Inc., Englewood, Colorado. Otro software de agrupamiento apropiado está comercialmente disponible. El análisis de error y ensayo reveló que 2
30 masas de 185 y 199 aparecieron temprano en los procesamientos y tuvieron algún poder para separar los datos en 2 grupos, uno de los que es MS activa y el otro es MS no activa y normal. En un subconjunto de pacientes con MS y pacientes normales, los ajustes del kit de herramienta de agrupamiento se optimizaron para lograr buena separación entre MS activa y todos los otros diagnósticos. Los ajustes para este análisis se proporcionan en la Tabla 4.

Se procesaron las muestras de un total de 37 pacientes. De estas, 24 estaban en el agrupamiento #1 (8 normales y
35 16 MS no activa), y 13 estaban en el agrupamiento #2 (MS activa). Pareció haber pocas, si las hubo, malas clasificaciones, y una inspección del dendrograma de agrupamiento (Figura 5) revela que el espacio es bastante separable, queriendo decir que hay suficiente espacio entre los agrupamientos de manera que no es posible que esta separación sea el producto de sola casualidad. Una pequeña aleatorización (dejar un análisis) confirmó que la separación es en realidad estable (93% por Rand's Statistic).

40 Los grupos encontrados por el procedimiento de agrupamiento fueron utilizados como un clasificador. En este pequeño conjunto de datos, se encontró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84,6% para MS activa.

Las dos masas de 185 y 199 se identificó que eran Asp- Ala DKP (DA-DKP) y N- acetil-Ala-Ser DKP (NASDKP), respectivamente. Estas dos DKPs son los productos de degradación de dos proteínas importantes del sistema nervioso central, a saber beta amiloide y proteína básica de mielina (véase la Tabla 1).

45 Se observó que un marcador etiquetado "175 @ 8,5 minutos" parece ser deficiente en todos los pacientes con MS sospechados e inusualmente alto en pacientes con Alzheimer. Un patrón similar se observó en otra masa etiquetada "145 @ 12,7 minutos". La adición de esta variable al análisis de agrupamiento mejoraría seguramente la separación, pero los datos más allá de 6 minutos están disponibles para solamente un pequeño subconjunto de pacientes (sólo
50 14 muestras se procesaron durante más de 6 minutos, y sólo 10 de estas también se habían procesado durante el tiempo más corto). Un análisis de este grupo más pequeño reveló que un simple umbral en el nivel de "175 @ 8,5 minutos" era suficiente para separar bastante exactamente los pacientes con MS de los pacientes normales y pacientes no MS sin distinguir entre las formas activa y no activa. Si bien existen datos insuficientes para concluir que este marcador 175 es definitivo, la evidencia sugiere que, junto con los dos marcadores (185 y 199) utilizados en el análisis de agrupamiento anterior, existe una fuerte posibilidad de un algoritmo que pueda separarse con exactitud
55 pacientes con MS de los pacientes normales y no MS y que los pacientes con MS además pueden categorizarse en MS activa y no activa.

TABLA 4

<pre> %***** %**** EDITAR LOS VALORES EN ESTE BLOQUE ***** %***** Destacado=<input type="checkbox"/> % elementos para pintar en forma diferente de manera que sobresalgan datos de registro=1; % convertir a datos de registro graduación=0; % 1 = dimensión graduación % 0 = ninguna graduación de dimensión número de agrupamientos =2; % el número de agrupamientos deseado (debe ser =>2) convertir Pca=1; % 1 = convertir en espacio pca % 0 = ninguna conversión (espacio original) mantener variación=0.95; % la cantidad de variabilidad para mantener la conversión de pca algoritmo de agrupamiento= "jerárquico"; % tipo de agrupamiento, las opciones deseadas son: % "kplane" % "kmeans" % "kmedians" % "fuzzy_cmeans" % "jerárquico" % "gravedad" orden de gravedad=15; % sólo aplicable si el tipo de agrupamiento es gravedad gravtol=2e-3; % sólo aplicable si el tipo de agrupamiento es gravedad añadir masas=1; % sólo aplicable si el tipo de agrupamiento es gravedad métrica jerárquica= "Euclid"; % n/a si el algoritmo de agrupamiento no se "jerárquico" o "permutación" % las opciones son: % "Euclid"= distancia Euclidiana (por defecto) </pre>

```

(Cont.)
% "Seuclid"= distancia Euclidiana estandarizada
% "Mahal"= Mahalanobies distancia
% "CityBlock"= métrica City Block
% "Minkowski"= métrica Minkowski
% "Correlación"=1-coeficientes de correlación
conexión jerárquica= "ward";
% "simple"= distancia más corta
% "completa"= distancia más larga
% "promedio"= distancia promedio
% "centroide"= distancia centroide (aproximada, computarizada mediante la utilización de una fórmula
que es exacta si y contiene las distancias euclidianas)
% "ward"= suma incremental de cuadrados
mostrar información de agrupamiento-1;
% 1 = mostrar información de agrupamiento
% *****
% **** EDITAR LOS VALORES EN ESTE BLOQUE *****
% *****
% 0 = ninguna visualización de información de agrupamiento
mostrar gráfico de dispersión =1;
% 1 = mostrar gráfico de dispersión de los primeros tres componentes
% 0 = ningún gráfico de dispersión
mostrar respuesta génica del agrupamiento =1;
% 1 = mostrar la representación de la respuesta génica para cada agrupamiento
% 0 = ninguna visualización
tipo de respuesta= "línea";
% n/a si la visualización de la respuesta génica de agrupamiento está deshabilitada
% son:
opciones %"box"
% "línea"
% "barra"
% "área"
validación cruzada=0;
% validación cruzada de dejar uno afuera (puede tomar un tiempo muy largo)
% 1 = hacer la validación cruzada
% 0 = ninguna validación cruzada

```


Ejemplo 3: Análisis de un paciente con MS mediante la utilización de cromatografía líquida - Espectrometría de masa

Se recolectó una muestra de sangre de un paciente con MS con MS activa y se procesó se analizó mediante LC-MS según lo que se describe en el Ejemplo 2. Se encontraron las siguientes DKP's: DA- DKP (del extremo terminal N de beta-amiloide), NAS-DKP (del extremo terminal N de proteína básica de mielina), N-acetil-Ala Fosfo-Ser DKP (del extremo terminal N de proteína básica de mielina), Gln- Asn DKP (del extremo terminal C de beta-amiloide) y Arg-Arg DKP (del extremo terminal C de proteína básica de mielina).

5

Ejemplo 4: Diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer, no parte de la invención

Según lo que se observa en el Ejemplo 2, se descubrió que un marcador etiquetado "175 @ 8,5 minutos" estaba presente en cantidades inusualmente altas en el plasma de pacientes con Alzheimer. Se espera que este marcador sea útil en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

10

Además, se encontró un marcador en la masa 186.15, DA-DKP, elevado en el plasma de pacientes con Alzheimer. Parece ser diagnóstico de la enfermedad.

Finalmente, se ha encontrado otro posible marcador de masa 200 (masa real 201). Aún no se ha identificado, pero un candidato posible es NAS-DKP.

15

20

25

30

35

40

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar o supervisar Esclerosis Múltiple (MS) que comprende las etapas de:
- (a) determinar la cantidad de un marcador en una muestra biológica obtenida de un paciente que va a ser diagnosticado o supervisado, en la que el marcador es:
- 5 (i) Asp-Ala DKP (DA-DKP);
- (ii) N-acetil-Ala-Ser DKP (NAS-DKP);
- (iii) N-acetil-Ala-fosforilada-Ser DKP;
- (iv) Arg-Arg DKP;
- (v) Gln-Asn DKP; y
- 10 (b) determinar si la cantidad de el marcador en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia, ausencia o estado de MS.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que se determina la cantidad de ambos (i) y (ii) o en el que se determina la cantidad de (i) a (v).
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que se determina la cantidad de un marcador mediante espectrometría de masa, ensayo químico o inmunoensayo.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que se determina la cantidad de un marcador mediante inmunoensayo.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho inmunoensayo es conducido mediante la utilización de un ligando específico para un marcador, en el que el ligando es un anticuerpo o un aptámero.
- 20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra biológica es un fluido corporal.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el fluido corporal es suero, plasma, sangre, orina, saliva, fluido cerebroespinal, lágrimas, semen, secreción vaginal, fluido amniótico o sangre de cordón.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el fluido corporal es plasma o suero.
- 25 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho paciente es un ser humano.
10. Un ligando aislado que posee especificidad para un marcador en una muestra biológica indicativo de la presencia, ausencia o estado de MS, el marcador seleccionado de los grupos (i) a (v) detallados en la Reivindicación 1, en el que el ligando es un anticuerpo o un aptámero.
11. El ligando aislado de la reivindicación 10, en el que dicho ligando es un anticuerpo monoclonal.
- 30 12. El ligando aislado de la reivindicación 10, en el que dicho ligando es un aptámero.
13. Una composición que comprende el ligando de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en un vehículo fisiológicamente aceptable.
14. Un kit de cuantificación para cuantificar un marcador en una muestra biológica indicativo de la presencia, ausencia o estado de MS que comprende el ligando de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 y reactivos asociados.
- 35

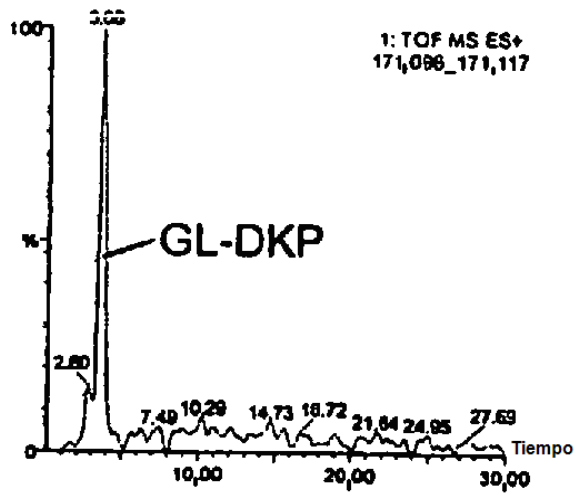
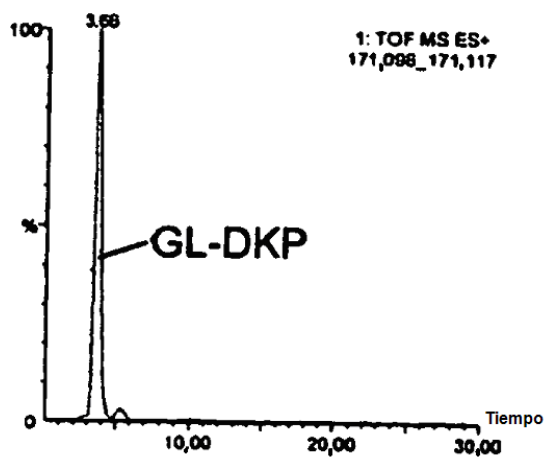


Figura 1



5 Figura 2

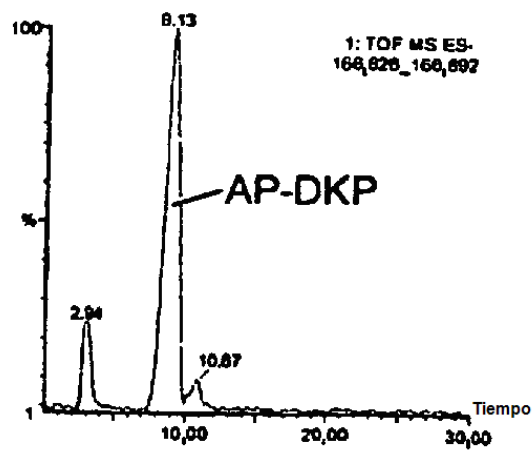


Figura 3

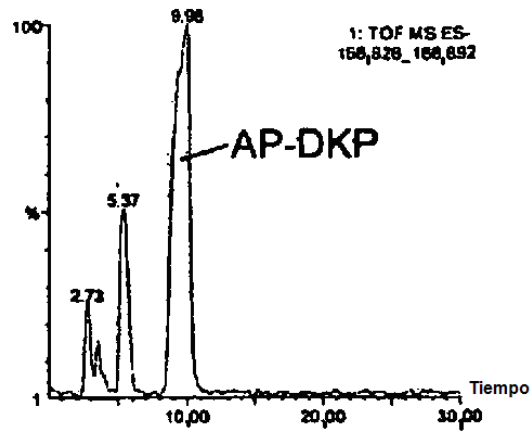


Figura 4

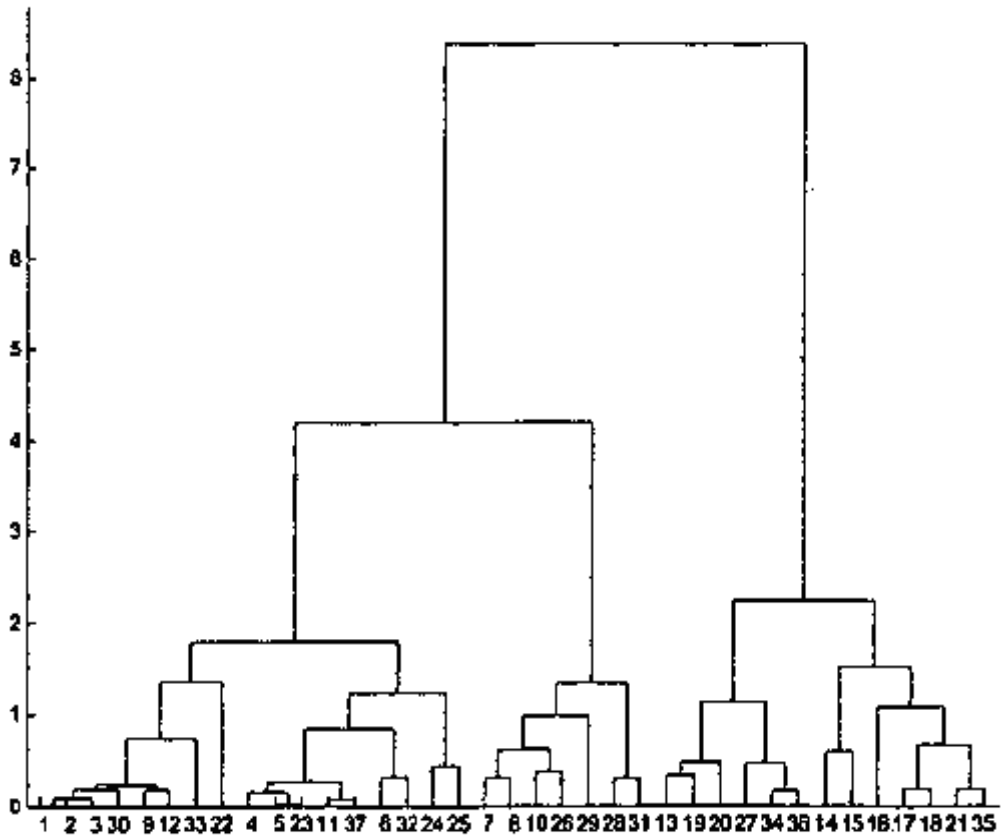


Figura 5