

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 534**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10710609 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2411812**

54 Título: **Perfiles metabólicos**

30 Prioridad:

24.03.2009 GB 0905090

24.03.2009 GB 0905096

24.03.2009 GB 0905098

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

04.12.2013

73 Titular/es:

ANAMAR AB (100.0%)

Kungsportsavenyn 22

411 36 Göteborg, SE

72 Inventor/es:

LUNDSTEDT, ERIK TORBJÖRN;

TRYGG, NILS JOHAN;

GABRIELSSON, JON ROBERT y

EKSTRÖM, GUNILLA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 534 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

Perfiles metabólicos

5 La invención se refiere a un método *in vitro* para la detección de alteraciones en los perfiles metabólicos de metabolitos endógenos en sujetos, que son causadas por la artritis reumatoide. Tales alteraciones se pueden normalizar por tratamiento del sujeto con compuestos especificados, particularmente N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilideno)guanidina.

Artritis reumatoide

10 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune (EA) inflamatoria crónica, que hace que el sistema inmunitario ataque a las articulaciones, lo que produce una situación incapacitante y dolorosa que puede llevar a una pérdida sustancial de movilidad debida a la destrucción de las articulaciones y al dolor asociado (Scott, D. L. *et al.*, Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 21: 943-967 (2007)). La etiología de la AR es en gran parte desconocida (Jefferies, W. M., Medical Hypotheses. 51: 111-114 (1998); Krishnan, E., Joint Bone Spine. 70: 496-502 (2003); Klareskog, L. *et al.*, Arthritis and Rheumatism. 54: 38-46 (2006)). Es probable que los primeros síntomas sean de artritis inflamatoria indiferenciada (UIA) más que de AR, y que la artritis inflamatoria indiferenciada puede evolucionar hacia la artritis reumatoide (Dixon, W. G. *et al.*, Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 19: 37-53 (2005)). La evolución de la artritis inflamatoria se puede dividir en cuatro etapas (Figura 2).

20 El diagnóstico precoz es crucial para un tratamiento más efectivo para prevenir el daño irreversible de las articulaciones (Emery, P., Br. J. Rheumatol. 33: 765-768 (1994); van Aken, J. *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 63: 274-279 (2004); Emery, P., Br. Med. J. 332: 152-155 (2006)). La detección de los pacientes que van a desarrollar la inflamación crónica de las articulaciones ayudaría a identificar a los que necesitan tratamiento y evitar el innecesario tratamiento de aquellos que es menos probable que desarrollen la enfermedad (Emery, P. *et al.*, Rheumatol. Int. 27: 793-806 (2007); Emery, P. *et al.*, Rheumatology. 47: 392-398 (2008)). Por lo tanto existe la necesidad de métodos para diagnosticar la respuesta autoinmune que es artritis inflamatoria indiferenciada antes de que evolucione a artritis reumatoide (Firestein, G. S., Arthritis Res. Ther. 7: 157-159 (2005)). Trang *et al.* (Scandinavian Journal of Rheumatology 14(4): 393-492 (1985)) han demostrado que los pacientes con AR tienen alterados los niveles plasmáticos de aminoácidos. Similarmente, Hernanz *et al.* (Clinical Biochemistry 32(1): 65-70 (1999)) demostraron el aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína y otros compuestos tóxicos en mujeres con AR. La medida de las concentraciones de metabolitos endógenos tiene el potencial no sólo de diagnosticar la enfermedad sino de proporcionar también nuevas pistas sobre los mecanismos implicados en la patogénesis. En los ejemplos se demuestra que es posible separar a los sujetos que padecen AR de los sujetos con enfermedades relacionadas y de los voluntarios sanos analizando los datos generados por GC-MS (cromatografía de gases -espectrometría de masas) del plasma sanguíneo, véase la Tabla 3. Esto es crucial para el desarrollo de fármacos que actúan para retrasar o incluso evitar la aparición de la AR.

Tabla 3: Metabolitos de la AR humana

Metabolito	Dirección en AR	Significancia, p
Isoleucina	↓	<0,001
Glicina	↓	0,03
Succinato	↓	<0,001
Ácido glicérico	↓	<0,001
Serina	↓	<0,001
Treonina	↓	<0,001
Ácido málico	↓	<0,001
Metionina	↓	0,002
Aspartato	↓	<0,001
Piroglutamato	↓	<0,001
4-Hidroxi prolina	↓	<0,001
Ácido treónico	↓	0,005
Glutamato	↓	<0,001
Fenilalanina	↑	0,62
Asparagina	↓	<0,001
Glutamina	↑	0,64
Ornitina	↓	<0,001
Glucosa	↑	<0,001
Lisina	↓	<0,001
Tirosina	↓	0,001
Triptófano	↓	<0,001
alfa-tocoferol	↑	<0,001

- Se ha encontrado ahora un conjunto de metabolitos endógenos que identifica a los sujetos con riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune (EA). Un perfil de estos metabolitos endógenos del sujeto puede ayudar por tanto en el pronóstico, detección y diagnóstico de la enfermedad autoinmune, que se puede realizar antes de que aparezca ningún síntoma clínico, y esto hace posible que se empiece tempranamente el tratamiento preventivo o profilaxis de manera que se minimice cualquier daño de los tejidos a largo plazo. El perfil de los metabolitos endógenos se puede usar también como un instrumento para el cribado e identificación de fármacos y de nuevas entidades químicas (NCEs) que pueden actuar para restablecer los niveles normales de estos metabolitos endógenos, evitando o retrasando de este modo la aparición de la enfermedad autoinmune y siendo por tanto eficaces en el tratamiento de la enfermedad autoinmune.
- 5
- 10 Se ha identificado aquí un compuesto que en los ensayos ha demostrado capacidad para restablecer los niveles de metabolitos endógenos y el cual será beneficioso por tanto para prevenir, retrasar o reducir la aparición de enfermedades o trastornos, particularmente los que se creen de origen autoinmune, en muchas de sus formas.
- Los términos “biomarcador” y “metabolito endógeno”, y los plurales de los mismos, se utilizan en esta memoria de manera intercambiable.
- 15 En una realización, la invención proporciona un método *in vitro* para la detección de una alteración en el perfil metabólico de los metabolitos endógenos en un sujeto causada por la artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método:
- (i) medir los niveles de N metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 11, con el fin de producir un perfil metabólico de los N metabolitos endógenos de dicho sujeto;
- 20 (ii) comparar los niveles medidos de los N metabolitos endógenos con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida de un control;
- en donde los N metabolitos endógenos (EM) se seleccionan del grupo que consiste en:
- | | |
|---------|--------------|
| EM1 | Fenilalanina |
| EM2 | Tirosina |
| 25 EM3 | Isoleucina |
| EM8 | Glicina |
| EM9 | Glutamina |
| EM10 | Metionina |
| EM14 | Lisina |
| 30 EM15 | Asparagina |
| EM16 | Serina |
| EM17 | Triptófano |
| EM18 | Treonina |
- en donde la alteración en el perfil metabólico es aquella en donde hay una disminución en el nivel de cada uno de los N metabolitos endógenos medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en la muestra biológica obtenida del control, y en donde la alteración en el perfil metabólico es debida a la artritis reumatoide del sujeto.
- 35 La invención proporciona también un método *in vitro* para la detección de una alteración en el perfil metabólico de los metabolitos endógenos de un sujeto causada por la artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método:
- 40 (i) medir los niveles de N metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 11, con el fin de producir un perfil metabólico de los N metabolitos endógenos de dicho sujeto;
- (ii) comparar los niveles medidos de los N metabolitos endógenos con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida previamente del sujeto;
- en donde los N metabolitos endógenos se seleccionan del grupo que consiste en:
- | | |
|--------|--------------|
| 45 EM1 | Fenilalanina |
| EM2 | Tirosina |

- | | | |
|---|------|------------|
| | EM3 | Isoleucina |
| | EM8 | Glicina |
| | EM9 | Glutamina |
| | EM10 | Metionina |
| 5 | EM14 | Lisina |
| | EM15 | Asparagina |
| | EM16 | Serina |
| | EM17 | Triptófano |
| | EM18 | Treonina |
- 10 en donde la alteración en el perfil metabólico es aquella en donde hay una disminución en el nivel de cada uno de los N metabolitos endógenos medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en la muestra biológica obtenida previamente del sujeto, y en donde la alteración en el perfil metabólico es debida a la artritis reumatoide del sujeto.
- También se describe un método para diagnosticar o detectar la AR en un sujeto, comprendiendo el método:
- 15 (i) medir los niveles de N biomarcadores en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 2-11;
- (ii) comparar los niveles medidos de los N biomarcadores con los niveles correspondientes de los biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un control;
- en donde los N biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en:
- | | | |
|----|------|--------------|
| | EM1 | Fenilalanina |
| 20 | EM2 | Tirosina |
| | EM3 | Isoleucina |
| | EM8 | Glicina |
| | EM9 | Glutamina |
| | EM10 | Metionina |
| 25 | EM14 | Lisina |
| | EM15 | Asparagina |
| | EM16 | Serina |
| | EM17 | Triptófano |
| | EM18 | Treonina |
- 30 en donde una disminución en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de los biomarcadores en la muestra biológica obtenida del control, es indicativa de la presencia de artritis reumatoide en el sujeto.
- También se describe un método para hacer seguimiento del progreso de la AR en un sujeto, comprendiendo el método:
- 35 (i) medir los niveles de N biomarcadores en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 2-11;
- (ii) comparar los niveles medidos de los N biomarcadores con los niveles correspondientes de los biomarcadores en una muestra biológica obtenida previamente del sujeto;
- en donde los N biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en:
- | | | |
|----|-----|--------------|
| | EM1 | Fenilalanina |
| 40 | EM2 | Tirosina |
| | EM3 | Isoleucina |

	EM8	Glicina
	EM9	Glutamina
	EM10	Metionina
	EM14	Lisina
5	EM15	Asparagina
	EM16	Serina
	EM17	Triptófano
	EM18	Treonina

10 en donde las diferencias en los niveles de los N biomarcadores medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de los biomarcadores en la muestra biológica obtenida previamente del sujeto, son indicativas de un cambio en el pronóstico de la AR en el sujeto.

En particular, un aumento en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos es indicativo de una mejora del pronóstico de la AR en el sujeto.

15 Además, una disminución en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos es indicativa de un empeoramiento del pronóstico de la AR en el sujeto.

Se describe también un método para monitorizar la velocidad de empeoramiento o la velocidad de mejora de la AR en un sujeto, que comprende un método para monitorizar el progreso de la AR como se describe aquí, que comprende la etapa adicional de dividir el aumento o la disminución de los niveles de biomarcador por el intervalo de tiempo entre la toma de la primera muestra (esto es, la previa) y la segunda muestra del sujeto.

20 Se describe también un método para medir la eficacia de un medicamento que ha sido administrado a un sujeto para tratar la AR en dicho sujeto, comprendiendo el método:

(i) medir los niveles de N biomarcadores en una muestra biológica obtenida del sujeto tratado, en donde N es 2-11;

(ii) comparar los niveles medidos de los N biomarcadores con los niveles correspondientes de los biomarcadores en una muestra biológica obtenida previamente del sujeto;

25 en donde los N biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en:

	EM1	Fenilalanina
	EM2	Tirosina
	EM3	Isoleucina
	EM8	Glicina
30	EM9	Glutamina
	EM10	Metionina
	EM14	Lisina
	EM15	Asparagina
	EM16	Serina
35	EM17	Triptófano
	EM18	Treonina

en donde las diferencias en los niveles de los N biomarcadores medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto tratado en comparación con los niveles correspondientes de los biomarcadores en la muestra biológica obtenida previamente del sujeto, proporcionan una indicación de la eficacia del medicamento en dicho sujeto.

40 En particular, un aumento en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos es indicativo de que el medicamento es eficaz.

Además, una disminución en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos es indicativa de una falta de eficacia del medicamento.

Se describe también un método para medir la eficacia de un medicamento que ha sido administrado a un sujeto para tratar la AR en dicho sujeto, comprendiendo el método:

(i) medir los niveles de N biomarcadores en una muestra biológica obtenida del sujeto tratado, en donde N es 2-11;

5 (ii) comparar los niveles medidos de los N biomarcadores con los niveles correspondientes de los biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un control;

en donde los N biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en:

	EM1	Fenilalanina
	EM2	Tirosina
	EM3	Isoleucina
10	EM8	Glicina
	EM9	Glutamina
	EM10	Metionina
	EM14	Lisina
	EM15	Asparagina
15	EM16	Serina
	EM17	Triptófano
	EM18	Treonina

20 en donde las diferencias en los niveles de los N biomarcadores medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto tratado en comparación con los niveles correspondientes de los biomarcadores en la muestra biológica obtenida del control, proporcionan una indicación de la eficacia del medicamento en dicho sujeto.

En particular, un aumento en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos es indicativo de que el medicamento es eficaz.

Además, una disminución en el nivel de cada uno de los N biomarcadores medidos es indicativa de una falta de eficacia del medicamento.

25 Se describe también un método para monitorizar la eficacia de un medicamento que ha sido administrado a un sujeto para tratar la AR como se ha descrito antes, que comprende la etapa adicional de administrar el medicamento al sujeto antes de la etapa (i) o en el intervalo entre la toma de muestras.

30 En el contexto de los métodos anteriores para monitorizar la eficacia de un medicamento, en algunas realizaciones, el medicamento ha sido administrado al sujeto antes de que se hayan obtenido las dos muestras biológicas. En otras realizaciones, se ha administrado el medicamento al sujeto en el intervalo entre la toma de las dos muestras.

En algunas realizaciones, el término "método para diagnosticar o detectar la AR" significa un método para detectar una probable AR en un sujeto o un método para determinar un aumento de la probabilidad de AR en un sujeto.

Se describe también un método para prevenir, retrasar o reducir la aparición de una alteración del perfil metabólico en un sujeto, o para tratarla más tempranamente de lo que hasta ahora ha sido posible, que comprende:

35 a) detectar una alteración del perfil metabólico causada por artritis reumatoide, por un método que comprende:

(i) medir los niveles de N metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 2-11, con el fin de producir un perfil metabólico de los N metabolitos endógenos en dicho sujeto;

(ii) comparar los niveles medidos de los N metabolitos endógenos con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida de un control;

40 en donde los N metabolitos endógenos se seleccionan del grupo que consiste en:

	EM1	Fenilalanina
	EM2	Tirosina
	EM3	Isoleucina

- | | | |
|---|------|------------|
| | EM8 | Glicina |
| | EM9 | Glutamina |
| | EM10 | Metionina |
| | EM14 | Lisina |
| 5 | EM15 | Asparagina |
| | EM16 | Serina |
| | EM17 | Triptófano |
| | EM18 | Treonina |
- 10 en donde la alteración en el perfil metabólico es aquella en donde hay independientemente una disminución o un aumento en el nivel de cada uno de los N metabolitos endógenos medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de metabolitos endógenos en la muestra biológica obtenida del control;
- y en donde la alteración en el perfil metabólico es debida a la artritis reumatoide; y
- 15 (b1) prescribir o suministrar al sujeto o recomendar el tratamiento del sujeto con una cantidad de N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenamino)guanidina o una aminoguanidina, ya sea como base libre o en forma de sal, eficaz para prevenir, retrasar, reducir o tratar la aparición de la artritis reumatoide, o
- (b2) administrar a dicho sujeto una cantidad de N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenamino)guanidina o una aminoguanidina, ya sea como base libre o en forma de sal, eficaz para prevenir, retrasar, reducir o tratar la aparición de la artritis reumatoide.
- 20 Se describe también un método para prevenir, retrasar o reducir la aparición de una alteración del perfil metabólico en un sujeto, o para tratarla más tempranamente de lo que hasta ahora ha sido posible, que comprende:
- (a) detectar una alteración del perfil metabólico causada por la artritis reumatoide, por un método que comprende:
- (i) medir los niveles de N metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 2-11, con el fin de producir un perfil metabólico de los N metabolitos endógenos en dicho sujeto;
- 25 (ii) comparar los niveles medidos de los N metabolitos endógenos con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida previamente del sujeto;
- en donde los N metabolitos endógenos se seleccionan del grupo que consiste en:
- | | | |
|----|------|--------------|
| | EM1 | Fenilalanina |
| | EM2 | Tirosina |
| 30 | EM3 | Isoleucina |
| | EM8 | Glicina |
| | EM9 | Glutamina |
| | EM10 | Metionina |
| | EM14 | Lisina |
| 35 | EM15 | Asparagina |
| | EM16 | Serina |
| | EM17 | Triptófano |
| | EM18 | Treonina |
- 40 en donde la alteración en el perfil metabólico es aquella en donde hay independientemente una disminución o un aumento en el nivel de cada uno de los N metabolitos endógenos medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de metabolitos endógenos en la muestra biológica obtenida previamente del sujeto; y en donde la alteración en el perfil metabólico es debida a la artritis reumatoide; y

(b1) prescribir o suministrar al sujeto o recomendar el tratamiento del sujeto con una cantidad de N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenamino)guanidina o una aminoguanidina, ya sea como base libre o en forma de sal, eficaz para prevenir, retrasar, reducir o tratar la aparición de la artritis reumatoide, o

5 (b2) administrar a dicho sujeto una cantidad de N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenamino)guanidina o una aminoguanidina, ya sea como base libre o en forma de sal, eficaz para prevenir, retrasar, reducir o tratar la aparición de la artritis reumatoide.

10 En algunas realizaciones preferidas N es 3-11, 4-11, 5-11, 6-11, 7-11, 8-11, 9-11 o 10-11. En otras realizaciones preferidas, N es 2-5, 3-5 o 4-5. Todavía en otras realizaciones preferidas, N es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11. Todavía más en otras realizaciones preferidas, los metabolitos endógenos se seleccionan de los EM 1-3 y/o EM 8-10 y/o EM 14-18; o los metabolitos endógenos se seleccionan de EM2, EM3, EM8 y EM10.

El término "medir" incluye ensayar, cuantificar, representar por imagen o establecer de otra manera la presencia o ausencia del perfil del metabolito endógeno objetivo, subunidades del mismo, o combinaciones de objetivos ligados a reactivos, y similares, o ensayar, representar por imagen, determinar, establecer, o determinar de otra manera una o más características factuales de una enfermedad o trastorno como se define aquí.

15 Los niveles de los N metabolitos endógenos individuales en las muestras biológicas se pueden medir utilizando las mismas o diferentes técnicas.

20 El perfil de metabolito endógeno se puede medir utilizando cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el perfil de metabolito endógeno se puede medir utilizando métodos cromatográficos y/o espectroscópicos o un reactivo que detecte o que se una a los metabolitos endógenos en el perfil, preferiblemente utilizando anticuerpos individuales específicamente reactivos con los metabolitos endógenos individuales del perfil o una parte de ellos.

25 Se ha encontrado ahora un conjunto de metabolitos endógenos que identifica a los sujetos en riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o trastornos. El perfil de estos metabolitos endógenos de un sujeto puede ayudar por tanto en el pronóstico, detección y diagnóstico de estas enfermedades o trastornos. El perfil de los metabolitos endógenos se puede utilizar también como un instrumento para el cribado e identificación de fármacos y de nuevas entidades químicas (NCEs) que actúan para restablecer los niveles normales de estos metabolitos endógenos, y con ello prevenir o retrasar la aparición de estas enfermedades o trastornos y de este modo ser eficaces en el tratamiento de estas enfermedades o trastornos.

30 El compuesto N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenamino)guanidina, utilizado aquí ya sea como base libre o en forma de sal, p.ej. como el acetato, punto de fusión 198-200 °C, es un compuesto conocido. Su preparación y formulaciones adecuadas para contenerlo, han sido descritas, p.ej., en el documento WO 02/11715.

La invención proporciona además el compuesto N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenaminoguanidina, ya sea como base libre o en forma de sal, para uso según la reivindicación 12.

35 Los ejemplos de métodos cromatográficos y espectroscópicos adecuados incluyen espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

40 El perfil de metabolito endógeno se puede medir por una técnica basada en cromatografía. Los compuestos metabolitos endógenos se pueden detectar como son o se pueden transformar químicamente (derivatizar) antes de la detección. Los métodos de detección pueden ser, pero no se limitan a la absorbancia de la luz de la muestra, preferiblemente con detector UV, o midiendo la relación masa /carga mediante un espectrómetro de masas (p.ej. Fonteh, A. N. *et al.*, Amino Acids. 32: 203-212 (2007)).

45 Otros métodos para medir los metabolitos endógenos incluyen técnicas espectroscópicas utilizadas conjuntamente con métodos quimiométricos, p.ej. análisis del componente principal (PCA), proyecciones de mínimos cuadrados parciales a estructuras latentes (PLS), PLS ortogonal (OPLS), análisis discriminatorio por PLS (PLS-DA) y PLS-DA ortogonal (OPLS-DA).

50 Otros métodos para medir los metabolitos endógenos incluyen tomar una medida de espectroscopía en multi-longitudes de onda, típicamente un espectro de transmisión de la muestra p.ej. en el intervalo del infrarrojo cercano del espectro electromagnético y comparar este espectro con el espectro de una muestra estándar procedente de un sujeto control. A partir de una comparación basada en métodos quimiométricos se determina entonces si la muestra indica una enfermedad o trastorno como se definen aquí.

En una realización preferida de la invención, los niveles de uno o más de los N metabolitos endógenos se miden independientemente utilizando reactivos que se unen individualmente con los metabolitos endógenos individuales, los cuales se detectan entonces.

5 Preferiblemente, los niveles de uno o más de los N metabolitos endógenos se miden utilizando anticuerpos individuales que son específicos para los N metabolitos endógenos.

Los anticuerpos se pueden marcar directa o indirectamente utilizando una etiqueta detectable. Ejemplos de etiquetas detectables incluyen las enzimas. Preferiblemente, el sustrato para la enzima se selecciona de manera que el sustrato, o un producto de reacción de la enzima y sustrato, formen un complejo fluorescente; y el nivel del metabolito endógeno se determina midiendo el nivel del complejo fluorescente.

10 Los anticuerpos específicos para el perfil de metabolito endógeno usado en los métodos de la invención se pueden obtener de fuentes científicas o comerciales. Alternativamente, se pueden utilizar constituyentes nativos aislados del perfil de metabolito endógeno o constituyentes recombinantes del perfil de metabolito endógeno para preparar anticuerpos, anticuerpos monoclonales o policlonales, y fragmentos inmunológicamente activos (p.ej. un fragmento Fab o (Fab)₂), una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, anticuerpos humanizados, una molécula Fv de cadena sencilla obtenida por ingeniería genética (Ladner *et al.*, U.S. Pat. No. 4,946,778). Los anticuerpos, incluyendo los anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos y quimeras, se pueden preparar utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

20 Los anticuerpos específicamente reactivos con el perfil de metabolito endógeno, o sus derivados, se pueden utilizar para detectar el perfil de metabolito endógeno en diferentes muestras biológicas, por ejemplo se pueden utilizar en cualquiera de los inmunoensayos conocidos que se basan en la interacción de unión entre un determinante antigénico de una proteína y los anticuerpos. Ejemplos de tales ensayos son los radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos (p.ej. ELISA), inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, aglutinación por látex, hemaglutinación, y ensayos histoquímicos.

25 La muestra, o los anticuerpos específicos para el perfil de metabolito endógeno, se pueden inmovilizar. Son ejemplos de portadores adecuados agarosa, celulosa, dextrano, Sephadex, Sefarosa, liposomas, carboximetil-celulosa-poliestireno, papel de filtro, resina de intercambio iónico, película de plástico, tubo de plástico, perlas de vidrio, copolímero de poliamina-metil vinil-éter-ácido maleico, copolímero de aminoácidos, copolímero de etileno-ácido maleico, nilón, seda, etc. El portador puede estar en la forma de, por ejemplo, un tubo, placa de ensayo, pocillo, perlas, discos, esferas etc. El anticuerpo inmovilizado se puede preparar haciendo reaccionar el material con un portador insoluble adecuado utilizando métodos químicos o físicos conocidos, por ejemplo, acoplamiento con bromuro de cianógeno.

35 De acuerdo con una realización, se consigue determinar el perfil del metabolito endógeno en una muestra midiendo el inmunoensayo del perfil del metabolito endógeno. Se pueden utilizar una variedad de métodos de inmunoensayo para medir el perfil del metabolito endógeno. En general, un método de inmunoensayo para la detección del perfil del metabolito endógeno puede ser competitivo o no competitivo. Los métodos competitivos emplean típicamente anticuerpos inmovilizados o inmovilizables para el perfil del metabolito endógeno y formas marcadas del perfil del metabolito endógeno. La muestra del perfil del metabolito endógeno y los constituyentes marcados del perfil del metabolito endógeno compiten por la unión a anticuerpos específicos para los constituyentes del perfil del metabolito endógeno. Después de la separación de los constituyentes del perfil del metabolito endógeno marcados resultantes que se han llegado a unir a los anticuerpos específicos para el perfil del metabolito endógeno (fracción unida) de los que han permanecido sin unir (fracción no unida), se mide la cantidad de la marca en cualquier fracción unida o no unida y se puede correlacionar con la cantidad del perfil de metabolito endógeno en la muestra de ensayo en cualquier manera convencional, p.ej., por comparación con una curva estándar.

45 Los métodos y formatos de inmunoensayo descritos anteriormente, se pretende que sean ejemplos y que no sean limitantes ya que, en general, se debe entender que en la presente invención se puede utilizar cualquier método o formato de inmunoensayo.

50 Los términos "muestra", "muestra biológica", y similares significan un material que se sabe o se sospecha que contiene o expresa los metabolitos endógenos en el perfil. La muestra de ensayo se puede usar directamente tal como se obtiene de la fuente o después de un pre-tratamiento para modificar el carácter de la muestra. La muestra puede ser derivada de cualquier fuente biológica, tal como tejidos o extractos, incluyendo células, y fluidos fisiológicos, tales como, por ejemplo, sangre completa, plasma, suero; saliva, fluido de la lente ocular, fluido cerebroespinal, sudor, orina, leche, fluido ascítico, fluido sinovial, fluido peritoneal y similares. La muestra se puede obtener de animales, preferiblemente mamíferos, lo más preferiblemente seres humanos. La muestra se puede tratar antes de su uso, tal como preparando el plasma a partir de la sangre, diluyendo los fluidos viscosos, y similares. Los métodos de tratamiento pueden incluir filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de

55

los componentes que interfieren, adición de reactivos, y similares. En una realización preferida, la muestra biológica es un fluido biológico, más preferiblemente sangre o fluido sinovial.

El término "sujeto" se refiere a un animal de sangre caliente tal como un mamífero que sufre o es sospechoso de sufrir una enfermedad o trastorno como se definen aquí. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

- 5 Como se usa aquí, el término "control" se refiere a un individuo o grupo de individuos de la misma especie que el sujeto sometido a ensayo. Por ejemplo, si el sujeto es un ser humano, el control será también un ser humano.

10 El "control" será generalmente un grupo de uno o más individuos que no presentan signos de síntomas de ninguna enfermedad o trastorno como se definen aquí. En particular, los controles pueden ser individuos o grupos de individuos que son considerablemente más jóvenes que el sujeto sometido a ensayo (p.ej. individuos de 30, 40, 50 o 60 años) o los controles pueden ser parientes genéticos no afectados que pueden ser de edad similar.

En algunas realizaciones de la invención, el control o grupo control es de la misma edad o de aproximadamente la misma edad que el sujeto.

15 Los niveles de metabolito endógeno en el control pueden estar disponibles, por ejemplo, en gráficos publicados, bases de datos de ordenador, tablas de búsqueda, etc. En otras realizaciones, el término engloba un nivel que ha sido determinado previamente. Por lo tanto el método de la invención no se limita a los métodos que comprenden la etapa de analizar físicamente el nivel de metabolito endógeno obtenido de un control.

20 Los niveles de las muestras control procedentes de sujetos sanos se pueden establecer por estudios estadísticos prospectivos y/o retrospectivos. Para los estudios estadísticos se pueden seleccionar los sujetos sanos que no tengan signos clínicos de enfermedad ni anomalías. Se puede hacer el diagnóstico encontrando niveles estadísticamente diferentes del perfil de metabolito endógeno en comparación con una muestra control o con los niveles previos cuantificados para el mismo sujeto.

Preferiblemente, los cambios en los niveles de los metabolitos endógenos (entre las muestras del sujeto y del control o entre las muestras tomadas del sujeto a diferentes intervalos de tiempo) son cambios significativos.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, un aumento significativo es aquel en que el nivel del metabolito endógeno medido en la muestra biológica obtenida del sujeto tiene más de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de aumento comparado con el nivel correspondiente en la muestra biológica obtenida de un control. En otras realizaciones de la invención, un aumento significativo significa que el aumento es significativo utilizando los criterios $p < 0,05$, prueba de 2-colas.

30 En otras realizaciones de la presente invención, una disminución significativa es aquella en donde el nivel de metabolito endógeno medido en la muestra biológica obtenida del sujeto tiene más de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de disminución comparado con el nivel correspondiente en la muestra biológica obtenida de un control. En otras realizaciones de la invención, una disminución significativa significa que la disminución es significativa utilizando los criterios $p < 0,05$, prueba de 2-colas.

35 Los métodos de la invención se realizarán *in vitro*. En particular, el término "muestra biológica obtenida de" un sujeto o control pretende indicar que los métodos no se realizan en el cuerpo de un ser humano o animal. En particular, el término "obtenida de" puede comprender recibir una muestra de un agente que actúa en nombre del sujeto, p.ej. recibir una muestra de un doctor, enfermera, hospital, centro médico, etc., ya sea directa o indirectamente, p.ej. mediante mensajero o servicio postal.

40 En los métodos de la invención donde los niveles de metabolitos endógenos en una muestra biológica se comparan con los niveles correspondientes en una muestra biológica obtenida previamente de un sujeto, el intervalo de tiempo entre la toma de muestras puede ser cualquier periodo apropiado, p.ej. 1-60 meses, 1-36 meses, 1-12 meses o 1-6 meses.

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo utilizando un kit de diagnóstico para cuantificar el perfil de metabolito endógeno en una muestra biológica.

- 45 Se describe también un kit para uso en un método como se define aquí, que comprende reactivos para detectar la presencia de N metabolitos endógenos seleccionados del grupo que consiste en:

EM1	Fenilalanina
EM2	Tirosina
EM3	Isoleucina
50 EM8	Glicina

EM9	Glutamina
EM10	Metionina
EM14	Lisina
EM15	Asparagina
5 EM16	Serina
EM17	Triptófano
EM18	Treonina

en donde N es 2-11, opcionalmente junto con instrucciones de uso. Preferiblemente, N es 3-11, 4-11, 5-11, 6-11, 7-11, 8-11, 9-11, 10-11 u 11.

10 También se describe el uso de un kit de la invención para el diagnóstico o detección de una enfermedad o trastorno como se define aquí.

15 A modo de ejemplo, el kit puede contener anticuerpos específicos para los N metabolitos endógenos, anticuerpos frente a los anticuerpos marcados con una enzima; y un sustrato para la enzima. El kit puede contener también uno o más de, pocillos de placa de microtitulación, estándares, diluyente de ensayo, tampón de lavado, cubiertas adhesivas para placas, y/o instrucciones para realizar un método de la invención utilizando el kit.

20 El kit puede contener una solución para extracción de N metabolitos endógenos, un sistema adecuado de eluyentes, estándares adecuados internos o externos y posiblemente una columna cromatográfica adecuada y posiblemente reactivos para derivatización de los compuestos metabolitos endógenos. Un ejemplo de una técnica comercialmente disponible para esta cuantificación es la solución para análisis de aminoácidos por UPLC de Waters Corporation (Waters, Corporation).

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1. Historia natural de la diabetes tipo 1. TRIGR es un ensayo de prevención actual que se dirige a prevenir el desarrollo de la autoinmunidad frente a islotes. DPT-1 y ENDIT son ensayos clínicos del pasado en sujetos positivos con autoanticuerpos frente a islotes con riesgo predecible de diabetes tipo 1. Los análisis metabolómicos de suero pueden definir cambios debidos a iniciadores antes de la aparición de la autoinmunidad frente a islotes o a promotores que inducen la hiperglucemia esto es la aparición de la diabetes clínica.

30 Figura 2. Cuatro etapas de evolución de la artritis inflamatoria, adaptadas de (Dixon, W. G. *et al.*, Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 19: 37-53 (2005)). Durante la primera etapa que lleva hasta la aparición de los síntomas, la combinación de factores genéticos y ambientales desencadena una respuesta autoinmune y el desarrollo de inflamación de las articulaciones en el paciente. Esta fase puede compartir muchas características comunes para todas las enfermedades autoinmunes. En la segunda etapa se determina la persistencia de la poliartritis inflamatoria (IP). De nuevo, por razones en gran parte desconocidas, para algunos pacientes la inflamación de las articulaciones es temporal y algunos pacientes desarrollan una inflamación crónica. En la tercera y cuarta fases se determina el tipo de artritis y la gravedad de la enfermedad. Una gran proporción de pacientes que desarrollan una poliartritis inflamatoria aguda tendrán una completa recuperación en unos días o en unas pocas semanas, a menudo incluso sin consultar la unidad de atención primaria

40 Figura 3A. Gráfico de dispersión de puntuaciones (t[1]) de un modelo de OPLS-DA de controles y de pacientes con AR humanos. Los sujetos con AR (parte superior del gráfico, representados con triángulos) están bien separados de los controles (parte inferior del gráfico, representados con símbolos de cajas). Esta separación se basa enteramente en las configuraciones de los metabolitos endógenos de los dos grupos de individuos.

45 Figura 3B. Gráfico en columnas de las cargas (p[1], correlación a escala) de un modelo de OPLS-DA de controles humanos y de pacientes con AR. A partir de este gráfico se puede identificar el perfil de metabolito que describe la separación observada entre los controles y los pacientes diagnosticados con AR. Las cargas negativas indican metabolitos endógenos con niveles disminuidos en los sujetos con diagnóstico de AR. Todos los aminoácidos se regulan por disminución en el grupo de AR.

Figura 4A. Gráfico de dispersión de puntuaciones (t[1]/a [1]) de un modelo de OPLS-DA de controles y de pacientes con OA (osteoartritis) humanos. Los sujetos con OA (lado derecho del gráfico, representados con triángulos) están bien separados de los controles (lado izquierdo del gráfico, representados con símbolos de cajas). Esta separación se basa enteramente en las configuraciones de los metabolitos endógenos de los dos grupos de individuos.

50 Figura 4B. Gráfico en columnas de las cargas (p[1], correlación a escala) de un modelo de OPLS-DA de controles y de pacientes con OA humanos. A partir de este gráfico se puede identificar el perfil del metabolito que describe la

separación observada entre los controles y los pacientes diagnosticados con OA. Las cargas negativas indican metabolitos endógenos con niveles disminuidos en sujetos con diagnóstico de OA. Todos los aminoácidos se regulan por disminución en el grupo de OA.

5 Figura 5A. Gráfico de dispersión de puntuaciones ($t[1]/a [1]$) de un modelo de OPLS-DA de ratones con CIA (artritis inducida por colágeno) y controles sanos. Los ratones con CIA (lado derecho del gráfico, representados con triángulos) están bien separados de los controles (lado izquierdo del gráfico, representados con símbolos de cajas). Esta separación se basa enteramente en las configuraciones de los metabolitos endógenos de los dos grupos de individuos.

10 Figura 5B. Gráfico en columnas de las cargas ($p[1]$, correlación a escala) de un modelo de OPLS-DA de ratones con CIA y controles sanos. A partir de este gráfico se puede identificar el perfil del metabolito que describe la separación observada entre los controles y el grupo de enfermedad. Las cargas negativas indican metabolitos endógenos con niveles disminuidos en los sujetos con CIA. Todos los metabolitos se regulan por disminución en el grupo de enfermedad.

15 Figura 6A. Gráfico de dispersión de puntuaciones ($t[1]/a [1]$) de un modelo de OPLS-DA de ratas con AIA (artritis inducida por adyuvante) y controles sanos. Las ratas con AIA (lado derecho del gráfico, representadas con triángulos) están bien separadas de los controles (lado izquierdo del gráfico, representados con símbolos de cajas).

Figura 6B. Gráfico en columnas de las cargas ($p[1]$, correlación a escala) de un modelo de OPLS-DA de ratas con AIA y controles sanos. Muchos metabolitos se regulan por disminución en el grupo de enfermedad.

20 Figura 7A. Gráfico de dispersión de puntuaciones ($t[1]/a [1]$) de un modelo de OPLS-DA de ratas con AIA tratadas con una sustancia experimental. Los animales con AIA no tratados (lado derecho del gráfico, representados con triángulos) están bien separados de los animales con AIA que han recibido tratamiento con la sustancia experimental (lado izquierdo del gráfico, representados con cuadrados). Esta separación se basa en las configuraciones de los metabolitos endógenos de los dos grupos de individuos.

25 Figura 7B. Gráfico en columnas de las cargas ($p[1]$, correlación a escala) de un modelo de OPLS-DA de ratas con AIA tratadas con una sustancia experimental. Casi todos los metabolitos se regulan por incremento en los animales tratados, demostrando la eficacia del medicamento administrado.

30 Figuras 8A-17A. Gráfico de dispersión de puntuaciones ($t[1]$ frente a $[1]$) de un modelo de OPLS-DA de diferentes números de biomarcadores con sujetos control frente a sujetos con AR. Las muestras control están representadas con símbolos de cajas y las muestras con AR están representadas con símbolos triángulos. Hay una excelente separación entre los controles sanos y los pacientes diagnosticados. Esta separación se basa enteramente en las configuraciones de los metabolitos endógenos de los dos grupos de individuos.

35 Figuras 8B-17B. Gráfico de correlación a escala de las cargas de un modelo de OPLS-DA de diferentes números de biomarcadores con sujetos control frente a sujetos con AR. A partir de este gráfico se puede identificar el perfil del metabolito que describe la separación observada entre los controles y los pacientes diagnosticados con AR. Las cargas negativas indican biomarcadores con niveles disminuidos en sujetos con un diagnóstico de AR.

Figura 18. Tabla 5. Resumen de los resultados de comparación entre el caso de AR humano y los modelos animales relevantes. Los pesos indican la importancia relativa de los metabolitos endógenos y se pueden usar para proporcionar una interpretación de una muestra basada en una suma ponderada de promedios.

40 La presente invención se define además en los siguientes ejemplos, en los cuales las partes y porcentajes están en peso y los grados son grados Celsius, a menos que se indique otra cosa. Se debe entender que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1

Validación de un modelo animal como relevante para las enfermedades autoinmunes humanas

45 Diseño del estudio

Las muestras humanas de AR y OA utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

-19 pacientes control

- 20 pacientes con AR

- 20 pacientes con OA

Se recogieron muestras de suero de 59 personas: 20 de ellas habían sido diagnosticadas de AR, 20 de ellas habían sido diagnosticadas de OA y 19 donantes de sangre se consideraron como controles sanos que no habían tenido aún ningún diagnóstico.

5 Las muestras del modelo de ratón utilizadas consisten en las siguientes muestras de sangre:

- 7 muestras de controles,

- 9 muestras de sujetos con CIA (artritis inducida por colágeno)

Las muestras del modelo de rata utilizadas consisten en las siguientes muestras de sangre:

- 6 muestras de controles

10 - 6 muestras de sujetos con AIA (artritis inducida por adyuvante)

Extracción de metabolitos del suero

15 La extracción de metabolitos de las muestras de suero se realizó esencialmente como el método descrito por A *et al.* (2005). Se añadieron a 70 μL de suero, 630 μL de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (9:1 V:V) incluyendo estándares internos. Se mezcló la solución con vórtex durante 10 s, se mantuvo en hielo durante 10 min, y después se extrajo vigorosamente a una frecuencia de 30 Hz durante 3 min utilizando un molino de vibración MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany). Después de 120 min en hielo, se centrifugaron las muestras a 19 600 g durante 10 min a 4 °C. Se transfirieron 200 μL del sobrenadante a un vial de cromatografía de gases, y se transfirieron 50 μL a un vial de LC/MS y se evaporó a sequedad.

Análisis de GC/TOFMS (cromatografía de gases/ espectrometría de masas de tiempo de vuelo)

20 Antes del análisis de GC/MS se derivatizaron las muestras con 30 μL de hidrocloreuro de metoxiamina (15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en piridina agitando durante 10 min a 5 °C, incubándolas después durante 16 h a temperatura ambiente. Después se trimetilsililaron las muestras añadiendo 30 μL de N-metil-N-trifluoroacetamida (MSTFA) con 1 % de TMCS (clorotrimetilsilano) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la sililación, se añadieron 30 μL de heptano (que contenía 0,5 μg de estearato de metilo como estándar interno).

25 Se inyectaron sin división (splitless) 0,1 μL de muestra derivatizada mediante un automuestreador Agilent 7683 Series (Agilent, Atlanta; GA, USA) a un cromatógrafo de gases Agilent 6980 equipado con una columna capilar de sílice fundida de 10 m \times 0,18 mm ID químicamente protegida con una fase estacionaria DB5-MS de 0,18 μm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Se fijó la temperatura del inyector a 270 °C. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1 mL/min a través de la columna. Durante todo el análisis, se fijó el tiempo de purga en 60 s a un caudal de purga de 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y un tiempo de equilibrio de 1 min. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 70 °C durante 2 min, después se aumentó de 70 a 320 °C a 40 °C/min, donde se mantuvo durante 2 min. El efluente de la columna se introdujo en la fuente de iones de un TOFMS Pegasus III (Leco Corp., St Joseph, MI, USA). La temperatura de la línea de transferencia se fijó a 250 °C y la temperatura de la fuente de iones a 200 °C. Se generaron los iones mediante un haz de electrones de 70 eV a una corriente de 2,0 mA. Se midieron las masas de 50 a 800 m/z a una velocidad de 30 espectros/s, y se puso en marcha el voltaje de aceleración después de un retraso de disolvente de 170 s.

Procesado de los datos de MS.

40 Para evaluar los protocolos de extracción, los archivos MS no procesados procedentes de análisis GC/TOFMS y UPLC/MS se exportaron en formato NetCDF al software MATLAB 7.0 (Mathworks, Natick, MA, USA), donde se realizaron todos los procedimientos de pretratamiento de datos, tales como la corrección de la línea base, alineamiento de cromatograma, fijación de la ventana de tiempo y resolución de curvas multivariantes (MCR) utilizando *scripts* personalizados (Jonsson *et al.* 2005, 2006). De este modo se obtuvieron las concentraciones relativas de metabolito entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de los grupos de individuos, esto es, AR humana y control, ratón con CIA y controles, y rata con AIA y controles.

Resultados

5 Los metabolitos identificados (Tabla 5, Figuras 3A y 3B, 4A y 4B, 5A y 5B, 6A y 6B) consisten en aminoácidos y otros metabolitos asociados con AR y OA, y por lo tanto con una enfermedad autoinmune en humanos. El análisis OPLS demuestra que hay un gran solapamiento entre el caso humano y los dos modelos animales y que los metabolitos presentan similares configuraciones de regulación por disminución en los sujetos enfermos. El principal hallazgo fue que es posible comparar los modelos animales con el caso humano utilizando esta tecnología y también que es posible identificar el modelo más relevante para una enfermedad, en este caso una enfermedad autoinmune. Esto hace posible la validación de la relevancia de los modelos animales para el caso humano.

Ejemplo 2

10 Materiales y métodos

Se extrajeron los metabolitos del suero según protocolos estándar.

Muestras clínicas

Las muestras utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 19 pacientes control
- 15 - 20 pacientes con AR

Procedimientos

Se recogieron muestras de suero de 39 personas: 20 de ellas habían sido diagnosticadas de AR y 19 donantes de sangre se consideraron como controles sanos que no habían tenido aún ningún diagnóstico.

20 Los metabolitos endógenos se identificaron por métodos bien conocidos en la técnica y se obtuvieron las concentraciones relativas de metabolito entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de los dos grupos de individuos.

25 Resultados

El análisis multivariante reveló un perfil de los metabolitos endógenos que separa los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 3A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos.

30 Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 3B).

Los resultados del estudio demuestran que las propiedades diagnósticas del perfil de metabolito endógeno son muy sensibles y específicas para el diagnóstico de AR en los seres humanos. Los resultados demuestran también que el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad están íntimamente relacionados para un experto en la técnica.

Ejemplo 3

35 Materiales y métodos

Se extrajeron los metabolitos del suero según protocolos estándar.

Muestras clínicas

Las muestras utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 19 pacientes control
- 40 - 20 pacientes de OA

Procedimientos

Se recogieron muestras de suero de 39 personas: 20 de ellas habían sido diagnosticadas de OA y 19 donantes de sangre se consideraron como controles sanos que no habían tenido aún ningún diagnóstico.

Los metabolitos endógenos se identificaron por métodos bien conocidos en la técnica y se obtuvieron las concentraciones relativas de metabolito entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de los dos grupos de individuos.

Resultados

El análisis multivariante reveló un perfil de los metabolitos endógenos que separa los sujetos que tienen diagnóstico de OA de los del grupo sano (Figura 1). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos.

Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se identificaron los metabolitos que fueron más potentes para el diagnóstico de OA (Figura 2).

El resultado del estudio demuestra que las propiedades diagnósticas del perfil de metabolito endógeno son muy sensibles y específicas para el diagnóstico de OA en los seres humanos. Los resultados demuestran también que el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad están íntimamente relacionados para un experto en la técnica.

Ejemplo 4

Validación del modelo animal como relevante para la AR humana.

Diseño del estudio

Las muestras del modelo de ratón utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 7 muestras de los controles
- 9 muestras de sujetos con CIA

Las muestras del modelo de rata utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 6 muestras de los controles
- 6 muestras de sujetos con AIA

Extracción de metabolitos del suero

La extracción de metabolitos de las muestras de suero se realizó esencialmente como el método descrito por A *et al.* (2005). Se añadieron a 70 μ l de suero, 630 μ l de MeOH:H₂O (9:1 V:V) incluyendo estándares internos. Se mezcló la solución con vórtex durante 10 s, se mantuvo en hielo durante 10 min, y después se extrajo vigorosamente a una frecuencia de 30 Hz durante 3 min utilizando un molino de vibración MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany). Después de 120 min en hielo, se centrifugaron las muestras a 19 600 g durante 10 min a 4 °C. Se transfirieron 200 μ l del sobrenadante a un vial de cromatografía de gases, y se transfirieron 50 μ l a un vial de LC/MS y se evaporó a sequedad.

Análisis de GC/TOFMS

Antes del análisis de GC/MS se derivatizaron las muestras con 30 μ l de hidrocloreto de metoxiamina (15 mg.mL⁻¹) en piridina agitando durante 10 min a 5 °C, incubándolas después durante 16 h a temperatura ambiente. Después se trimetilsililaron las muestras añadiendo 30 μ l de N-metil-N-trifluoroacetamida (MSTFA) con 1 % de TMCS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de sililación, se añadieron 30 μ l de heptano (que contenía 0,5 μ g de estearato de metilo como estándar interno). Se inyectaron sin división (splitless) 0,1 μ l de muestra derivatizada mediante un automuestreador Agilent 7683 Series (Agilent, Atlanta; GA, USA) a un cromatógrafo de gases Agilent 6980 equipado con una columna capilar de sílice fundida de 10 m \times 0,18 mm ID químicamente protegida con una fase estacionaria DB5-MS de 0,18 μ m (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Se fijó la temperatura del inyector a 270 °C. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1 ml/min a través de la columna. Durante todo el análisis, se fijó el tiempo de purga en 60 s a un caudal de purga de 20 ml.min⁻¹ y un tiempo de equilibrio de 1 min. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 70 °C durante 2 min, después se aumentó de 70 a 320 °C a 40 °C./min, donde se mantuvo durante 2 min. El efluente de la columna se introdujo en la fuente de iones de un TOFMS Pegasus III (Leco Corp., St Joseph, MI, USA). La temperatura de la línea de transferencia se fijó a 250 °C y la temperatura de la fuente de iones a 200 °C. Se generaron los iones mediante un haz de electrones de 70 eV a una corriente de 2,0 mA. Se midieron las masas de 50 a 800 m/z a una velocidad de 30 espectros/s, y se puso en marcha el voltaje de aceleración después de un retraso de disolvente de 170 s.

Procesado de los datos de MS.

Para evaluar los protocolos de extracción, los archivos MS no procesados procedentes de análisis GC/TOFMS y UPLC/MS se exportaron en formato NetCDF al software MATLAB 7.0 (Mathworks, Natick, MA, USA), donde se realizaron todos los procedimientos de pretratamiento de datos, tales como la corrección de la línea base, alineamiento de cromatograma, fijación de la ventana de tiempo y resolución de curvas multivariantes (MCR) utilizando *scripts* personalizados (Jonsson *et al.* 2005, 2006). De este modo se obtuvieron las concentraciones relativas de metabolito entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de los grupos de individuos, esto es, AR humana y control, ratón con CIA y controles, y rata con AIA y controles.

Resultados

Los metabolitos identificados (Tabla 5, Figuras 3A y 3B, 4A y 4B, 5A y 5B, 6A y 6B) consisten en aminoácidos y otros metabolitos asociados con AR y OA, y por lo tanto con una enfermedad autoinmune en humanos. El análisis OPLS demuestra que hay un gran solapamiento entre el caso humano y los dos modelos animales y que los metabolitos presentan similares configuraciones de regulación por disminución en los sujetos enfermos. El principal hallazgo fue que es posible comparar los modelos animales con el caso humano utilizando esta tecnología y también que es posible identificar el modelo más relevante para una enfermedad, en este caso enfermedad autoinmune. Esto hace posible la validación de la relevancia de los modelos animales para el caso humano.

Ejemplo 5

Tratamiento de AR en un modelo de rata con AIA, con una sustancia experimental (arginina)

Diseño del estudio

Se indujo la AIA en tres ratas Dark Agouti (DA) y se sometió entonces a las ratas a tratamiento con una sustancia experimental.

Las muestras del modelo de rata utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 3 muestras de ratas DA con AIA

- 4 muestras (una de las ratas fue muestreada dos veces) de ratas DA con AIA tratadas con la sustancia experimental.

Extracción de metabolitos del suero

La extracción de metabolitos de las muestras de suero se realizó esencialmente como el método descrito por A *et al.* (2005). Se añadieron a 70 μ l de suero, 630 μ l de MeOH:H₂O (9:1 V:V) incluyendo estándares internos. Se mezcló la solución con vórtex durante 10 s, se mantuvo en hielo durante 10 min, y después se extrajo vigorosamente a una frecuencia de 30 Hz durante 3 min utilizando un molino de vibración MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany). Después de 120 min en hielo, se centrifugaron las muestras a 19 600 g durante 10 min a 4 °C. Se transfirieron 200 μ l del sobrenadante a un vial de cromatografía de gases, y se transfirieron 50 μ l a un vial de LC/MS y se evaporó a sequedad.

Análisis de GC/TOFMS

Antes del análisis de GC/MS se derivatizaron las muestras con 30 μ l de hidrocloreuro de metoxiamina (15 mg.mL⁻¹) en piridina agitando durante 10 min a 5 °C, incubándolas después durante 16 h a temperatura ambiente. Después se trimetilsililaron las muestras añadiendo 30 μ l de N-metil-N-trifluoroacetamida (MSTFA) con 1 % de TMCS y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de sililación, se añadieron 30 μ l de heptano (que contenía 0,5 μ g de estearato de metilo como estándar interno). Se inyectaron sin división (splitless) 0,1 μ l de muestra derivatizada mediante un automuestreador Agilent 7683 Series (Agilent, Atlanta; GA, USA) a un cromatógrafo de gases Agilent 6980 equipado con una columna capilar de sílice fundida de 10 m x 0,18 mm ID químicamente protegida con una fase estacionaria DB5-MS de 0,18 μ m (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Se fijó la temperatura del inyector a 270 °C. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1 ml/min a través de la columna. Durante todo el análisis, se fijó el tiempo de purga en 60 s a un caudal de purga de 20 ml.min⁻¹ y un tiempo de equilibrio de 1 min. La temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 70 °C durante 2 min, después se aumentó de 70 a 320 °C a 40 °C./min, donde se mantuvo durante 2 min. El efluente de la columna se introdujo en la fuente de iones de un TOFMS Pegasus III (Leco Corp., St Joseph, MI, USA). La temperatura de la línea de transferencia se fijó a 250 °C y la temperatura de la fuente de iones a 200 °C. Se generaron los iones mediante un

haz de electrones de 70 eV a una corriente de 2,0 mA. Se midieron las masas de 50 a 800 m/z a una velocidad de 30 espectros/s, y se puso en marcha el voltaje de aceleración después de un retraso de disolvente de 170 s.

Procesado de los datos de MS.

5 Para evaluar los protocolos de extracción, los archivos MS no procesados procedentes de análisis GC/TOFMS y UPLC/MS se exportaron en formato NetCDF al software MATLAB 7.0 (Mathworks, Natick, MA, USA), donde se realizaron todos los procedimientos de pretratamiento de datos, tales como la corrección de la línea base, alineamiento de cromatograma, fijación de la ventana de tiempo y resolución de curvas multivariantes (MCR) utilizando *scripts* personalizados (Jonsson *et al.* 2005, 2006). De este modo se obtuvieron las concentraciones relativas de metabolito entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de las ratas DA con AIA y de los individuos tratados.

15 Análisis de los datos

Se obtuvieron los datos que describen las concentraciones de metabolito relativas entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de los grupos de individuos, esto es, AR humana y control, ratón con CIA y controles, y rata con AIA y controles.

Resultados

25 Los metabolitos identificados (Figuras 7A y 7B) consisten en aminoácidos asociados con la enfermedad autoinmune en los seres humanos y en los modelos animales relevantes. El análisis OPLS demuestra que la tecnología descrita permitía la identificación de importantes cambios metabólicos en la rata con AIA después de que ha sido administrada la sustancia. La sustancia administrada produjo la regulación por incremento de muchos de los metabolitos asociados con la enfermedad autoinmune en los seres humanos y en los modelos animales relevantes. La tecnología aplicada para el análisis en suero de los metabolitos es sensible y específica para medir la eficacia del medicamento administrado para la enfermedad autoinmune utilizando este enfoque.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la potencia del compuesto activo y sus sales de adición de ácido terapéuticamente activas para el tratamiento de trastornos mentales.

Diseño del estudio

35 Se indujo la AIA en un total de 21 ratas Lewis que fueron incluidas en el estudio de tratamiento. Las muestras utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 22 muestras de ratas Lewis con AIA (una de las ratas fue muestreada dos veces)
- 26 muestras de ratas Lewis con AIA tratadas (cinco de las ratas fueron muestreadas dos veces)

Se distribuyeron diferentes tratamientos en los sujetos con AIA como sigue:

- 40
- 5 sujetos recibieron 1 mg de compuesto activo
 - 5 sujetos recibieron 3 mg de compuesto activo
 - 6 sujetos recibieron 10 mg de compuesto activo
 - 5 sujetos recibieron 1 mg de metotrexato

Extracción de metabolitos del suero

45 La extracción de metabolitos de las muestras de suero se realizó esencialmente como el método descrito por A *et al.* (2005). Se añadieron a 70 μ l de suero, 630 μ l de MeOH:H₂O (9:1 V:V) incluyendo estándares internos. Se mezcló la solución con vórtex durante 10 s, se mantuvo en hielo durante 10 min, y después se extrajo vigorosamente a una

frecuencia de 30 Hz durante 3 min utilizando un molino de vibración MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany). Después de 120 min en hielo, se centrifugaron las muestras a 19 600 g durante 10 min a 4 °C. Se transfirieron 200 µl del sobrenadante a un vial de cromatografía de gases, y se transfirieron 50 µl a un vial de LC/MS y se evaporó a sequedad.

- 5 El análisis de GC/TOFMS y el procesado de los datos de MS se realizaron como en el Ejemplo 1 anterior.

Resultados

- 10 Los niveles de los metabolitos, que consisten en aminoácidos y otros metabolitos asociados con T1D, AR y OA, y por tanto con una enfermedad autoinmune (EA) en humanos, que fueron identificados como metabolitos endógenos relevantes para la detección del riesgo de aparición de la EA, detección de la EA y monitorización del progreso de la EA (Tabla 5, Figuras 3A y 3B, 4A y 4B, 5A y 5B, 6A y 6B) se vieron significativamente afectados por el tratamiento con el compuesto activo. El análisis OPLS demuestra que los metabolitos presentan configuraciones similares de regulación por incremento en los sujetos tratados con el compuesto activo. El principal hallazgo fue que es posible restablecer los niveles de metabolitos asociados con la indicación de EA en modelos animales. Esto ha hecho posible la validación de la relevancia del tratamiento con el compuesto activo para el tratamiento profiláctico de la EA, tratamiento para retrasar o prevenir la aparición de la EA, y el tratamiento de la EA en modelos animales, y también para el caso humano.

Ejemplo 7

Materiales y métodos

Los metabolitos se extrajeron del suero según protocolos estándar.

- 20 Muestras clínicas

Las muestras utilizadas consistieron en las siguientes muestras de sangre:

- 19 pacientes control
- 20 pacientes de AR

Procedimientos

- 25 Se recogieron muestras de suero de 39 personas: 20 de ellas habían sido diagnosticadas de AR y 19 donantes de sangre se consideraron como controles sanos que no habían tenido aún ningún diagnóstico.

- 30 Los metabolitos endógenos se identificaron por métodos bien conocidos en la técnica y se obtuvieron las concentraciones relativas de metabolito entre muestras. Se analizaron estos datos con mínimos cuadrados parciales (PLS) (Wold, S. *et al.*, SIAM J. Sci. Statist. Comput. 5: 735-743 (1984); Hoskuldsson, A., J. Chemometr. 9: 91-123 (1995)) y PLS ortogonal (OPLS) (Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 16: 119-128 (2002); Trygg, J. *et al.*, J. Chemometrics. 17: 53-64 (2003)) como se implementa en el software SIMCA-P+ (Umetrics, AB: (2005)) para identificar las diferencias entre los niveles de metabolitos endógenos en las muestras obtenidas de los dos grupos de individuos.

Resultados

- 35 El análisis multivariante reveló un perfil de los metabolitos endógenos que separa los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 8A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos.

Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 8B).

- 40 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 9A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 9B).

- 45 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 10A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 10B).

- Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 11A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 11B).
- 5 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 12A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 12B).
- 10 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 13A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 13B).
- 15 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 14A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 14B).
- 20 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 15A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 15B).
- Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 16A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 16B).
- 25 Además, todos los metabolitos endógenos no tienen que ser usados para hacer posible la separación de los sujetos que tienen diagnóstico de AR de los del grupo sano (Figura 17A). El resultado fue una separación muy clara entre los dos grupos. Utilizando los parámetros del modelo, p.ej. cargas o pesos, se pueden identificar los metabolitos que son más potentes para el diagnóstico de AR (Figura 17B).
- 30 Los resultados del estudio demuestran que las propiedades diagnósticas del perfil de metabolitos endógenos son altamente sensibles y específicas para la AR en los seres humanos. Además, es la combinación de metabolitos endógenos específicos la que ofrece las mejores propiedades de diagnóstico. Los resultados demuestran también que el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad están íntimamente relacionados para un experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la detección de una alteración en el perfil metabólico de los metabolitos endógenos en un sujeto, causada por la artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método:

(i) medir los niveles de N metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 11, con el fin de producir un perfil metabólico de los N metabolitos endógenos de dicho sujeto;

5 (ii) comparar los niveles medidos de los N metabolitos endógenos con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida de un control;

en donde los N metabolitos endógenos (EM) son:

	EM1	Fenilalanina
	EM2	Tirosina
10	EM3	Isoleucina
	EM8	Glicina
	EM9	Glutamina
	EM10	Metionina
	EM14	Lisina
15	EM15	Asparagina
	EM16	Serina
	EM17	Triptófano
	EM18	Treonina

20 en donde la alteración en el perfil metabólico es aquella en donde hay una disminución en el nivel de cada uno de los N metabolitos endógenos medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en la muestra biológica obtenida del control, y en donde la alteración en el perfil metabólico es debida a la artritis reumatoide del sujeto.

2. Un método *in vitro* para la detección de una alteración en el perfil metabólico de los metabolitos endógenos en un sujeto, causada por la artritis reumatoide (AR), comprendiendo el método:

25 (i) medir los niveles de N metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde N es 11, con el fin de producir un perfil metabólico de los N metabolitos endógenos de dicho sujeto;

(ii) comparar los niveles medidos de los N metabolitos endógenos con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en una muestra biológica obtenida previamente del sujeto;

en donde los N metabolitos endógenos son:

30	EM1	Fenilalanina
	EM2	Tirosina
	EM3	Isoleucina
	EM8	Glicina
	EM9	Glutamina
35	EM10	Metionina
	EM14	Lisina
	EM15	Asparagina
	EM16	Serina
	EM17	Triptófano
40	EM18	Treonina

en donde la alteración en el perfil metabólico es aquella en donde hay una disminución en el nivel de cada uno de los N metabolitos endógenos medidos en la muestra biológica obtenida del sujeto en comparación con los niveles correspondientes de los metabolitos endógenos en la muestra biológica obtenida previamente del sujeto;

y en donde la alteración en el perfil metabólico es debida a la AR en el sujeto.

- 5 3. Un método para monitorizar la velocidad de empeoramiento o la velocidad de mejora o la velocidad de restablecimiento de un perfil metabólico sano en un sujeto, que comprende un método como se define en la reivindicación 2,
- y que adicionalmente comprende la etapa de dividir la disminución de los metabolitos endógenos por el intervalo de tiempo entre la toma de la primera muestra (esto es, la previa) y la segunda muestra del sujeto.
- 10 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra biológica es un fluido biológico, preferiblemente sangre o fluido sinovial.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto es un animal de sangre caliente.
6. Un método según la reivindicación 5, en donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.
- 15 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde uno o más de los niveles de los N metabolitos endógenos se miden por medios cromatográficos o espectroscópicos, preferiblemente en donde los métodos cromatográficos o espectroscópicos son espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) o cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).
- 20 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde uno o más de los niveles de los N metabolitos endógenos se miden por técnicas espectroscópicas utilizadas conjuntamente con métodos quimiométricos, preferiblemente en donde el método quimiométrico es análisis del componente principal (PCA), proyecciones de mínimos cuadrados parciales a estructuras latentes (PLS), PLS ortogonal (OPLS), análisis discriminatorio por PLS (PLS-DA) o PLS-DA ortogonal (OPLS-DA).
- 25 9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- (a) uno o más de los metabolitos endógenos se miden tomando una medida de espectroscopía de multi-longitudes de onda; o
- 30 (b) uno o más de los metabolitos endógenos se transforman químicamente (esto es, se derivatizan) antes de que sean medidos.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde uno o más de los metabolitos endógenos se miden utilizando reactivos que se unen individualmente a los metabolitos endógenos individuales, y que son detectados entonces.
- 35 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las disminuciones en los niveles de los metabolitos endógenos (entre las muestras del sujeto y del control o entre las muestras del sujeto tomadas a diferentes intervalos de tiempo) son disminuciones significativas.
- 40 12. La N-(2-cloro-3,4-dimetoxibencilidenamino)guanidina, ya sea como base libre o en forma de sal, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto, en donde el sujeto es aquel en que ha sido detectada una alteración en el perfil metabólico de los metabolitos endógenos causada por la artritis reumatoide por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

Figura 1

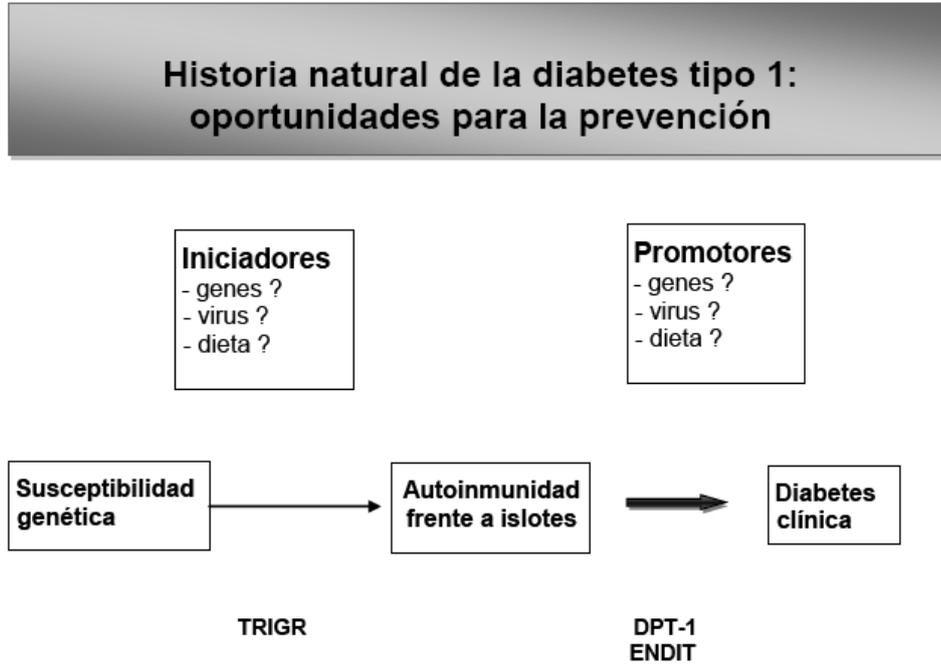


Figura 2

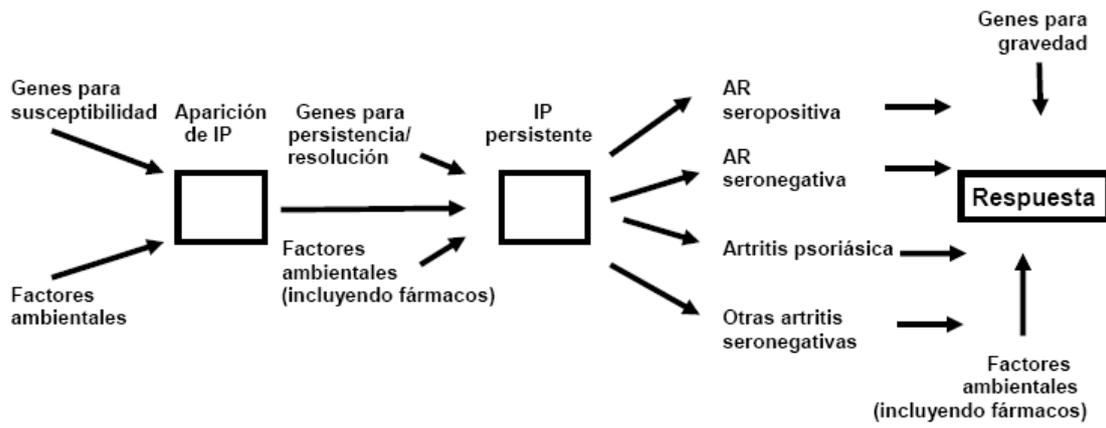
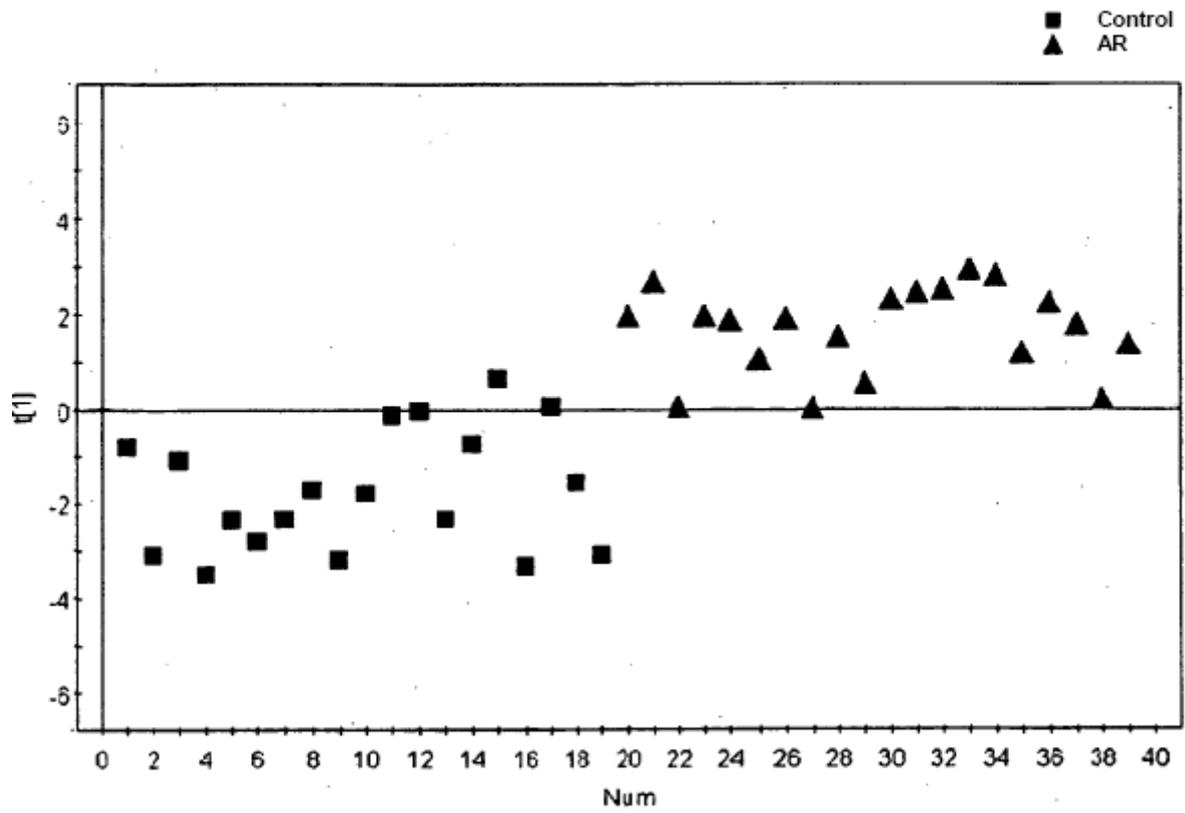


Figura 3A

AR humana



R2X[1] = 0.437703

Figura 3B
AR humana

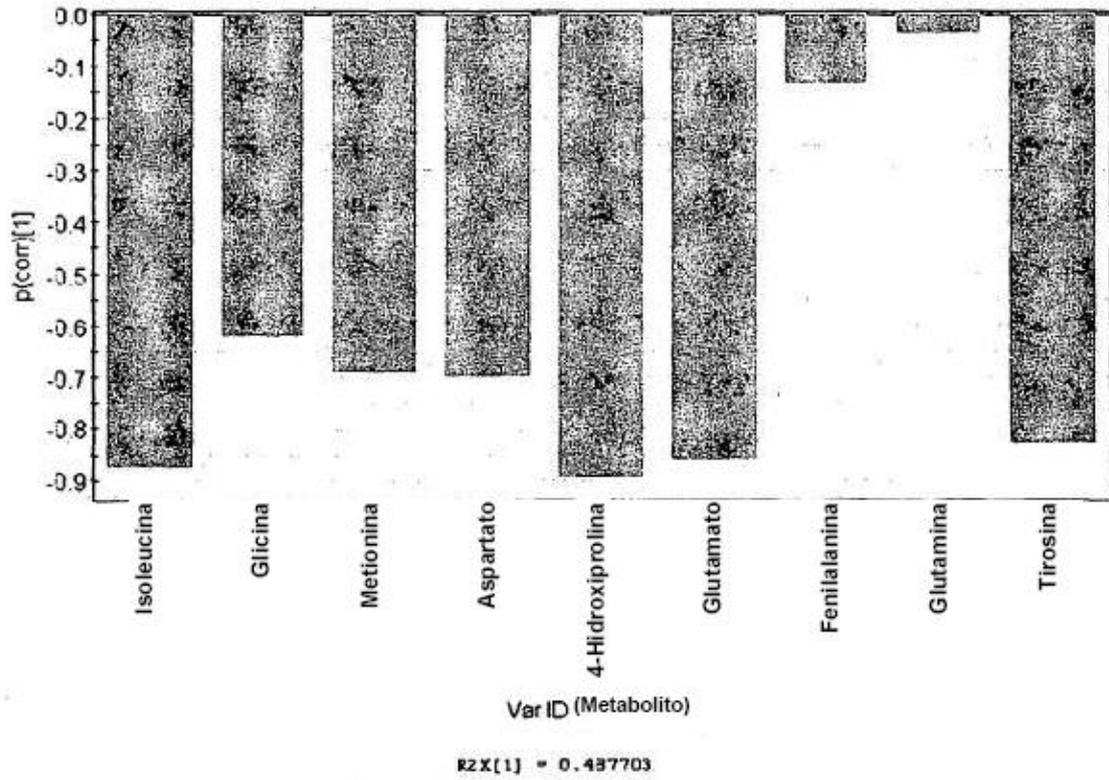


Figura 4A

OA humana

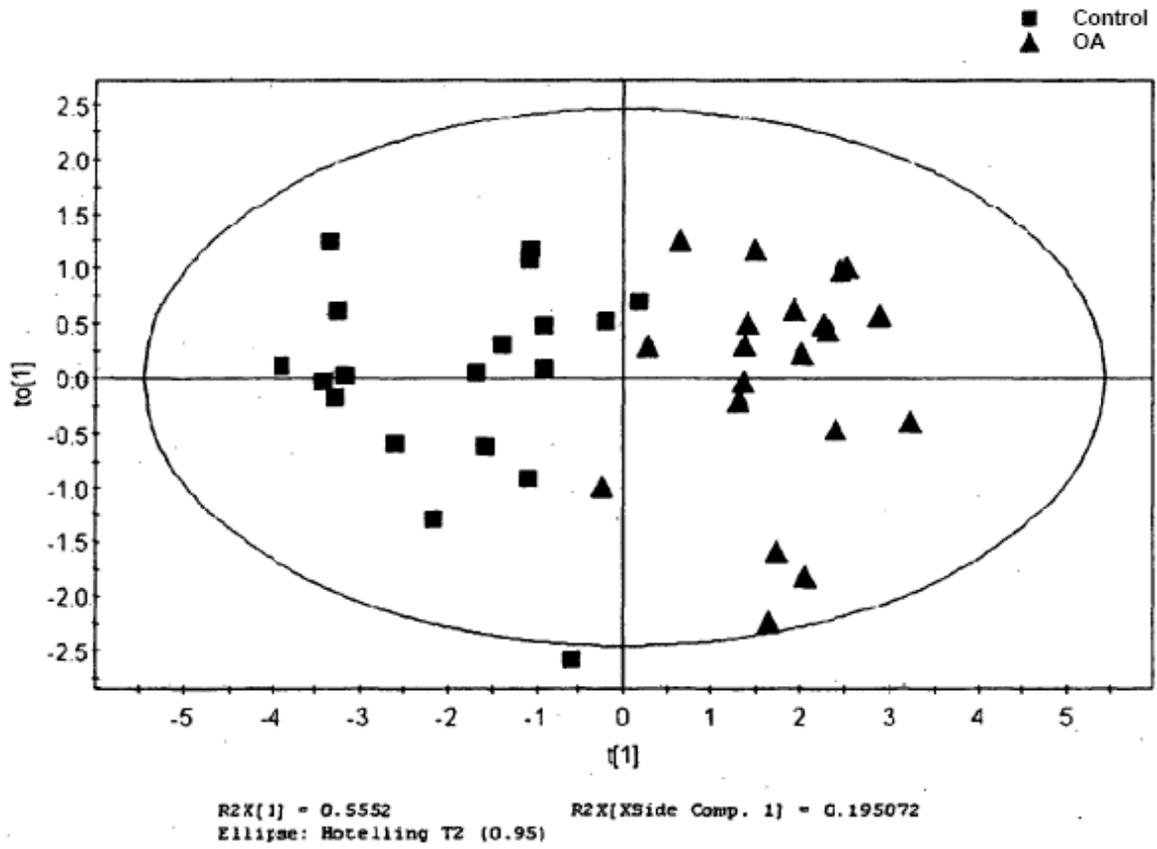


Figura 4B

OA humana

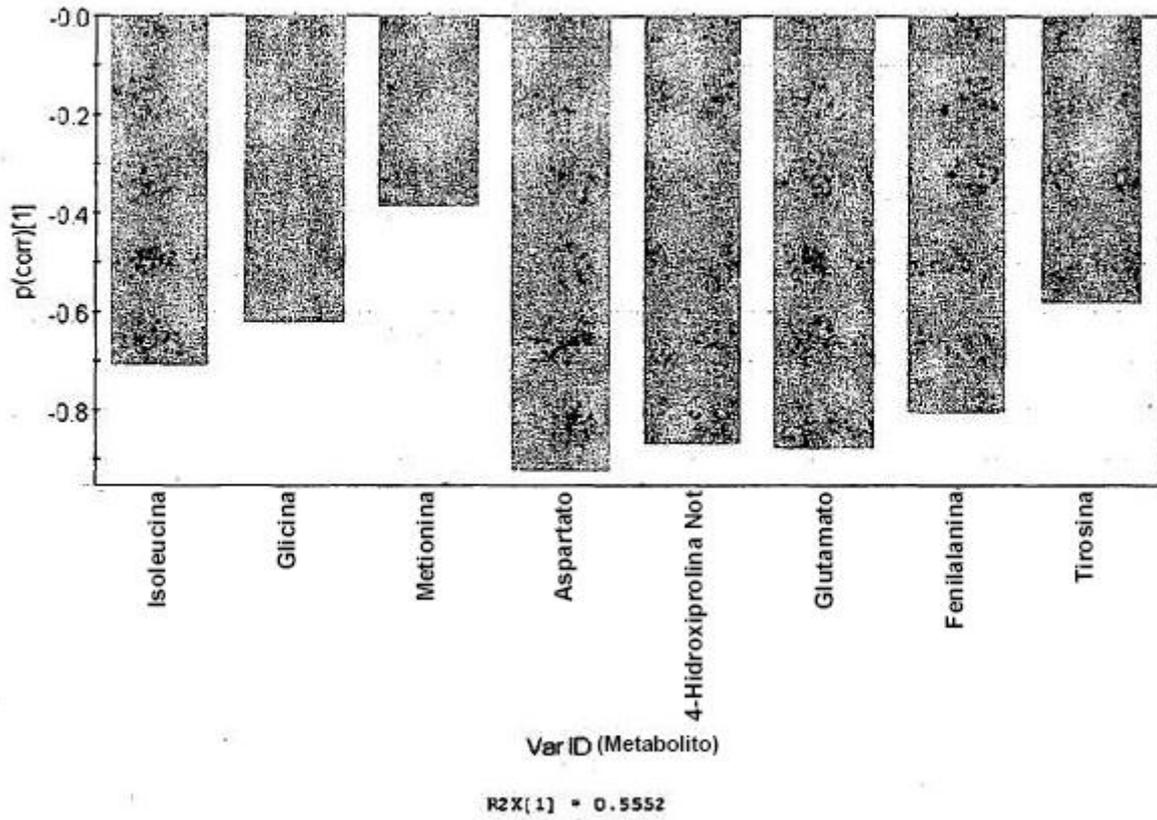
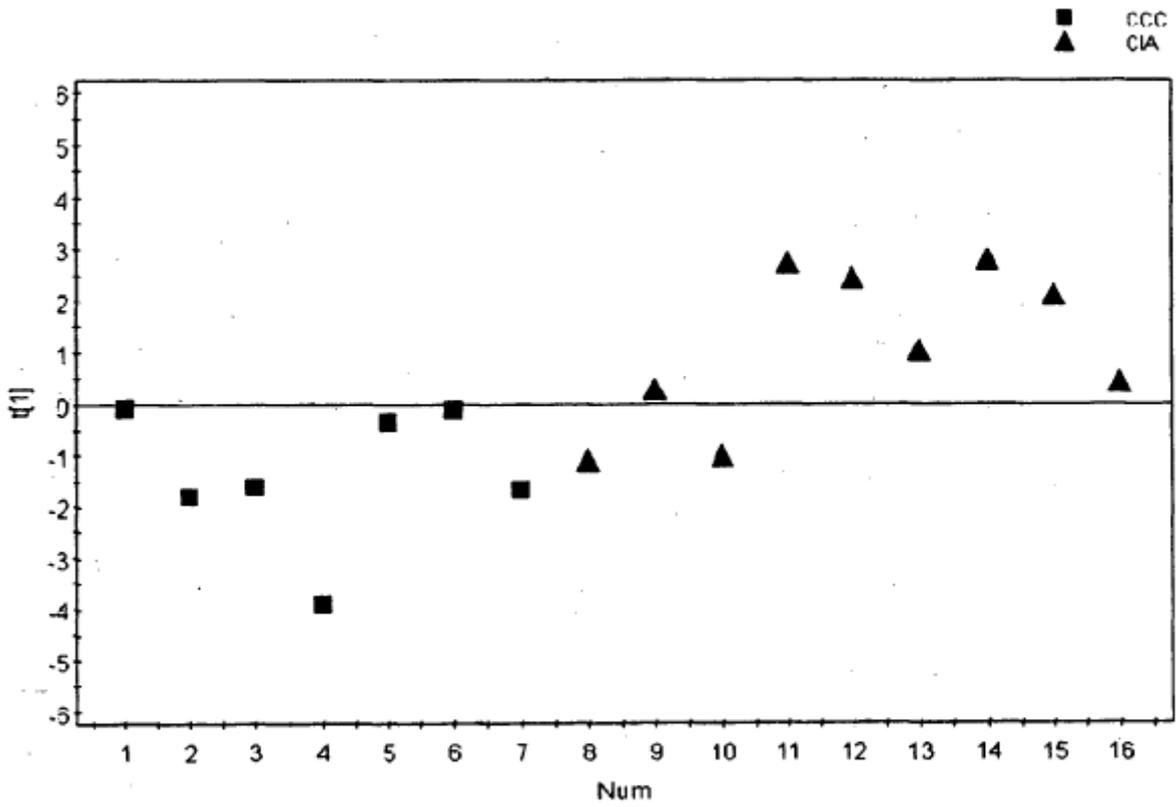


Figura 5A

AR en ratón, CIA vs. Control



R2X[1] = 0.391499

Figura 5B
AR en ratón, CIA vs. Control

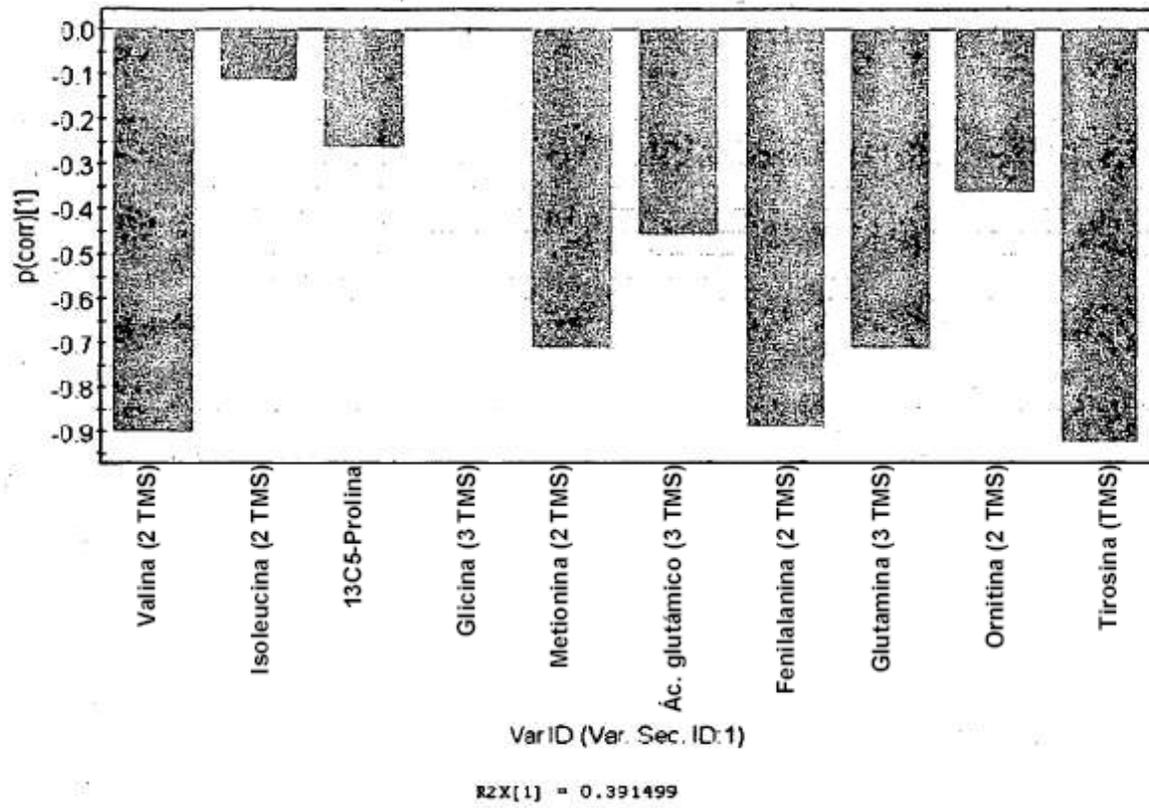


Figura 6A
AR en rata, AIA vs. Control

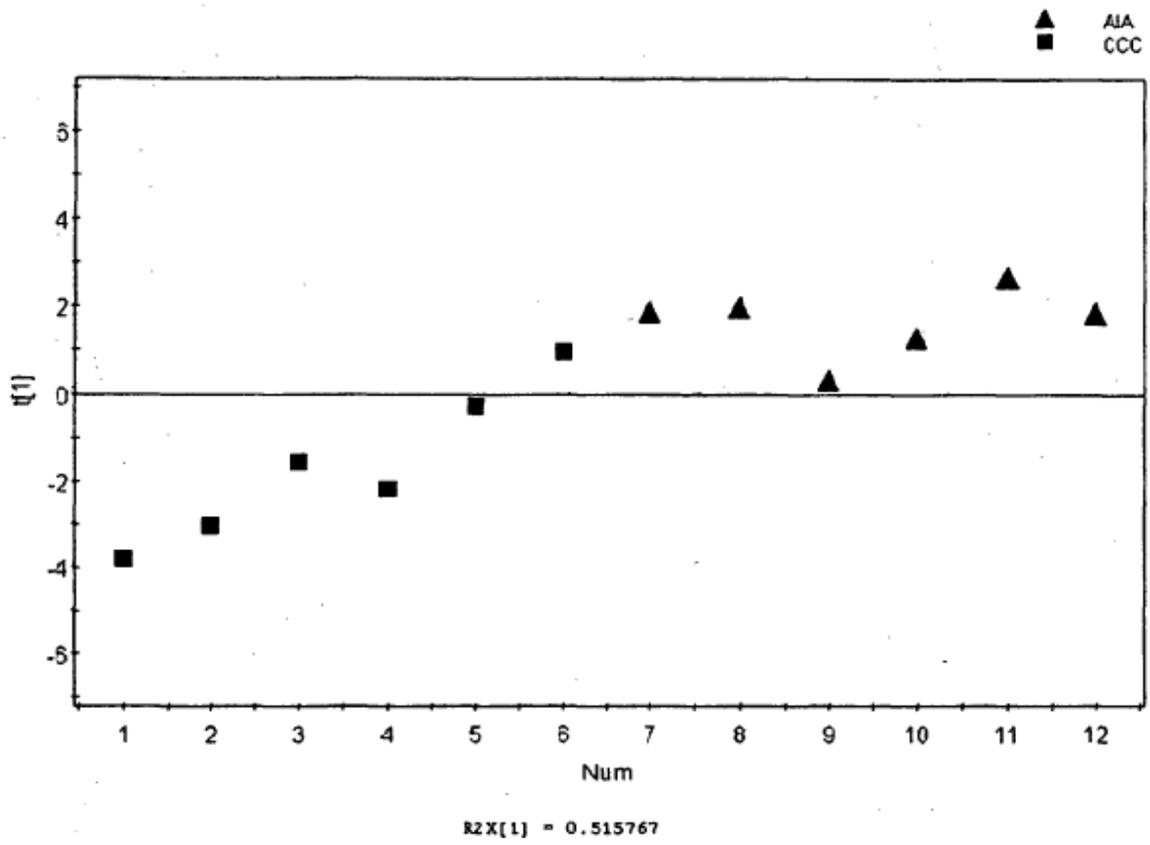


Figura 6B

AR en rata, AIA vs. Control

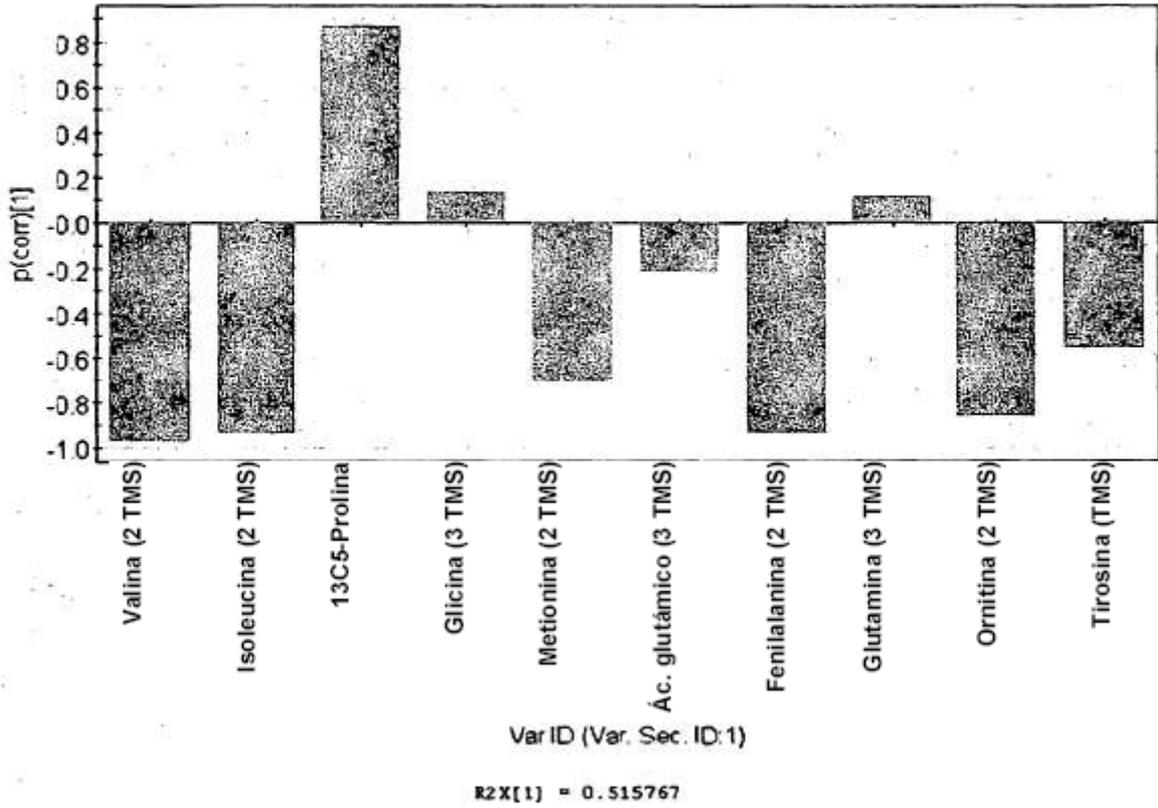


Figura 7A

AR en rata, ejemplo de tratamiento

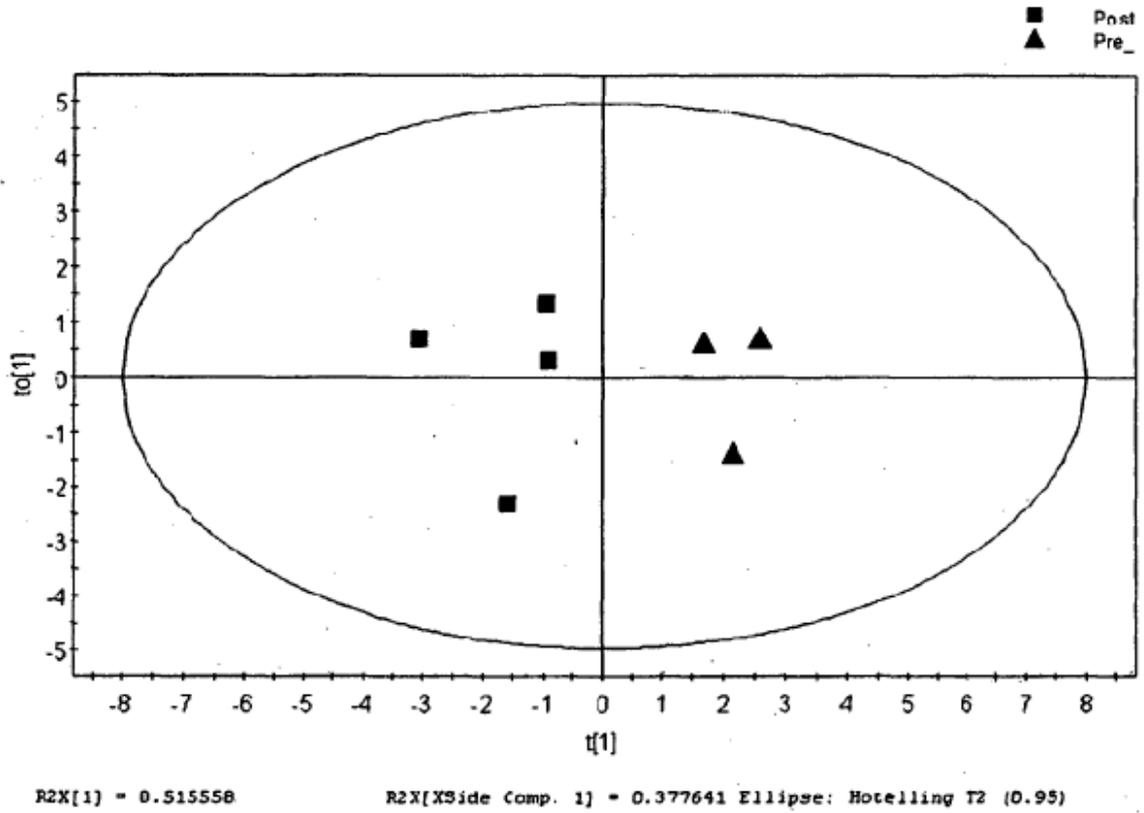


Figura 7B

AR en rata, ejemplo de tratamiento

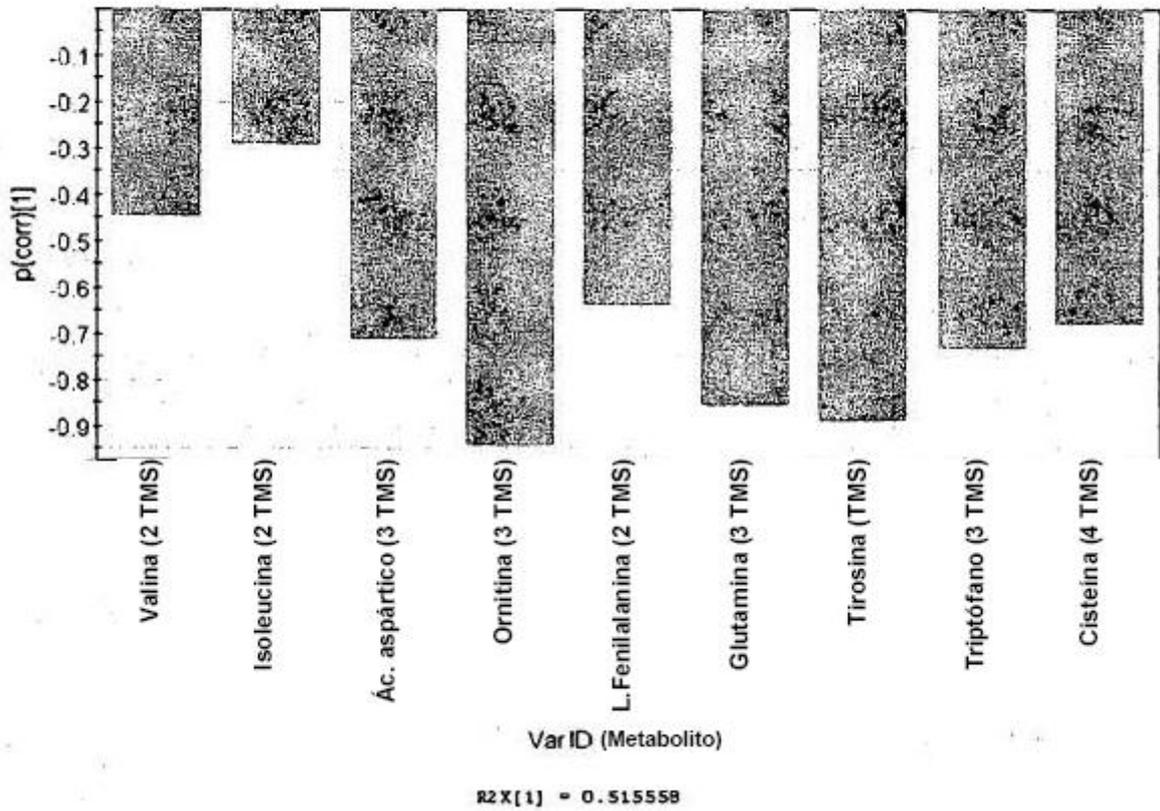


Figura 8A

AR humana, 11 metabolitos

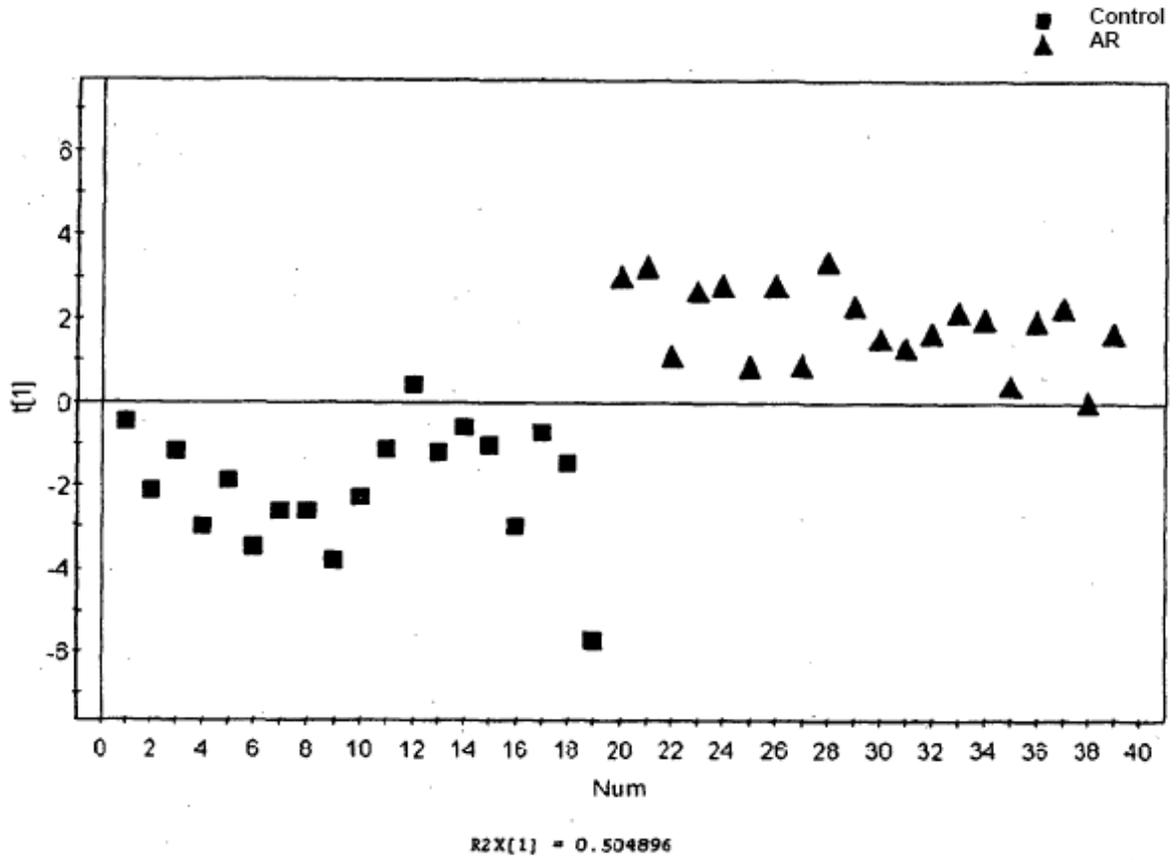


Figura 8B

AR humana, 11 metabolitos

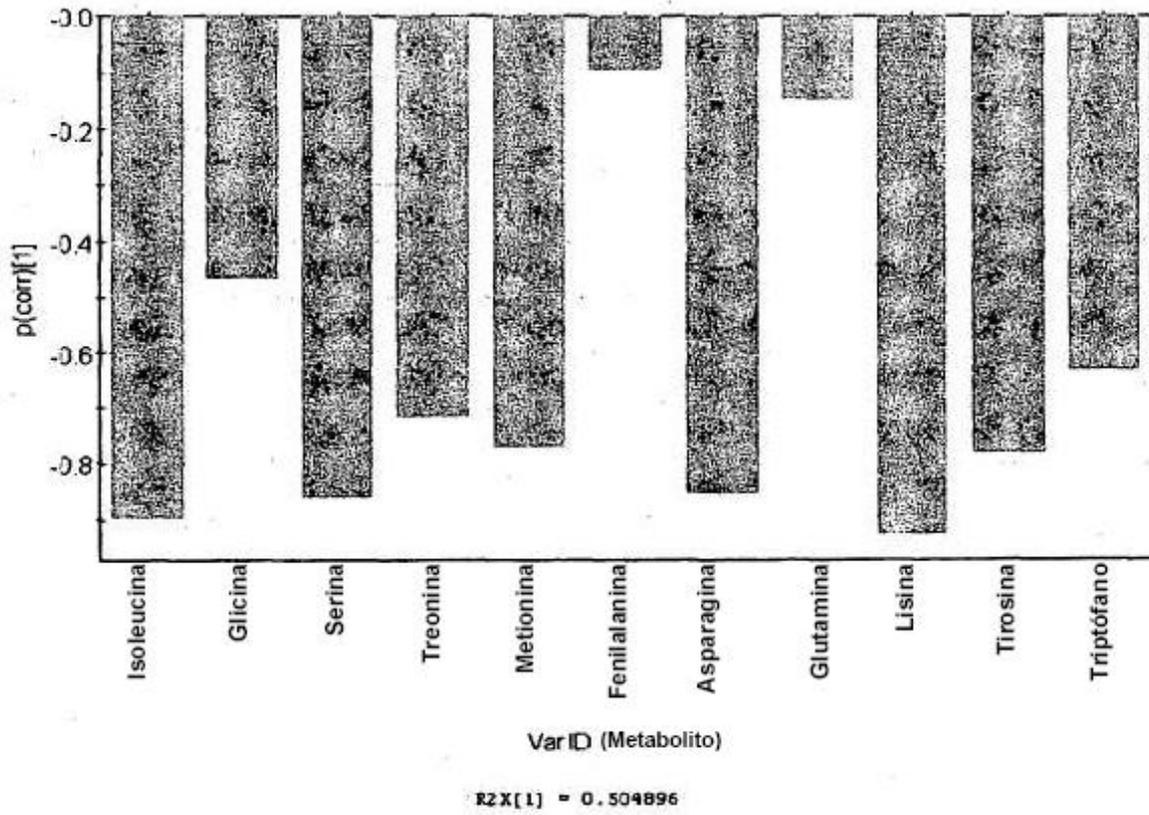


Figura 9A
AR humana, 10 metabolitos

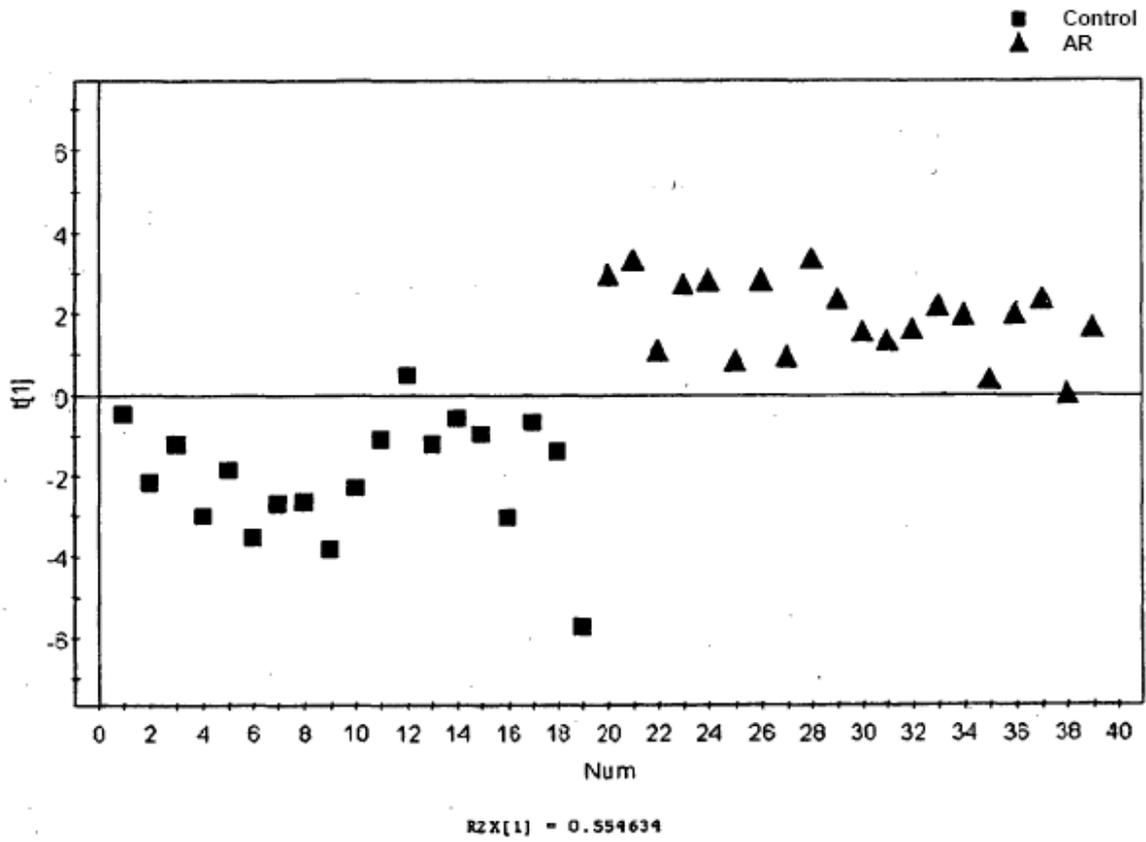


Figura 9B

AR humana, 10 metabolitos

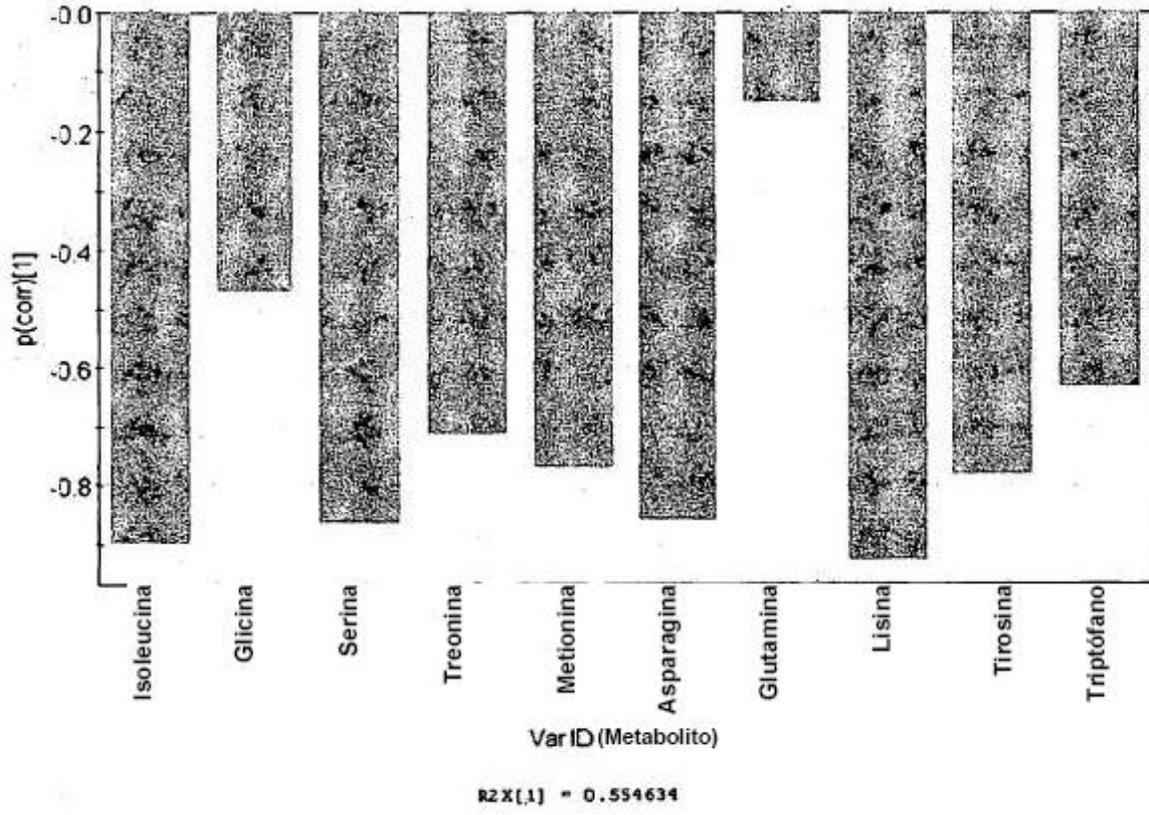
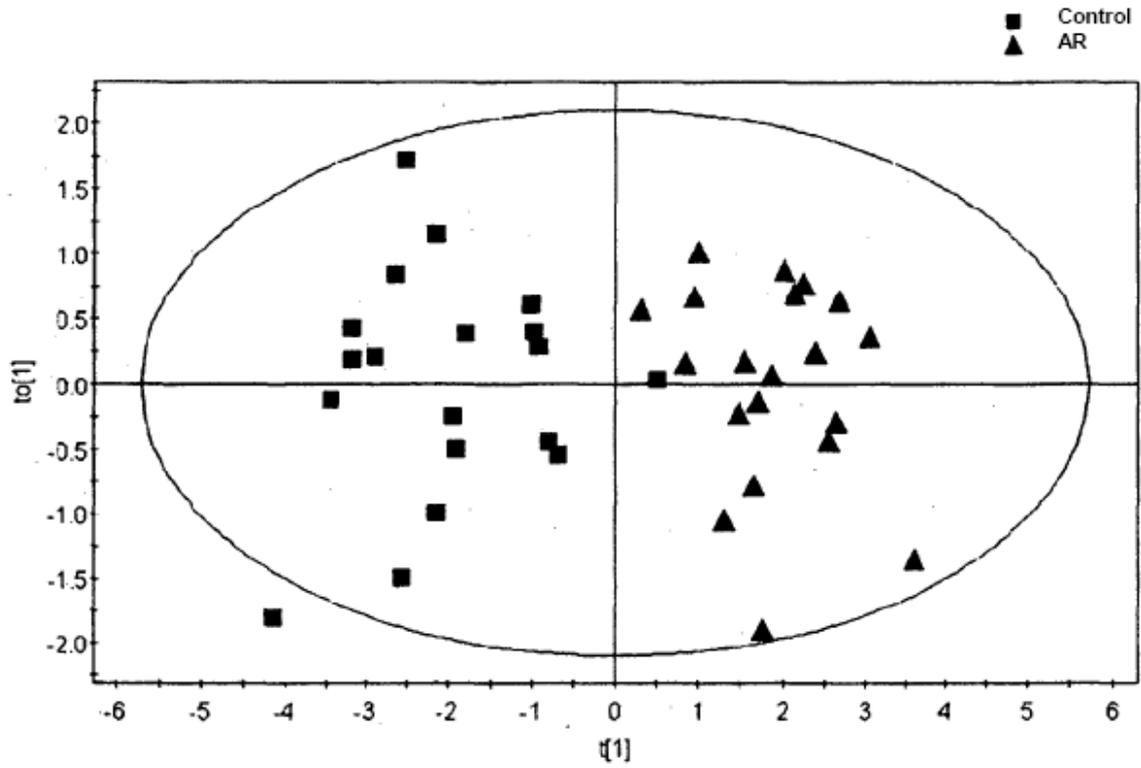


Figura 10A

AR humana, 9 metabolitos

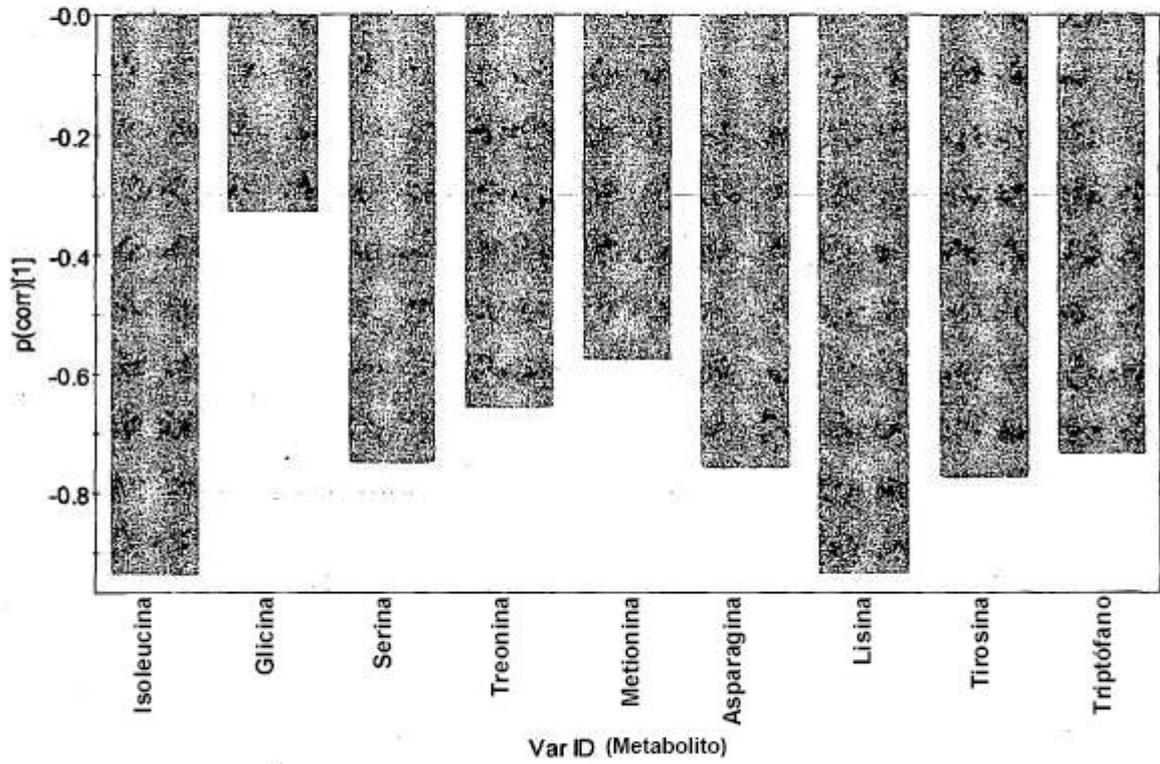


R2X[1] = 0.54574

R2X[XSide Comp. 1] = 0.150164 Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

Figura 10B

AR humana, 9 metabolitos



R2X[1] = 0.54574

SIMCA-P+ 12 - 2009-03-23 21:55:24 (UTC+1)

Figura 11A

AR humana, 8 metabolitos

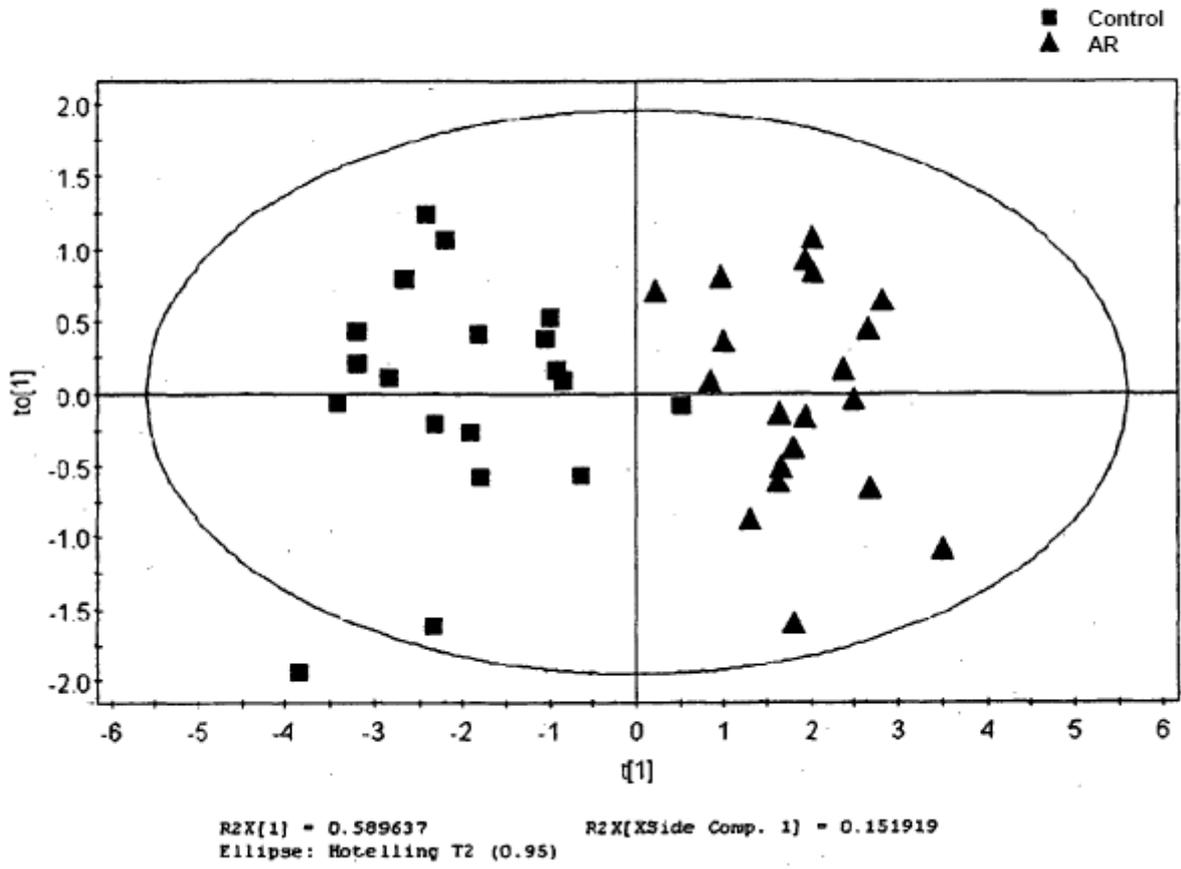


Figura 11B

AR humana, 8 metabolitos

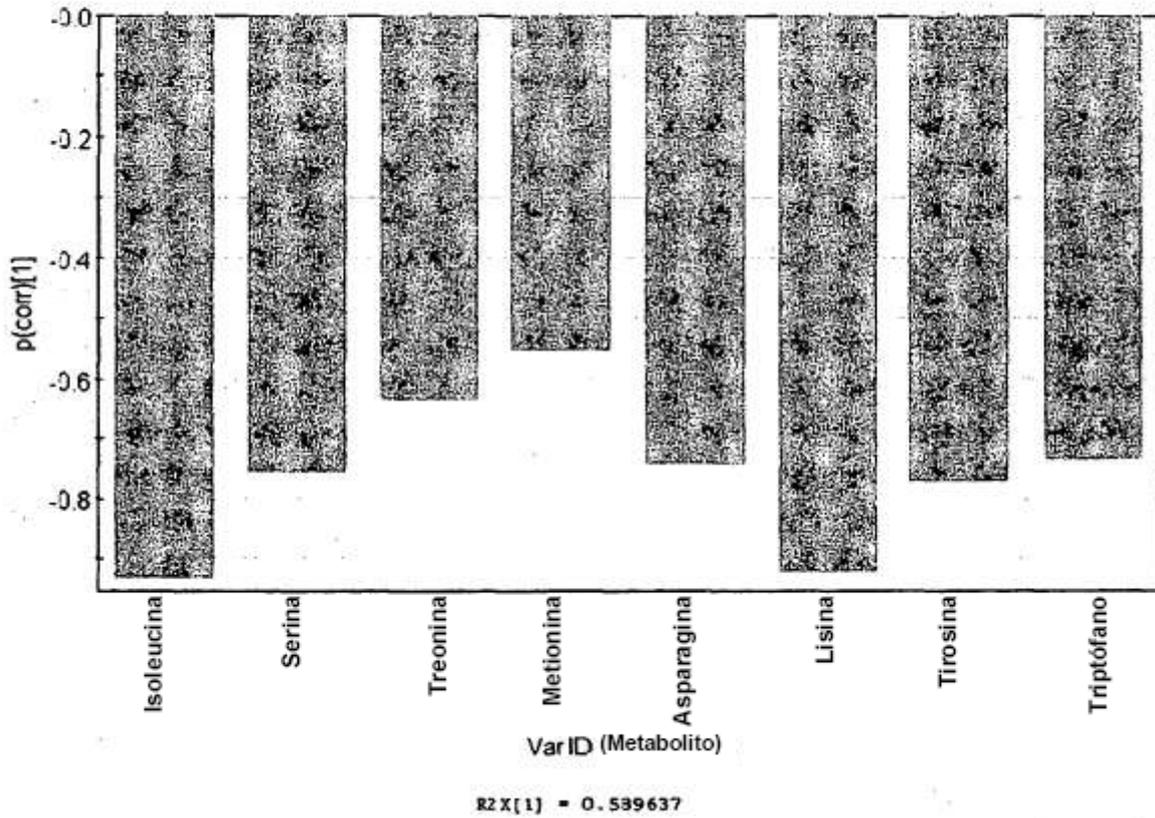


Figura 12A

AR humana, 7 metabolitos

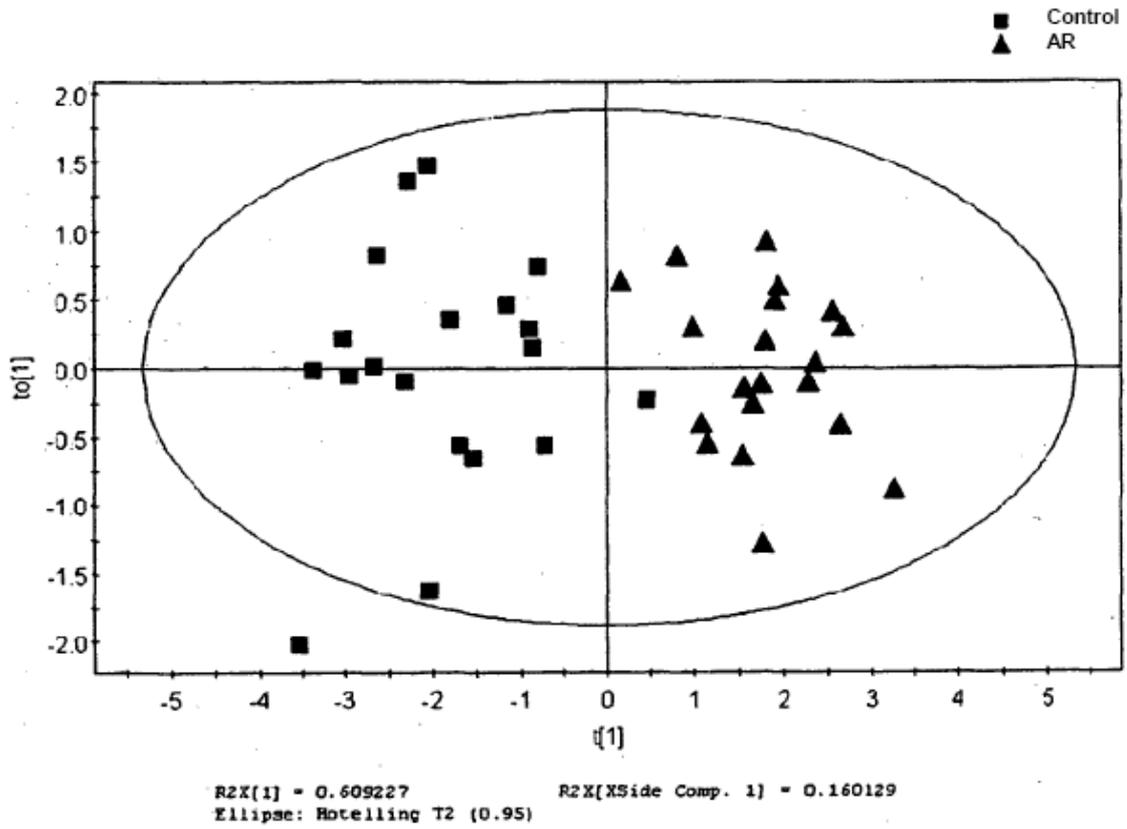


Figura 12B

AR humana, 7 metabolitos

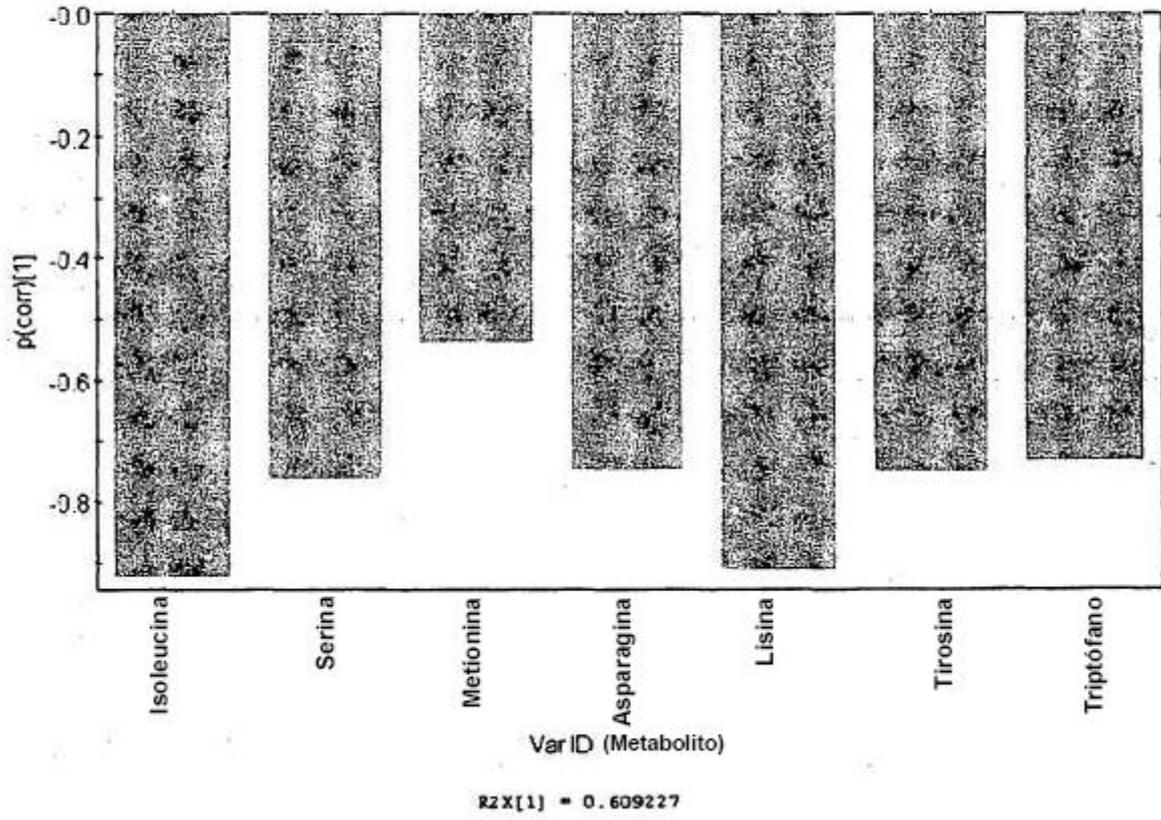
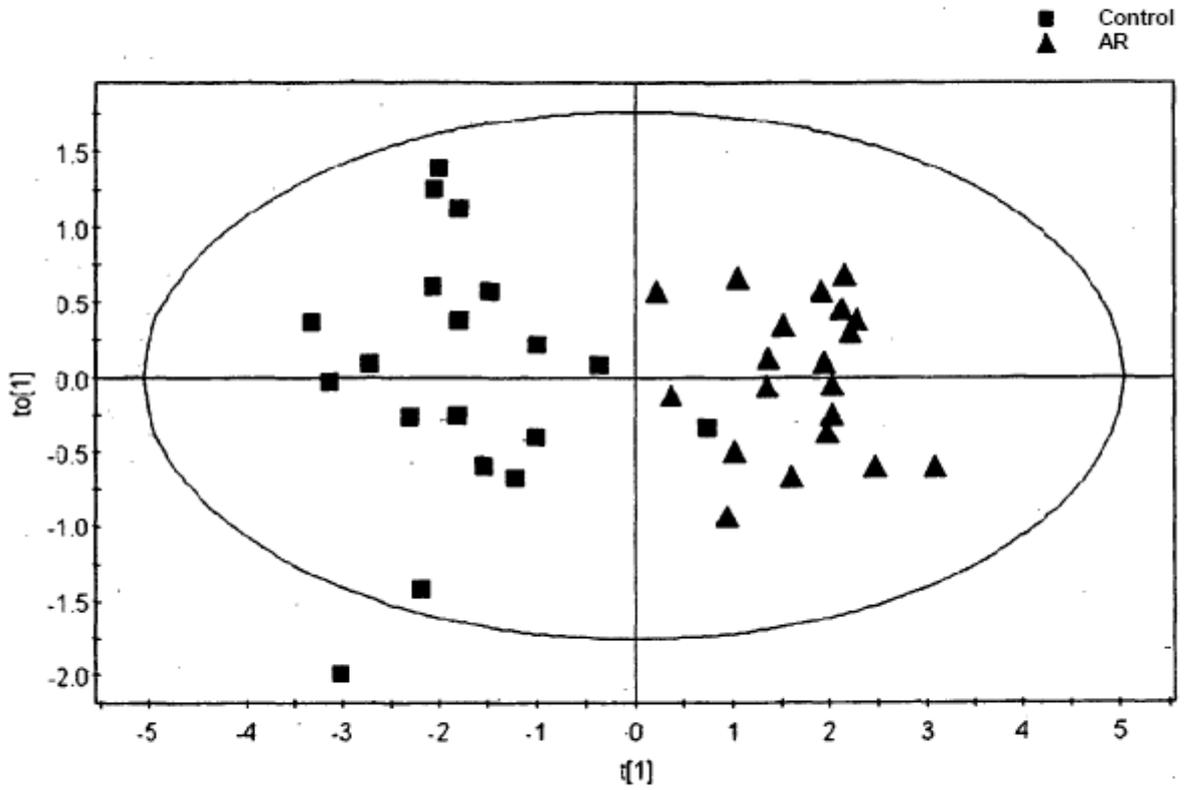


Figura 13A

AR humana, 6 metabolitos



R2X[1] = 0.636537
Ellipse: Hotelling T2 (0.95)

R2X[XSide Comp. 1] = 0.181522

Figura 13B
AR humana, 6 metabolitos

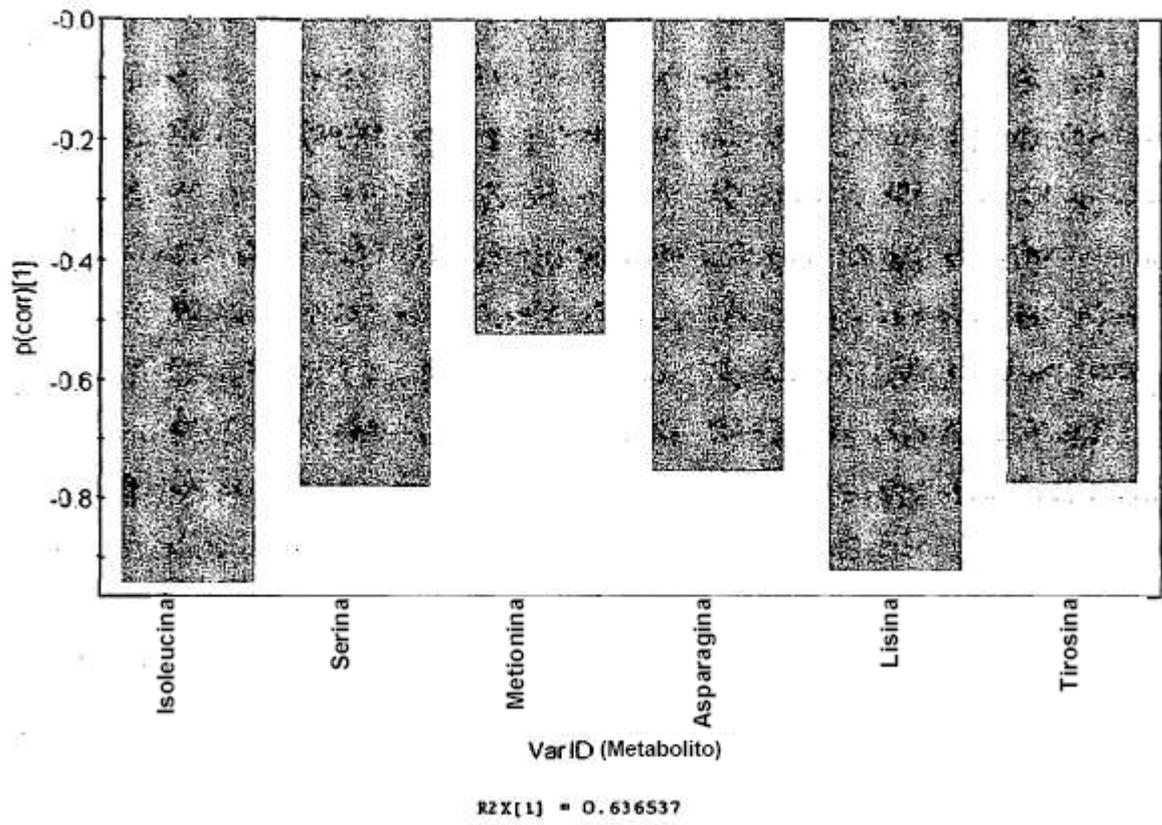


Figura 14A

AR humana, 5 metabolitos

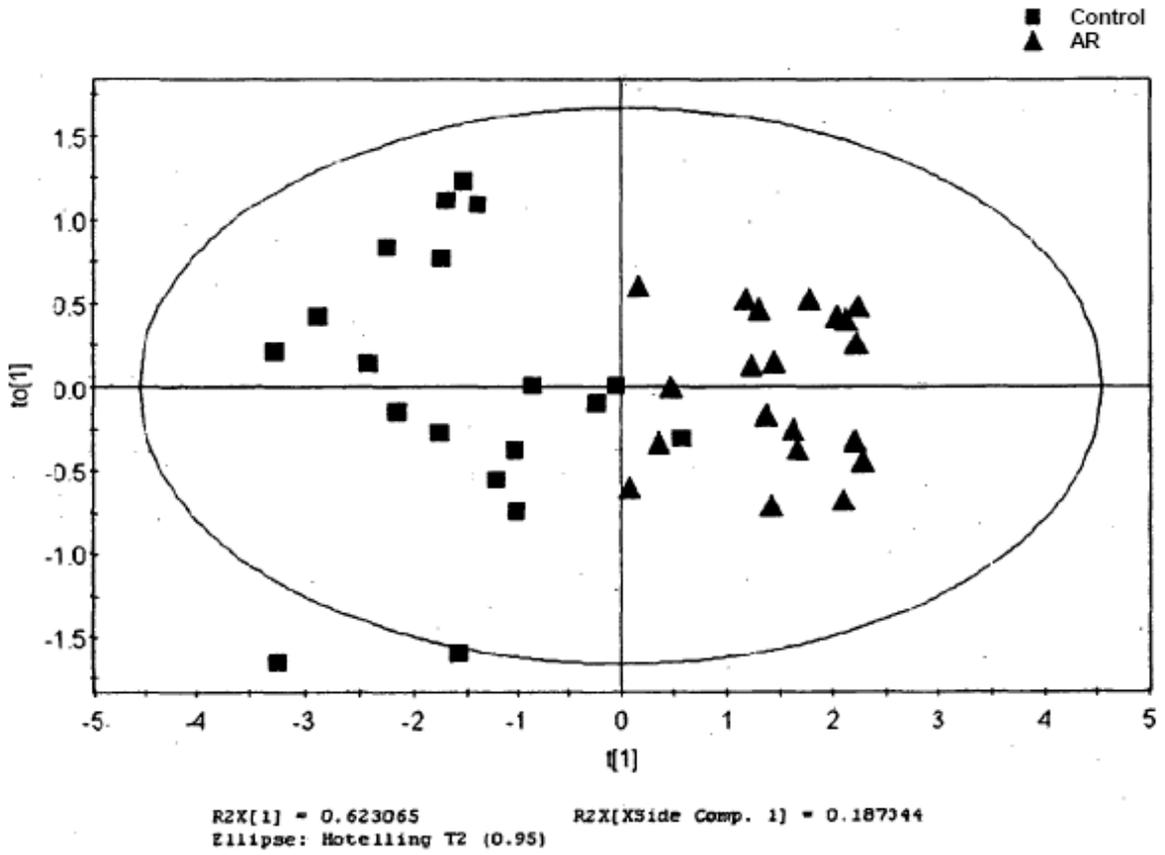


Figura 14B

AR humana, 5 metabolitos

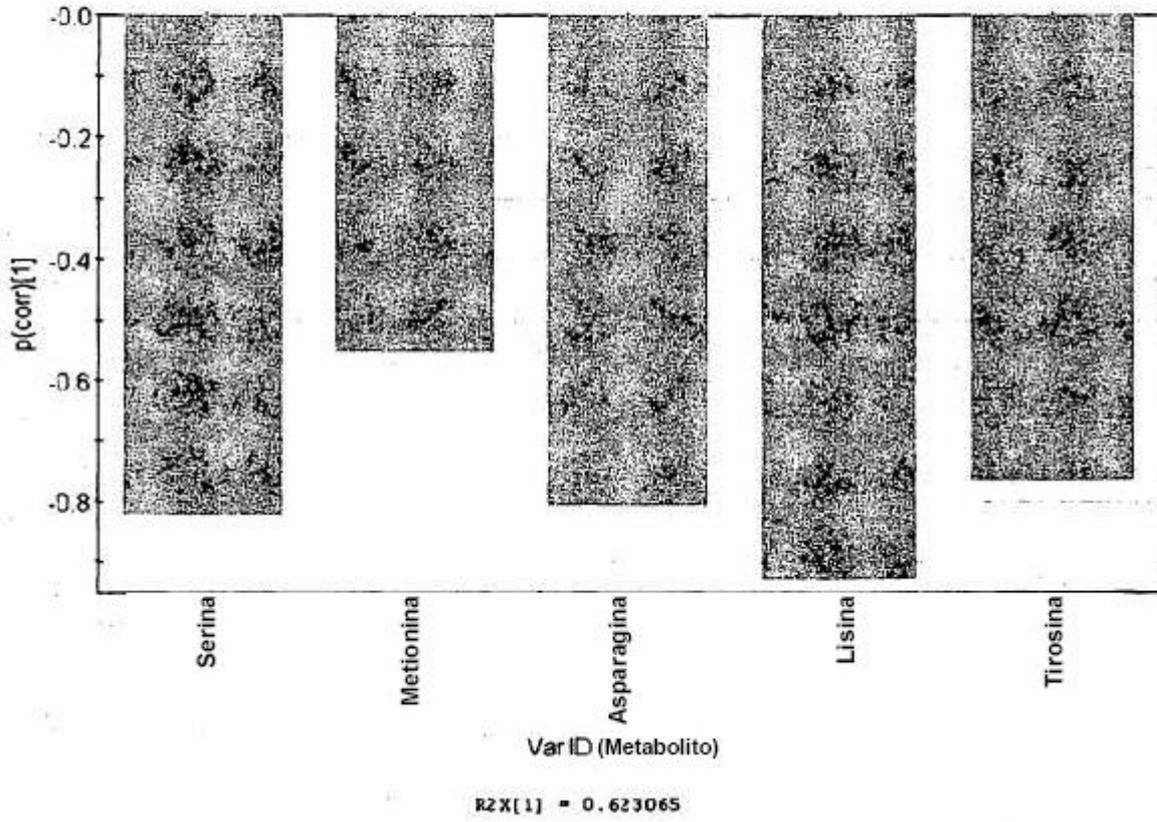


Figura 15A

AR humana, 4 metabolitos

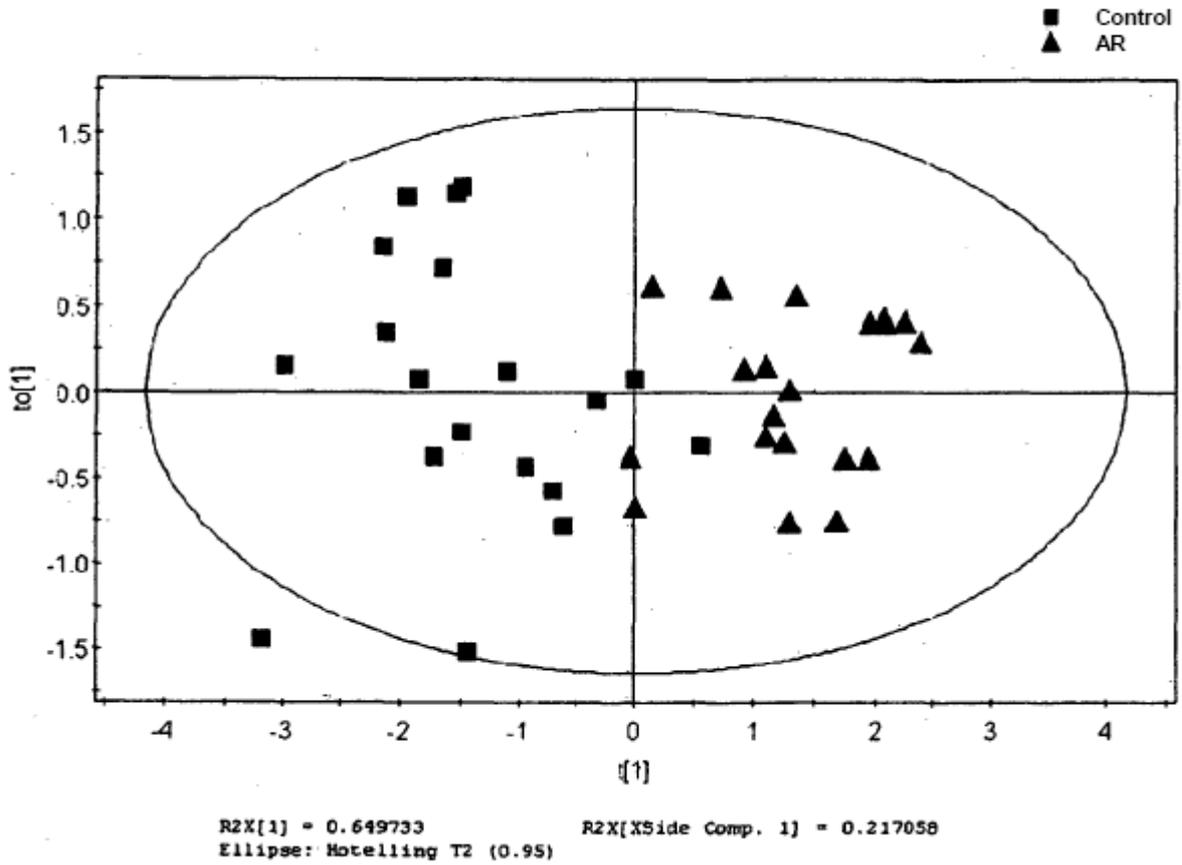


Figura 15B

AR humana, 4 metabolitos

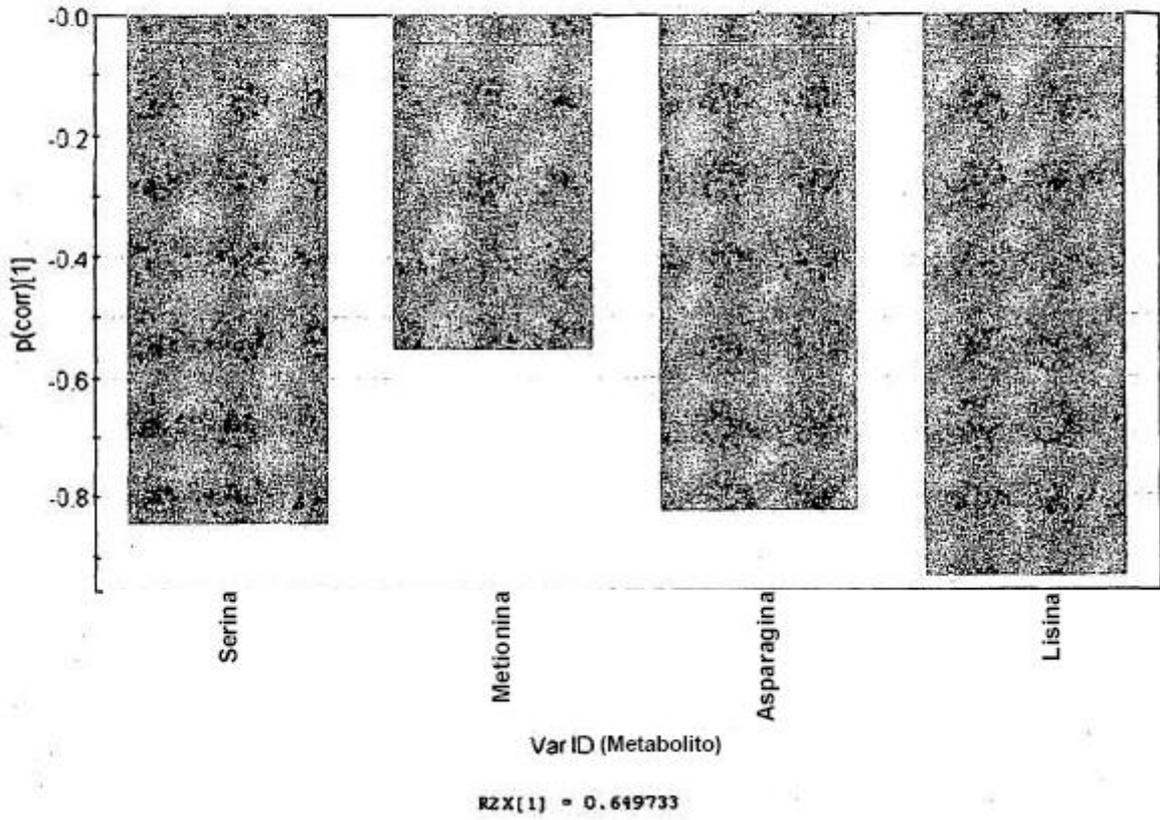


Figura 16A

AR humana, 3 metabolitos

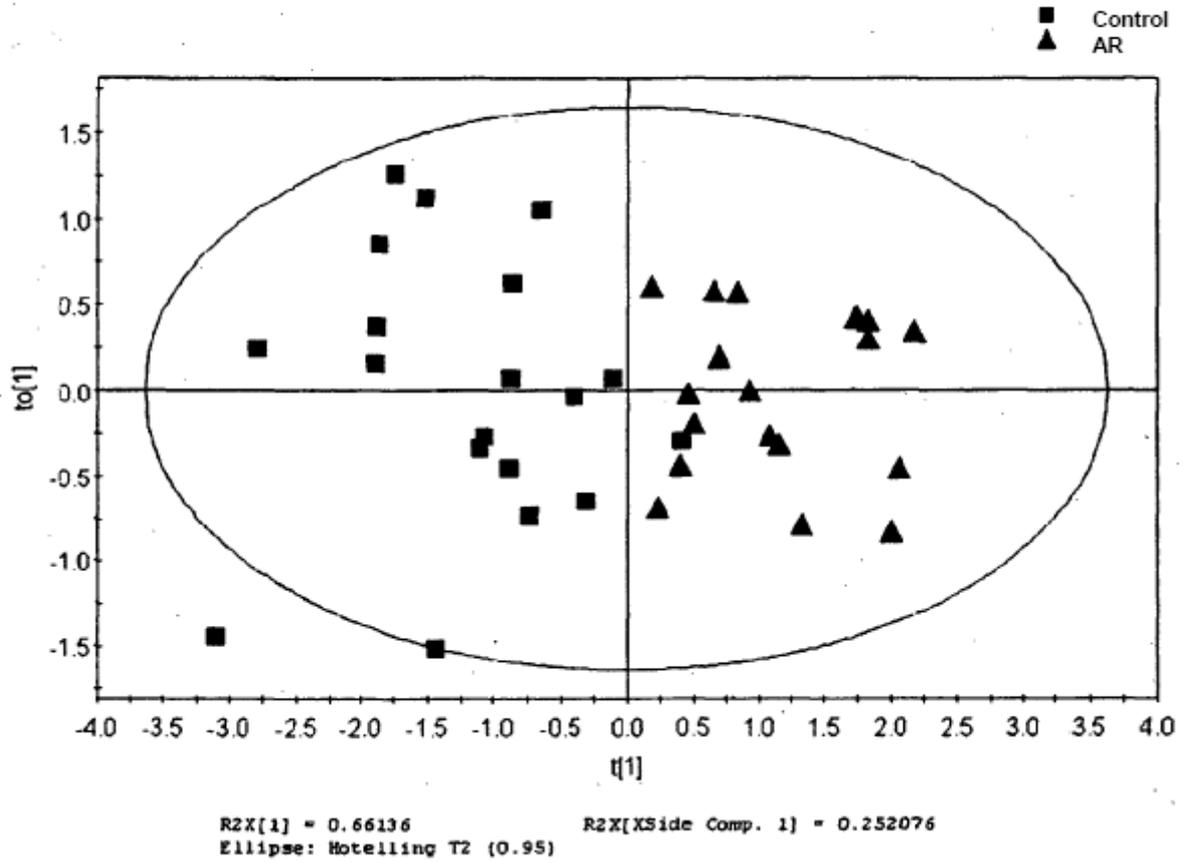


Figura 16B

AR humana, 3 metabolitos

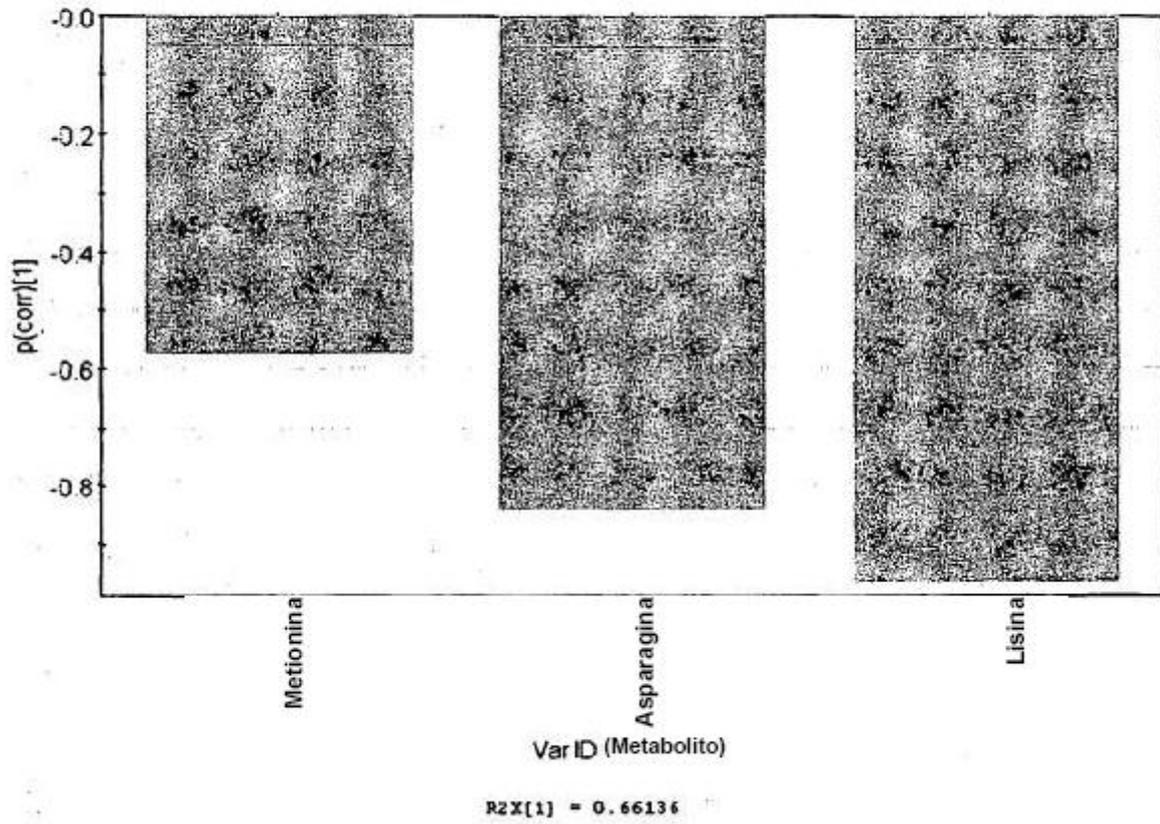


Figura 17A
AR humana, 2 metabolitos

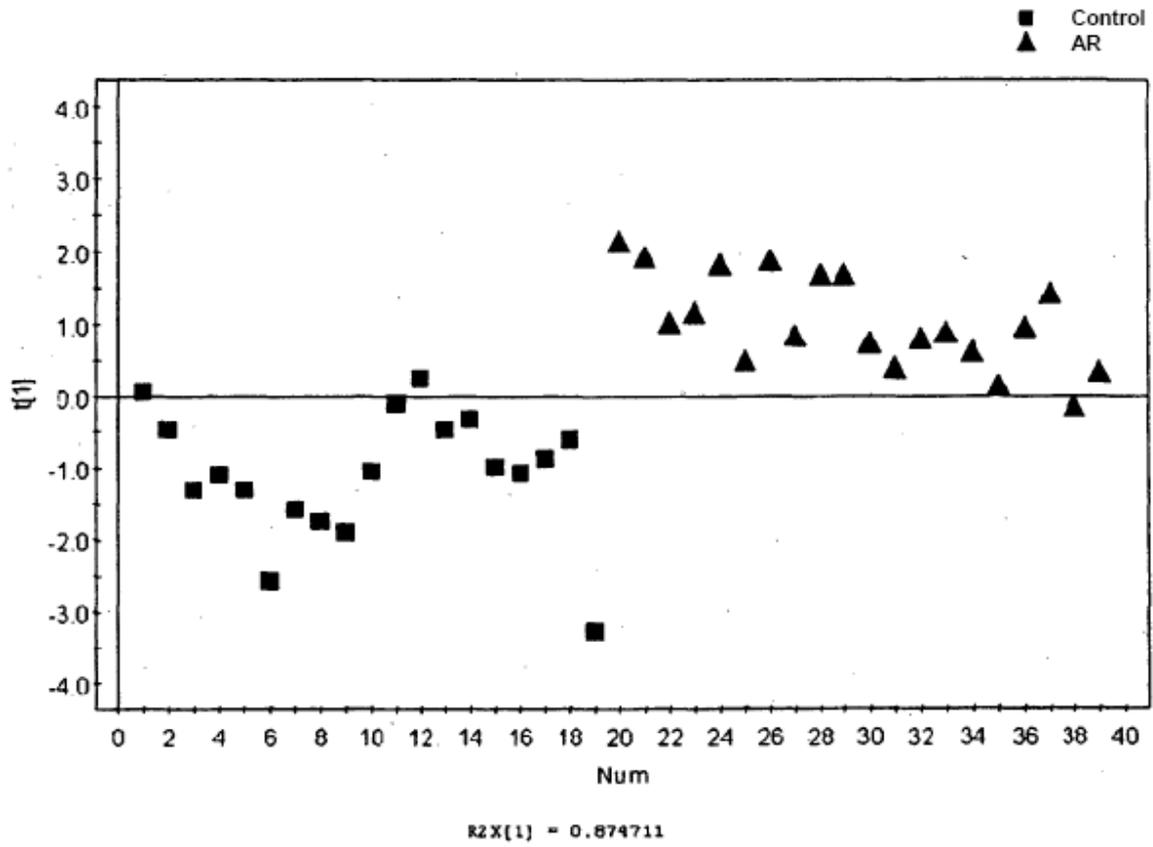


Figura 17B

AR humana, 2 metabolitos

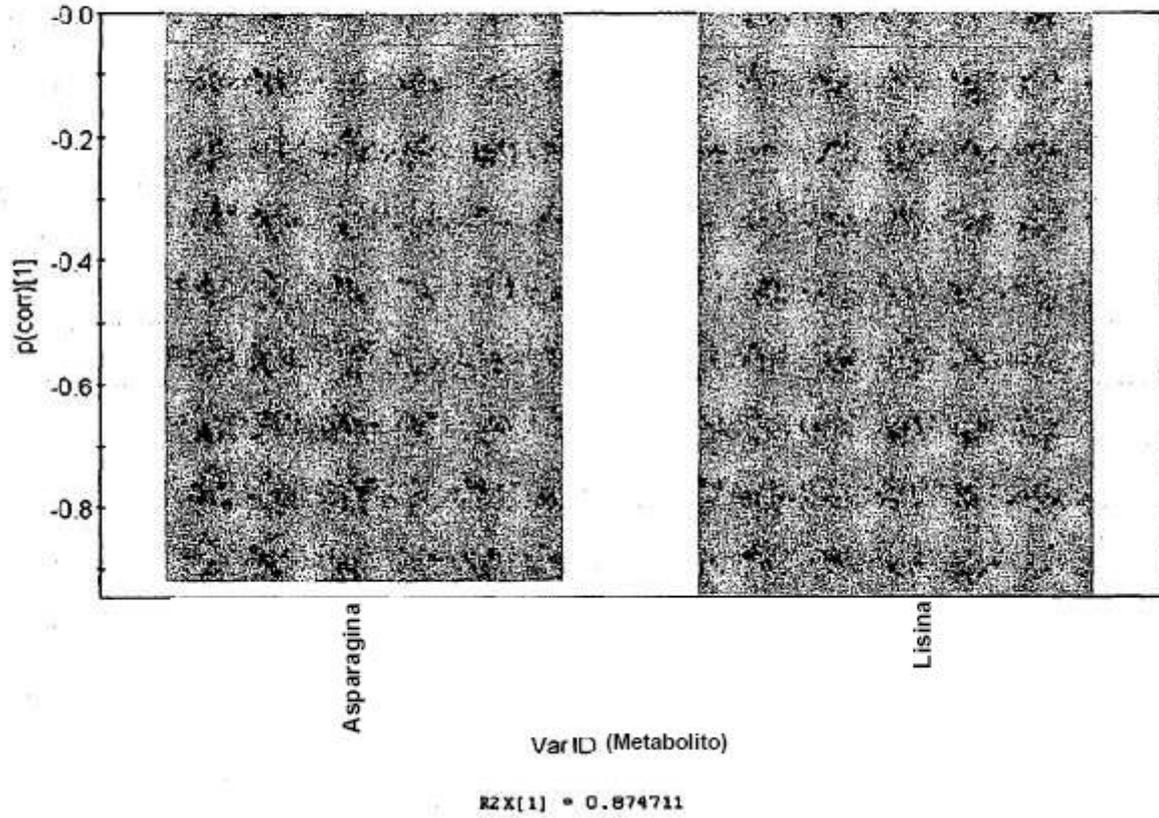


Figura 18**Tabla 5**

Metabolito	Pesos
Alanina (Ala)	0,0893
Arginina (Arg)	0,0198
Asparagina (Asn)	0,2934
Aspartato (Asp)	0,1584
Citrulina (Cit)	0,1979
Cisteína (Cys)	0,1867
Glutamato (Glu)	0,1569
Glutamina (Glu)	0,0190
Glicina (Gly)	0,1151
Isoleucina (Ile)	0,2142
Leucina (Leu)	0,2142
Lisina (Lys)	0,1969
Metionina (Met)	0,1785
Ornitina (Orn)	0,1979
Fenilalanina (Phe)	0,2669
Prolina (Pro)	0,0893
Piroglutamato	0,1468
Serina (Ser)	0,2975
Treonina (Thr)	0,1454
Triptófano (Trp)	0,1976
Tirosina (Thy)	0,1963
Valina (Val)	0,1522