

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 266**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2007 E 07810654 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2057472**

54 Título: **Método de detección y/o de medición de hepcidina en una muestra**

30 Prioridad:

21.07.2006 US 832625 P

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

06.03.2014

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE M/S 28-2-C
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**LI, HONGYAN;
BREAU, ALAN y
SASU, BARBRA**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 446 266 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

Método de detección y/o de medición de hepcidina en una muestra

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/832.625 presentada el 21 de julio de 2006.

Campo de la invención

- 10 Los métodos desvelados en el presente documento se refieren al aislamiento de hepcidina, detección de hepcidina y a mediciones de niveles de hepcidina en muestras biológicas. En particular, los métodos desvelados en el presente documento permiten el eficaz aislamiento de hepcidina de una muestra y la medición cuantitativa de niveles de hepcidina en la muestra.

15 Antecedentes de la invención

- El hierro es un oligoelemento esencial requerido para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivos. Por ejemplo, el hierro es indispensable para la síntesis de ADN y en una amplia variedad de procesos metabólicos. Las alteraciones del metabolismo del hierro participan en varias enfermedades de mamífero significativas que incluyen, pero no se limitan a, anemia por deficiencia de hierro, hemosiderosis, y la enfermedad de sobrecarga de hierro hemocromatosis (Andrews, Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 1:75 (2000); Philpott, Hepatology 35:993 (2002); Beutler y col., Drug-Metab. Dispos. 29:495 (2001)).

- 20 El contenido de hierro en mamíferos se regula controlando la absorción, predominantemente en el duodeno y el yeyuno superior, que es el único mecanismo por el que las reservas de hierro son fisiológicamente controladas (Philpott, Hepatology 35:993 (2002)). Tras la absorción, el hierro se une a transferrina circulante y se libera a los tejidos en todo el cuerpo. El hígado es el principal sitio de almacenamiento de hierro.

- 30 Existe un mecanismo de retroalimentación que potencia la absorción de hierro en individuos que son deficientes en hierro, y que reduce la absorción de hierro en individuos con sobrecarga de hierro (Andrews Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 1:75 (2000); Philpott, Hepatology 35:993(2002); Beutler y col., Drug-Metab. Dispos. 29:495(2001)). El mecanismo molecular por el que el intestino responde a alteraciones en los requisitos de hierro corporal solo se ha aclarado recientemente. En este contexto, se ha mostrado que la hepcidina, un polipéptido de mamífero recientemente identificado (Krause y col., FEBS Lett. 480:147 (2000); Park y col., J. Biol. Chem. 276:7806 (2001)) es un componente de señalización clave que regula la homeostasis del hierro (Philpott, Hepatology 35:993 (2002); Nicolas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4396 (2002)). La hepcidina se aisló como un polipéptido de 25 aminoácido (aa) en plasma y orina humanos, presentando actividad antimicrobiana (Krause y col., FEBS Lett. 480:147 (2000); Park y col., J. Biol. Chem. 276:7806 (2001)). Un ADNc de hepcidina que codifica un precursor de 83 aa en ratones y un precursor de 84 aa en rata y ser humano, que incluye un péptido señal de 24 aa putativo, se identificó posteriormente buscando genes específicos para hígado que se regularon por hierro (Pigeon y col., J. Biol. Chem. 276:7811 (2001)).

- 45 La asociación de hepcidina con respuesta inmunitaria innata se deriva de la observación de una robusta regulación por incremento de la expresión génica de hepcidina después de estímulos inflamatorios, tales como infecciones, que inducen la respuesta de fase aguda de los sistemas inmunitarios innatos de vertebrados. En ratones se mostró que la expresión génica de hepcidina se regulaba por incremento por lipopolisacárido (LPS), turpentina, adyuvante completo de Freund e infecciones adenovirales.

- 50 Los estudios realizados con hepatocitos primarios humanos indicaron que la expresión génica de hepcidina respondió a la adición de interleucina-6 (IL-6), pero no a interleucina-1 α (IL-1 α) o factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). De acuerdo con esta observación, la infusión de voluntarios humanos con IL-6 provocó el rápido aumento de niveles del péptido hepcidina bioactivo en suero y orina, y se igualó por una disminución en la saturación de hierro y transferrina en suero. También se encontró una fuerte correlación entre expresión de hepcidina y anemia de inflamación en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, que incluyen infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Estos hallazgos, en asociación con datos murinos similares, condujeron a la conclusión de que la inducción de hepcidina durante la inflamación depende de IL-6, y que el eje de hepcidina-IL-6 es responsable de la respuesta hipoferrémica y posterior restricción de hierro de patógenos transmitidos por la sangre.

- 60 La función principal de la hepcidina y sus funciones claves en la regulación del hierro y en la respuesta inmunitaria innata para infección ilustra la necesidad de métodos y herramientas de diagnóstico informativas para la medición de formas bioactivas maduras de hepcidina en muestras biológicas y para la regulación de la producción de hepcidina.

- 65 Purificando parcialmente la hepcidina de muestras de orina se demostró que la secreción de hepcidina en orina se eleva entre 10 y 100 veces con respecto a niveles normales en condiciones de inflamación (Park y col., J. Biol. Chem. 276(11):7806 (2001)). En estudios de ratón, el único método de detección de la regulación por incremento de hepcidina se basó en el análisis de ARN, que puede no correlacionarse con niveles de hepcidina circulante. Hasta la fecha no está disponible ningún método para medir con exactitud los niveles de hepcidina en suero o plasma. El método urinario

descrito anteriormente no aclara los niveles de hepcidina circulante absolutos. Otros ensayos desarrollados para medir niveles en suero son o bien semicuantitativos (Tomosugi y col., Blood, previo a la publicación de abril de 2006) o solo pueden detectar pro-hepcidina, una especie que no se correlaciona con la inducción de hepcidina (Kemna y col., Blood 106:1864-1866 (2005)). Un ensayo que permite la precisa cuantificación de niveles de hepcidina es crítico para identificar
5 pacientes que pueden beneficiarse de una estrategia de bloqueo de hepcidina para tratar la anemia de inflamación u otros trastornos relacionados.

Sumario de la invención

10 En el presente documento se desvelan métodos de aislamiento y/o determinación de la concentración de hepcidina en una muestra. En particular, se desvelan un método para cuantificar hepcidina en una muestra biológica usando espectrometría de masas y un método de purificación y/o separación de hepcidina de una muestra biológica.

15 Por tanto, un aspecto de la invención es proporcionar un método de determinación de una concentración de hepcidina en una muestra que comprende (1) separar la hepcidina de la muestra antes de someter la hepcidina a espectrometría de masas usando extracción en fase sólida; (2) someter la hepcidina y un patrón interno a espectrometría de masas en tándem para producir un espectro de masas que tiene una señal de hepcidina y una señal del patrón interno; (3) medir una intensidad de la señal de hepcidina y la señal del patrón interno; y (4) correlacionar la intensidad de la señal de hepcidina y la intensidad de la señal del patrón interno a una curva patrón de concentraciones de hepcidina para
20 determinar la concentración de la hepcidina en la muestra, en el que el patrón interno comprende SEC ID N° 4 isotópicamente marcada. En algunos ejemplos la hepcidina es una forma de prepropéptido de hepcidina que tiene aproximadamente 84 residuos de aminoácidos. En otros ejemplos, la hepcidina es una forma de propéptido de hepcidina que tiene aproximadamente 61 residuos de aminoácidos. En todavía otros ejemplos, la hepcidina es una forma procesada de hepcidina que tiene aproximadamente 20 a aproximadamente 25 residuos de aminoácidos. En algunas
25 realizaciones, la hepcidina es un péptido que tiene una secuencia de SEC ID N°: 3; SEC ID N°: 4; SEC ID N°: 13; SEC ID N°: 14; SEC ID N°: 15, o una combinación de las mismas. La hepcidina se ioniza durante el análisis de EM, y la carga resultante de hepcidina puede ser +1, +2, +3, +4, o una mezcla de las mismas. El análisis de EM puede ser mediante cromatografía de líquidos-EM y/o EM en tándem. En algunas realizaciones, la hepcidina se separa adicionalmente de la muestra antes del análisis de EM. La separación puede producirse mediante cromatografía, tal como cromatografía de
30 líquidos, y extracción en fase sólida.

En el presente documento se enseña un método de determinación de la presencia o concentración de hepcidina en una muestra que comprende separar la hepcidina de una muestra; someter la hepcidina a EM para producir un espectro de
35 masas que tiene una señal correspondiente a la hepcidina; medir la intensidad de la señal de hepcidina; y correlacionar la señal intensidad en el espectro de masas con una curva patrón de concentraciones de hepcidina para obtener una cantidad de hepcidina en la muestra. En algunos ejemplos, la separación de hepcidina de la muestra es mediante cromatografía, tal como cromatografía de líquidos, extracción en fase sólida, o una combinación de las mismas. En algunos ejemplos, la hepcidina es una forma de prepropéptido de hepcidina que tiene aproximadamente 84 residuos de aminoácidos. En otros ejemplos, la hepcidina es una forma de propéptido de hepcidina que tiene aproximadamente 61
40 residuos de aminoácidos. En todavía otros ejemplos, la hepcidina es una forma procesada de hepcidina que tiene aproximadamente 20 a aproximadamente 25 residuos de aminoácidos. La hepcidina se ioniza durante el análisis de EM, y la carga resultante de hepcidina puede ser +1, +2, +3, +4, o una mezcla de las mismas.

En el presente documento también se enseña un método de separación de hepcidina de una muestra, que comprende
45 introducir la muestra a una columna de fase inversa y tratar la columna de fase inversa con un disolvente eluyente, en el que el eluyente resultante comprende hepcidina. En algunos ejemplos, el disolvente eluyente comprende metanol, agua, o una mezcla de los mismos. En ciertos ejemplos, la columna de fase inversa comprende una columna de fase inversa C18, C8 o C3 o columna de fase inversa C18, C8 o C3 modificada polar. Tales columnas están disponibles de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen Waters, Agilent, y similares.

50 En cualquiera de los aspectos de la invención desvelados en el presente documento, la muestra puede ser de un mamífero, y en realizaciones específicas, el mamífero es humano. En ciertos ejemplos, el humano está sano, mientras que en otras realizaciones el humano presenta homeostasis del hierro perturbada. En ejemplos específicos, la homeostasis del hierro está por debajo de la normal, mientras que en otras realizaciones la homeostasis del hierro está por encima de la normal. En un ejemplo específico, los índices de hierro o criterios hematológicos del sujeto están fuera de los intervalos normales que se indican en la Tabla I, más adelante. En diversos ejemplos, un paciente humano sufre anemia y es hiposensible a terapia de eritropoyetina o una terapia eritropoyética. En un ejemplo específico, la terapia eritropoyética comprende un análogo de eritropoyetina tal como darbepoetina alfa.

60 En cualquiera de los aspectos de la invención desvelados en el presente documento, el ser humano puede sufrir o se sospecha que padece una afección inflamatoria o relacionada con inflamación. Tales afecciones incluyen septicemia, anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inflamatoria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad renal terminal, anemia por deficiencia de hierro, enfermedad de la ferroportina, hemocromatosis, diabetes, artritis reumatoide, arteriosclerosis, tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico y artropatía. En otras realizaciones, el ser humano puede sufrir o se sospecha que padece una afección no inflamatoria. Tales afecciones no inflamatorias incluyen
65 deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de folato, pelagra, mielosis funicular,

pseudoencefalitis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardíaca coronaria y enfermedad arterial oclusiva periférica. En otras realizaciones más, el ser humano puede sufrir o se sospecha que padece una reacción de fase aguda. Tales reacciones de fase aguda incluyen septicemia, pancreatitis, hepatitis y enfermedades reumatoideas.

5 También se enseñan métodos para mejorar el tratamiento de un paciente humano que padece anemia midiendo concentraciones de hepcidina usando los métodos desvelados en el presente documento. En diversas realizaciones, la concentración de hepcidina es aproximadamente 10 ng/ml o menos, aproximadamente 5 ng/ml o menos, aproximadamente 2 ng/ml o menos, o aproximadamente 1 ng/ml o menos. En otros ejemplos, la concentración de hepcidina es aproximadamente 25 ng/ml o superior, o 30 ng/ml o superior. En ciertos ejemplos, la terapia para anemia del paciente se modifica y/o se vuelve a examinar basándose en la monitorización de su concentración de hepcidina.

15 En el presente documento se enseña un kit que comprende dos o más artículos útiles para poner en práctica un método de la invención, envasados juntos. Por ejemplo, en una variación, el kit comprende una pluralidad de recipientes de hepcidina, teniendo cada recipiente una cantidad conocida y diferente de hepcidina, un recipiente de patrón e instrucciones para preparar una curva patrón de concentraciones de hepcidina con respecto a patrón y para ensayar una muestra de prueba para concentración de hepcidina. En ciertos casos, el patrón comprende una hepcidina isotópicamente marcada, mientras que, en otros casos, el patrón es un péptido que tiene retención similar a la hepcidina y una masa de aproximadamente ± 750 Da de la de la hepcidina. En algunas realizaciones, la hepcidina comprende SEC ID N°: 4. En una realización específica, la hepcidina comprende SEC ID N°: 4 y el patrón comprende SEC ID N°: 4 isotópicamente marcada.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1A muestra un árbol de decisión de índices de hierro y estados de enfermedad para la evaluación de un paciente, ausente una medida de niveles de hepcidina;

la figura 1B muestra un árbol de decisión para la evaluación de un paciente usando medición de niveles de hepcidina;

30 la figura 2 muestra que la formación de iones de hepcidina en un espectro de masas tiene predominantemente el estado de carga +4 (m/z 698,5) y +3 (m/z 930,8);

la figura 3 muestra el espectro de hepcidina de EM/EM del estado de carga +3;

35 la figura 4 muestra el espectro de hepcidina de EM/EM del estado de carga +4;

la figura 5 muestra la optimización de pH para la extracción en fase sólida (EFS) de hepcidina;

40 la figura 6 muestra cromatogramas de EM de hepcidina humana (estados de carga +3 y +4) extraída de suero humano de blanco;

la figura 7 muestra cromatogramas de EM de hepcidina humana (estados de carga +3 y +4) y patrón interno extraído de un paciente con septicemia;

45 la figura 8 muestra una curva patrón de concentración frente a área del analito : área de patrón interno creada a partir de cantidades de hepcidina conocidas;

la figura 9 muestra la estabilidad de la hepcidina con el tiempo bajo condiciones de incubación;

50 la figura 10 muestra un cromatograma de CL pico base de una disolución de incubación a tiempo 0;

la figura 11 muestra el cromatograma de EM correspondiente de hepcidina a tiempo de incubación 0;

la figura 12 muestra el cromatograma pico base de una disolución después de 4 horas de incubación;

55 la figura 13 muestra el cromatograma de EM correspondiente de hepcidina a tiempo de incubación 4 horas;

60 la figura 14A muestra la comparación de niveles de hepcidina en suero en 20 donantes voluntarios en comparación con 40 pacientes con una variedad de cánceres y una hemoglobina inferior a 10 g/dl, correlacionando dos lecturas elevadas en los donantes de control con T_{sat} alta o infección; y

65 la figura 14B muestra la sub-clasificación de la anemia de pacientes con cáncer con el fin de identificar aquellos con inflamación probable (AI), anemia por deficiencia de hierro (ADH) o una mezcla de las dos (anemia mixta). Cualquier paciente que no se clasifique en ninguna de estas clases se designó 'Otro'. Los índices usados para clasificar pacientes fueron CRP, relación de sTfR/log ferritina, T_{sat} y ferritina (como se observa en la figura 1B). Las líneas representan el valor medio.

La figura 15 muestra un cromatograma de EM de hepcidina humana truncada Hepc-20 (SEC ID N°: 15), que muestra Hepc-20 en tanto un estado de carga +3 como +4.

5 La figura 16 muestra un cromatograma de EM de hepcidina humana truncada Hepc-22 (SEC ID N°: 16), que muestra Hepc-22 en tanto un estado de carga +3 como +4.

La figura 17 muestra un cromatograma de EM de hepcidina humana Hepc-25 (SEC ID N°: 4), que muestra Hepc-25 en tanto un estado de carga +3 como +4.

10 La figura 18 muestra curvas de calibración para la concentración (ng/ml) de Hepc-25, Hepc-22 y Hepc-20 por intensidad de señal de EM.

Descripción detallada

15 La hepcidina, llamada debido a su sitio de producción, es un péptido importante ligado al metabolismo del hierro. Los trastornos en el metabolismo del hierro pueden evaluarse midiendo niveles de hepcidina, luego comparando los niveles medidos de hepcidina con niveles normales. Tales comparaciones pueden facilitar el diagnóstico, pueden evaluar las pautas de tratamiento, o pueden monitorizar el progreso de un paciente con el tiempo.

20 Los métodos desvelados proporcionan un medio de aislamiento de hepcidina de y/o análisis de hepcidina en una muestra biológica. Antes de esta divulgación, ni la espectrometría de masas ni el aislamiento de hepcidina de una muestra fueron suficientemente eficientes o exactos para correlacionarse con una cuantificación absoluta de hepcidina en la muestra. La EM y/o técnicas de separación ineficaces, o EM y/o técnicas de separación no conformes, dificultan la capacidad para comparar conjuntos discretos de datos. Con el descubrimiento de la EM y técnicas de separación eficaces pueden compararse diversos conjuntos de datos, tanto del mismo paciente con el tiempo como de diferentes pacientes en diferentes momentos.

30 La hepcidina, debido en parte a su secuencia de aminoácidos, no se fragmenta fácilmente para el análisis de EM. En el presente documento se desvelan técnicas para la idónea ionización y fragmentación de la hepcidina, que produce espectros de EM adecuados para la cuantificación de hepcidina usando comparaciones de patrón interno y de curva patrón. Informes previos de análisis de EM de hepcidina utilizaron técnicas de EM que no permitieron eficazmente la cuantificación de hepcidina en una muestra (véase, por ejemplo, Kemna y col., Blood, 106:3268 (2005)). Los métodos desvelados en el presente documento también pueden aplicarse a la medición de defensinas (Kluver y col., J. Peptide. Res. 59:241 (2002)).

40 Como se usa en el presente documento, los términos “cuantitativo” o “cuantificación” se refieren a proporcionar una medición absoluta de hepcidina en una muestra que puede compararse con mediciones tomadas en un momento diferente o de una fuente diferente. Las mediciones cuantitativas son valiosas para muchos fines, además de las mediciones relativas que solo pueden compararse con otras mediciones tomadas en el mismo momento de forma que puedan proporcionar información tal como una relación. Como se describe más adelante en mayor detalle, el uso de una cantidad medida de un patrón interno permite el cálculo cuantitativo de la hepcidina en una muestra.

45 Como se usa en el presente documento, “muestra” significa cualquier muestra biológica adecuada para análisis de hepcidina mediante los métodos desvelados en el presente documento. La fuente de tales muestras puede ser suero, sangre, plasma, orina u otro fluido corporal, o un filtrado de un fluido corporal, de un sujeto de prueba. El sujeto de prueba es un animal, preferentemente mamífero, y más preferentemente un ser humano.

50 Como se usa en el presente documento, un “marcador de hierro” es un metabolito, proteína u otra biomolécula que participa en los niveles o metabolismo del hierro. Una alteración del metabolismo del hierro significa una deficiencia o desviación de los valores normales de uno o más marcadores de hierro, tales como aquellos enumerados en la Tabla I, u otros parámetros clínicos del hierro, tales como aquellos enumerados en la figura 1A o la figura 1B. Las proteínas, además de los parámetros clínicos del hierro, que pueden controlar los niveles de hierro, incluyen ferroportina, hemojuvelina soluble, proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y miembros de familia relacionados. Midiendo niveles de hepcidina en una muestra biológica de un paciente puede extrapolarse información referente al metabolismo del hierro del paciente. Además, pueden generarse datos referentes a tendencias en los niveles de hepcidina con respecto a diversos trastornos o afecciones del metabolismo del hierro.

60 Las afecciones inflamatorias que participan en una alteración de metabolismo del hierro incluyen, pero no se limitan a, septicemia, anemia de inflamación (Weiss y col., N. Engl. J. Med. 352:1011 (2005)), anemia de cáncer, artritis inducida por colágeno (AIC), insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), enfermedad renal terminal (ERT) (Kulaksiz y col., Gut, 53:735 (2004)), deficiencia de hierro, hemocromatosis (Ganz, Blood, 102(3):783 (2003)), diabetes, artritis reumatoide (Jordan, Curr. Opin. Rheumatology, 16:62 (2004)), arteriosclerosis, tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico y enfermedad o insuficiencia renal. Afecciones no inflamatorias que participan en una alteración de metabolismo del hierro incluyen, pero no se limitan a, deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de folato, pelagra, mielosis funicular, pseudoencefalitis, enfermedad de Parkinson (Fasano y col., J. Neurochem. 96:909 (2006)) y Kaur y

col., Ageing Res. Red., 3:327 (2004)), enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardíaca coronaria, osteopenia y osteoporosis (Guggenbuhl y col., Osteoporos. Int. 16:1809 (2005)), hemoglobinopatías y otros trastornos del metabolismo de los eritrocitos (Papanikolaou y col., Blood 105:4103 (2005)), y enfermedad arterial oclusiva periférica. Las afecciones de reacción de fase aguda que participan en una alteración del metabolismo del hierro incluyen, pero no se limitan a, pancreatitis, hepatitis (Brock, Curr. Opin. Clin. Nutrition. Metab. Care, 2:507 (1999)) y enfermedades reumatoideas.

Los valores de referencia para la hepcidina medida están, por ejemplo, en el intervalo de 0 a aproximadamente 2000 ng/ml, en particular aproximadamente 100 a aproximadamente 500 ng/ml. Un intervalo de referencia particularmente preferido es de aproximadamente 200 a aproximadamente 260 ng/ml. Cualquier valor dentro del intervalo de referencia puede usarse como valor umbral para la medición, por ejemplo, de un valor en el intervalo de 0 a aproximadamente 1000 ng/ml. Una medida por debajo de aproximadamente 10 ng/ml puede indicar supresión de hepcidina, mientras que el intervalo "normal" de niveles de hepcidina es inferior a aproximadamente 25 ng/ml. Diversos otros índices de hierro y sus intervalos normales de concentraciones se enumeran en la Tabla I.

Tabla I

Índice de hierro	Nivel normal (intervalo)
Hierro en suero	50-170 µg/dl
Hemoglobina	11,5-18 g/dl
Hematocrito	37-54 %
Volumen corpuscular medio (VCM)	80-96 fl
Amplitud de la distribución eritrocitaria (ADE)	11,5-14,5 % (método de impedancia eléctrica) o 10,2-11,8 % (método de luz láser)
Capacidad total de fijación del hierro (CTFH)	250-450 µg/dl
Porcentaje de saturación de hierro por transferrina (Tsat)	15-50 %
Ferritina	12-120 µg/l
Folato	3-16 ng/ml (suero) y 130-628 ng/ml (eritrocito)
Vitamina B12	200-900 pg/ml

Un nivel del índice de hierro fuera de los intervalos normales enumerados en la Tabla I es un desencadenante para medir el nivel de hepcidina de ese paciente. Debido a que la hepcidina es un componente clave del metabolismo del hierro, los niveles de hepcidina se correlacionan con una alteración del metabolismo del hierro y/o índices de hierro. Elevados niveles de hepcidina se correlacionan con niveles de hierro en suero por debajo de los intervalos normales indicados en la Tabla I, hemoglobina baja y hematocrito, Tsat reducido o normal y valores de ferritina altos o normales, y elevado estado inflamatorio como se mide por la elevación de proteína C reactiva (CRP).

La detección de la alteración del metabolismo del hierro incluye ensayo, obtención de imágenes o establecimiento de otro modo de la presencia, ausencia o concentración de hepcidina o un precursor de hepcidina. El término "detección" engloba aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y monitorización para hepcidina.

El término "hepcidina", como se usa en el presente documento, incluye prepro péptidos de secuencias de 83 u 84 aa en ratón (SEC ID N°: 1); rata (SEC ID N°: 2); y ser humano (SEC ID N°: 3); las secuencias de hepcidina de 25 aa de hepcidina humana (SEC ID N°: 4); hepcidina de cino (SEC ID N°: 5); hepcidina de mono de Vervet (SEC ID N°: 6); hepcidina de conejo (SEC ID N°: 7); hepcidina de rata (SEC ID N°: 8); hepcidina de ratón (SEC ID N°: 9); o hepcidina canina (SEC ID N°: 10), (SEC ID N°: 11) o (SEC ID N°: 12). Los péptidos de hepcidina también incluyen un propéptido humano de 60 aminoácidos (SEC ID N°: 13) y (SEC ID N°: 14), además de una secuencia de 20 aminoácidos (SEC ID N°: 15) y secuencia de 22 aminoácidos (SEC ID N°: 16).

Los términos "espectrometría de masas" o "EM" como se usan en el presente documento se refieren a métodos de filtración, detección y medición de iones basándose en su relación de masa con respecto a carga, o "m/z". En general, una o más moléculas de interés se ionizan, y los iones se introducen posteriormente en un instrumento de espectrografía de masas en el que, debido a una combinación de campos magnéticos y eléctricos, los iones siguen una trayectoria en el espacio que depende de la masa ("m") y la carga ("z"). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.204.500; 6.107.623; 6.268.144; 6.124.137; 6.982.414; 6.940.065; 5.248.875; Wright y col., Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2:264 (1999); y Merchant y Weinberger, Electrophoresis 21:1164 (2000).

Por ejemplo, en un instrumento de "cuadrupolo" o "trampa de iones de cuadrupolo", los iones en un campo de radiofrecuencia (RF) oscilante experimentan una fuerza proporcional al potencial de corriente continua (CC) aplicado entre los electrodos, la amplitud de la señal de RF y m/z. El voltaje y la amplitud pueden seleccionarse de forma que solo

iones que tienen una m/z particular viajen la longitud del cuadrupolo, mientras que todos los otros iones son desviados. Así, los instrumentos de cuadrupolo pueden actuar de tanto “filtro de masas” como de “detector de masas” para los iones inyectados al instrumento.

- 5 El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo en modo de monitorización de múltiples reacciones (MRM) se usa preferentemente para la cuantificación de hepcidina. Implica dos analizadores de masas de cuadrupolo autónomo, separados por una celda de colisión del cuadrupolo. El primer cuadrupolo se usa para seleccionar iones del analito de interés (precursor), que se fragmenta en la celda de colisión por disociación inducida por colisión. Los fragmentos resultantes se analizan por el segundo cuadrupolo analítico. Debido a que los iones precursores se hacen pedazos en la
- 10 celda de colisión muy específicamente, la monitorización del único ión de los fragmentos del precursor conduce a una gran mejora de la especificidad y relación de señal con respecto a ruido. Por tanto, puede usarse para análisis cuantitativos sobre muestras complejas como suero.

15 Adicionalmente, la resolución de las técnicas de EM puede potenciarse empleando “espectrometría de masas en tándem”, o “EM/EM”. En esta técnica, un ión precursor o grupo de iones generado a partir de una molécula (o moléculas) de interés se filtran en un instrumento de EM, y estos iones precursores se fragmentan posteriormente dando uno o más iones de los fragmentos que luego se analizan en un segundo procedimiento de EM. Mediante la cuidadosa selección de iones precursores, solo iones producidos por ciertos analitos de interés pasan a la cámara de fragmentación, en la que se produce la colisión con átomos de un gas inerte para producir los iones de los fragmentos. Debido a que tanto los

20 iones precursores como de los fragmentos se producen en un modo reproducible bajo un conjunto dado de condiciones de ionización/fragmentación, la técnica de EM/EM puede proporcionar una herramienta analítica extremadamente poderosa. Por ejemplo, la combinación de filtración/fragmentación puede usarse para eliminar sustancias interferentes, y puede ser particularmente útil en muestras complejas, tales como muestras biológicas.

25 Los espectrómetros de masas utilizan varios métodos de ionización diferentes. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, fuentes de ionización en fase gaseosa tales como impacto electrónico, ionización química e ionización de campo, además de fuentes de resorción, tales como resorción de campo, bombardeo con átomos rápidos, desorción/ionización láser asistida por matriz y desorción/ionización láser potenciada por superficie. Además, los espectrómetros de masas pueden acoplarse a medios de separación tales como cromatografía de gases (CG) y

30 cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En algunos casos se emplea ionización por electropulverización. La ionización por electropulverización (ESI) en modo de ión positivo se usa para conectar la separación por HPLC y la detección por espectrómetro de masas de la hepcidina. La ionización tiene lugar a presión atmosférica. Implica pulverizar el efluente de un análisis de CL o una misma muestra fuera de una pequeña aguja, a la que se aplica un alto voltaje. Este método produce pequeñas gotitas cargadas, y el disolvente de la fase móvil se evapora entonces dejando la molécula de

35 muestra en la fase gaseosa y se ioniza. Estos iones en fase gaseosa generados se “barren” entonces en el espectrómetro de masas para la detección. También pueden emplearse otras técnicas de ionización, tales como ionización química, pero ESI es el mecanismo de ionización preferido. Debido a que un espectro de masas se informa en unidades de m/z , el grado de ionización afectará el pico resultante correspondiente al péptido de hepcidina. La carga de hepcidina puede ser +1, +2, +3, +4, o una combinación de las mismas, dependiendo del método de ionización empleado.

40 En algunas realizaciones, el EM se combina con una etapa de cromatografía de líquidos con el fin de aumentar la sensibilidad de las mediciones resultantes. La HPLC de fase inversa es una técnica de separación que implica transferencia de masas entre dos fases estacionarias no polares y polares relativas inmiscibles. Los componentes de una mezcla se disuelven primero en un disolvente, luego se introducen en la fase móvil y circulan a

45 través de una columna cromatográfica en la que la fase estacionaria se inmoviliza sobre el material de empaquetamiento. En la columna, la mezcla se resuelve en sus componentes dependiendo de la interacción del soluto con las fases móviles y estacionarias. Cada uno de los componentes resueltos se detecta entonces por el espectrómetro de masas.

50 La cuantificación de hepcidina en una muestra se logra añadiendo un patrón interno a las muestras y comparando la relación de hepcidina y patrón interno con relaciones obtenidas de una serie de muestras en las que cantidades conocidas de hepcidina y patrón interno se añaden a la matriz de blanco (una curva patrón, véase, por ejemplo, la figura 8). El uso de este método permite la determinación de niveles de hepcidina en individuos sanos normales, además del nivel de hepcidina de pacientes que sufren septicemia u otras afecciones inflamatorias. Patrones internos apropiados son aquellos que tienen un peso molecular distinto (es decir, señal del espectro de masas) del de hepcidina, pero dentro de

55 un intervalo ± 750 (m/z). En algunas realizaciones, el patrón interno es un péptido de hepcidina isotópicamente marcada, en el que uno o más átomos de H, C, N y/o O se sustituyen con un isótopo estable que tiene una masa diferente (por ejemplo, ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O o ^{18}O). En diversos ejemplos, el patrón interno es un péptido que tiene características de retención y/o cromatográficas similares a la hepcidina y un peso molecular distinto, dentro de ± 50 m/z . En una realización específica, el patrón interno es un péptido de SEC ID N°: 4.

60 La cuantificación de niveles de hepcidina en una muestra permite comparaciones entre conjuntos de datos. Esta capacidad para comparar diferentes mediciones de muestras permite capacidades de diagnóstico, además de capacidades de monitorización. Los métodos de cuantificación para hepcidina pueden utilizarse ventajosamente en el diagnóstico del grado de metabolismo del hierro o alteración de la homeostasis del hierro en pacientes dentro de un

65 ámbito de diagnóstico clínico. Tal diagnóstico podría usarse a su vez por profesionales clínicos para seleccionar e implementar terapias preventivas y de tratamiento apropiadas que incluyen quelación de hierro, tratamiento con hierro,

supresión inflamatoria o terapia eritropoyética. En un ámbito de diagnóstico clínico, los métodos anteriores y cálculos se interpretan de forma que pueda tomarse un llapan de acción apropiado dependiendo de los niveles de concentración de hepcidina, solo o en combinación con otros parámetros tales como aquellos enumerados en la Tabla I. Como se usa en el presente documento, el término “homeostasis del hierro” se refiere a un método de coordinación de todos los aspectos del metabolismo del hierro en el cuerpo para mantener un equilibrio entre la captación de hierro, pérdida de hierro y movilización y almacenamiento de hierro, produciendo el control de los niveles de hierro en suero dentro del intervalo normal. La homeostasis del hierro con un equilibrio negativo (por debajo del normal) consistiría en situaciones en las que niveles de hierro en suero se mantuvieran por debajo del intervalo normal, el equilibrio entre la captación y la pérdida de hierro condujera a una pérdida de hierro neta para el cuerpo o se produjera mala distribución del hierro de forma que se agotaran las reservas de hierro. La homeostasis del hierro con un equilibrio positivo (por encima del normal) consistiría en situaciones en las que niveles de hierro en suero se mantuvieran por encima del intervalo normal, el equilibrio entre la captación y la pérdida de hierro condujera a un aumento de hierro neto para el cuerpo o se produjera mala distribución del hierro de forma que aumentarían las reservas de hierro.

Con el fin de facilitar el diagnóstico de pacientes, árboles de decisión, tales como el de la figura 1B, pueden usarse para interpretar el nivel de hepcidina, y que se usa para ayudar al usuario o intérprete en la determinación de un ciclo de tratamiento y la significancia de la lectura de la concentración. Se predicen que los valores de hepcidina son elevados en pacientes con inflamación, sobrecarga de hierro y enfermedad de la ferroportina y suprimidos en pacientes con hemocromatosis, hemoglobinopatías y otros trastornos eritrocitarios. El árbol de decisión de la figura 1B muestra cómo la medición de niveles de hepcidina simplifica el diagnóstico y/o evaluación de un paciente que se sospecha que tiene trastornos del metabolismo del hierro. La figura 1A muestra la evaluación del árbol de decisión sin una medida de niveles de hepcidina.

En diversos ejemplos pueden usarse niveles de hepcidina para mejorar el tratamiento de un paciente con anemia. Analizando la concentración de niveles de hepcidina en un paciente, el responsable médico de la toma de decisiones puede evaluar mejor un tratamiento particular en consideración o actualmente comenzado por el paciente. En particular, pacientes que son hiposensibles a los tratamientos para anemia típicos tales como eritropoyetina o análogos de la misma (epoetina alfa, epoetina beta, darbepoetina alfa, cualquier proteína o péptido estimulante eritropoyético o molécula pequeña con actividad estimulante eritropoyética), o cualquier otro tipo de terapia eritropoyética, se benefician de los rápidos y/o exactos análisis de tratamientos para anemia alternativos. En algunos ejemplos, el tratamiento para anemia se confecciona para un paciente individual basándose en la monitorización de los niveles de hepcidina del paciente en respuesta a cada tratamiento para anemia.

El término “moléculas estimulantes de la eritropoyesis” o “terapia eritropoyética” como se usa en el presente documento incluye eritropoyetina humana o una variante, derivado, o análogo biológicamente activo de la misma, que incluye un derivado químicamente modificado de tal proteína o análogo o cualquier molécula pequeña que estimule la eritropoyesis. La eritropoyetina incluye, pero no se limita a, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 18 o SEC ID N°: 19. Los aminoácidos 1 a 165 de SEC ID N°: 18 constituyen la proteína madura de cualquier molécula designada una epoetina, por ejemplo, epoetina alfa, epoetina beta, epoetina gamma, epoetina zeta, y similares. Adicionalmente, una epoetina también incluye cualquiera de las epoetinas anteriormente mencionadas que están químicamente modificadas, por ejemplo, con uno o más polímeros solubles en agua tales como, por ejemplo, polietilenglicol. También se contemplan análogos de eritropoyetina, con el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad con SEC ID N°: 18 o SEC ID N°: 19, y que todavía retienen actividad eritropoyética.

Secuencias, fabricación, purificación y uso de eritropoyetina humana recombinante a modo de ejemplo se describen en varias publicaciones de patente, que incluyen, pero no se limitan a, la patente de EE.UU. de Lin 4.703.008 y la patente de EE.UU. de Lai 4.667.016. La darbepoetina es un análogo de eritropoyetina hiperglucosilado que tiene cinco cambios en la secuencia de aminoácidos de rHuEPO que proporcionan dos cadenas de hidrato de carbono adicionales. Más específicamente, la darbepoetina alfa contiene dos cadenas de hidrato de carbono ligadas en N adicionales en los residuos de aminoácidos 30 y 88 de SEC ID N°: 18. Secuencias, fabricación, purificación y uso de darbepoetina y otros análogos de eritropoyetina a modo de ejemplo se describen en varias publicaciones de patente, que incluyen Strickland y col., documento WO 91/05867, Elliott y col., documento WO 95/05465, Egrie y col., documento WO 00/24893, y Egrie y col. documento WO 01/81405. Derivados de polipéptidos que se producen naturalmente o análogos incluyen aquellos que se han modificado químicamente, por ejemplo, para unirse a polímeros solubles en agua (por ejemplo, PEGilados), radionúclidos, u otros restos de diagnóstico o que eligen diana o terapéuticos.

El término “actividad eritropoyética” significa actividad para estimular la eritropoyesis como se demuestra en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, el ensayo de ratón policitémico exhipóxico. Véase, por ejemplo, Cotes y Bangham, Nature 191:1065 (1961).

La hepcidina se aísla de una muestra antes de, o en lugar de, EM o análisis de CL-EM. La extracción en fase sólida (EFS) es un medio preferido de aislamiento de hepcidina. El uso de EFS permite la extracción y aislamiento de hepcidina de muestra biológica (tal como suero, plasma y orina) para la posterior separación por HPLC y detección espectrométrica de masa. La EFS es una técnica cromatográfica para preparar muestras antes de realizar análisis químicos cuantitativos, tales como EM. El objetivo de la EFS es aislar analitos diana de una compleja matriz de muestras que contiene

interferencias no deseadas, que tendrían un efecto negativo sobre la capacidad para realizar el análisis cuantitativo. Los analitos diana aislados se recuperan en una disolución que es compatible con el análisis cuantitativo. Esta disolución final que contiene el compuesto diana puede usarse para análisis directamente, o evaporarse y reconstituirse en otra disolución de un menor volumen con el fin de concentrar adicionalmente el analito diana, y hacerlo más susceptible a la detección y medición. El análisis de muestras biológicas, tales como plasma y orina, usando cromatografía de líquidos (CL) generalmente se beneficia de EFS antes del análisis tanto para eliminar materia insoluble como interferencias solubles, y también para pre-concentrar compuestos diana para la potenciada sensibilidad de detección. Muchas matrices de muestras encontradas en bio-separaciones contienen tampones, sales o tensioactivos, que puede ser particularmente problemáticos cuando se usa detección basada en espectrómetro de masas. La EFS también puede usarse para realizar un simple fraccionamiento de una muestra basándose en diferencias en la estructura química de las partes componentes, reduciendo así la complejidad de la muestra que va a analizarse.

Métodos de EFS típicos contienen una secuencia de etapas, cada una con un fin específico. La primera etapa, denominada la etapa de "acondicionamiento", prepara el dispositivo, normalmente una columna de cromatografía, para recibir la muestra. Para EFS de fase inversa, la etapa de acondicionamiento implica lavar primero el dispositivo de EFS con un disolvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo, que sirve para humedecer las superficies de tanto el dispositivo como el sorbente, y también aclara cualquier contaminante residual del dispositivo. Este aclarado inicial generalmente va seguido de un aclarado con disolvente altamente acuoso, que frecuentemente contiene tampones de pH u otros modificadores, que prepararán el sorbente cromatográfico para retener preferencialmente los componentes de la muestra diana. Una vez acondicionado, el dispositivo de EFS está listo para recibir la muestra.

La segunda etapa, denominada la etapa de "carga", implica pasar la muestra a través del dispositivo. Durante la carga, los componentes de la muestra, junto con muchas interferencias, son adsorbidos sobre el sorbente cromatográfico. Una vez se completa la carga se usa una etapa de "lavado" para aclarar componentes de la muestra interferentes, a la vez que se permite que los compuestos diana sigan siendo retenidos sobre el sorbente. Con poca o ninguna pérdida de hepcidina, la medición resultante de hepcidina refleja con exactitud la cantidad real de hepcidina en la muestra.

Para lavar la muestra que contiene hepcidina se prefiere un pH superior a 7, un pH superior a 8 es más preferido, y un pH de aproximadamente 10 o superior es el más preferido. El lavado usando un sistema de disolventes en este intervalo de valores de pH permite lavar contaminantes y otras biomoléculas en la muestra de la hepcidina, con poca o ninguna pérdida de la propia hepcidina. Tampones usados para ajustar el pH del disolvente de lavado incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de amonio, fosfato, carbonatos, y similares. El hidróxido de amonio es el tampón preferido. La cantidad de tampón presente en el sistema de disolventes afectará el pH resultante, pero está normalmente presente en cantidad de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 %, más preferentemente de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 1,5 a aproximadamente el 3 %. En una realización específica, el hidróxido de amonio es el tampón y está presente en una cantidad de aproximadamente el 2 %. El disolvente de lavado normalmente es una mezcla de agua y metanol. El metanol está presente en cantidades de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 70 % de la mezcla, y más preferentemente es de aproximadamente el 40 a aproximadamente el 50 %. El resto del sistema de disolventes es agua.

Entonces, la etapa de lavado va seguida de una etapa de "elución", que normalmente usa un fluido que contiene un alto porcentaje de un disolvente orgánico, tal como metanol o acetonitrilo. El disolvente de elución se elige para liberar eficazmente los compuestos diana del sorbente cromatográfico, y en un recipiente de muestra adecuado. El disolvente eluyente normalmente tiene un pH inferior a aproximadamente 8, más preferentemente a pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, y lo más preferentemente de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5. Un pH de aproximadamente 5 es un pH altamente preferido para el disolvente eluyente. Tampones usados para ajustar el pH del disolvente eluyente incluyen, pero no se limitan a, acetato, citrato, maleato, formiato, succinato y similares. La elección del tampón depende del pH deseado. El disolvente eluyente normalmente es una mezcla de agua y metanol. El metanol está presente en cantidades superiores al 70 % de la mezcla, y más preferentemente es superior a aproximadamente el 75 %, y lo más preferentemente es superior a aproximadamente el 80 %. El resto del sistema de disolventes es agua.

La elución con altas concentraciones de disolvente orgánico requiere que se realicen etapas adicionales antes del análisis. En el caso de análisis cromatográfico (CL o CL-EM) es preferible que las muestras se disuelvan en una mezcla acuosa-orgánica en vez de un disolvente orgánico puro, tal como metanol o acetonitrilo. Las técnicas y materiales de EFS se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.368.729; 5.279.742; 5.260.028; 5.242.598; 5.230.806; 5.137.626; y 5.071.565, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad. Los materiales sorbentes para columnas de EFS incluyen, pero no se limitan a, C18, C8, materiales de copolímeros de intercambio catiónico y equilibrados hidrófilo-lipófilos. Tales columnas de EFS están comercialmente disponibles de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen Waters (por ejemplo, Oasis HLB y MCX), Varian (por ejemplo, C18 y C8) y Millipore (por ejemplo, C18, C8, y MPC catiónica de fase mixta).

Se proporcionan los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Instrumentación

Todos los experimentos de cuantificación se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API4000 (SciEx) de Applied Biosystems (Foster City, CA) con fuente de ESI Turbo. El sistema se controló por el software Analysis 1.3.1. Los experimentos de estabilidad y de identificación de productos de degradación se llevaron a cabo en Finnigan LTQ (Thermo-Electron) controlado por el software Xcalibur 1.3.

La separación se realizó en una columna Polaris C18A, 5 μm (2,1 x 50 mm, Varian). La velocidad de flujo se fijó a 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. El disolvente A de elución fue 5:95 de metanol : agua (v/v) y el disolvente B fue 95:5 de metanol: agua, conteniendo ambos 0,1 % de ácido fórmico. Se desarrollaron dos métodos cromatográficos diferentes. Para el análisis cuantitativo y el estudio de estabilidad de hepcidina, el sistema de HPLC se compuso de un inyector automático HTS PAL de LEAP Technologies (Carrboro, NC) y una bomba binaria Rheos. Las condiciones del gradiente se fijaron del siguiente modo: 0-0,1 min, isocrático 2 % de B/98 % de A; 2 % de B al 5 % de B a 0,1-4,5 min; 95 % de B a 4,5-4,9 min; 95 % de B al 2 % de B a 4,9-5,0 min; 5,0-6,0 min, isocrático 2 % de B. El disolvente de lavado de la aguja fue metanol : agua (50:50, v/v). Para la identificación de productos de la degradación enzimática de hepcidina, el sistema de HPLC consistió en una configuración Agilent 1100 completamente equipada (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) con inyector automático controlado por temperatura fijado a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se ejecutó un gradiente lineal del 5 % al 95 % de B en 18 min, luego se mantuvo al 95 % de B durante 2 min, después de lo cual el gradiente se devolvió a las condiciones iniciales y se equilibró durante 10 min antes de la siguiente ejecución. El volumen de inyección de muestra fue 20 μl para ambos experimentos.

Preparación de disoluciones patrón

Se preparó disolución madre de hepcidina humana (SEC ID N $^{\circ}$: 4) con concentración 1 mg/ml en tampón acetato sódico 10 mM (pH aproximadamente 5). Se preparó un mg/ml de disolución madre de patrón interno (SEC ID N $^{\circ}$: 17) en agua. SEC ID N $^{\circ}$: 17 tiene una secuencia de Ac-Lys-Lys-Arg-Pro-Hyp-Gly-CpG-Ser-DTic-CpG en la que Ac es acetilo, Lys es lisina, Arg es arginina, Pro es prolina, Hyp es trans 4-hidroxi-prolina, Gly es glicina, CpG es ciclopentilglicina, Ser es serina y DTic es ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico. Ambas disoluciones madres se almacenaron a -70 $^{\circ}\text{C}$. La concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de disolución de trabajo de hepcidina se preparó diluyendo disolución madre con tampón acetato sódico 10 mM. La disolución de patrón interno final con concentración 100 ng/ml se preparó diluyendo disolución madre de patrón interno en agua.

Los patrones de calibración se prepararon recientemente enriqueciendo suero de blanco con disolución de trabajo de hepcidina (SEC ID N $^{\circ}$: 4), produciendo concentraciones de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/ml de suero. Se prepararon tres concentraciones diferentes (20, 200, 800 ng/ml) de muestras de control de calidad (CC) junto con los patrones de calibración.

Preparación de muestras para identificación de la estabilidad y productos de degradación.

Se llevó a cabo un estudio de estabilidad de hepcidina humana incubando hepcidina (SEC ID N $^{\circ}$: 4) en 10 % de agua de suero humano a temperatura ambiente. La incubación se inició mezclando 20 μl de disolución de trabajo de hepcidina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) con 1980 μl de 10 % de agua de suero en un tubo de ensayo de 5 ml, resultando 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concentración inicial. Una disolución de 100 μl se tomó en alícuotas de la disolución de incubación a momentos de tiempo de 0 h, 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h y 5 h. Cada alícuota se extrajo por EFS inmediatamente y se guardó a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis.

Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida se llevó a cabo sobre placa de 96 pocillos Oasis HLB (Waters, Milford, MA). Disolvente de lavado: 30 % de metanol/agua con pH de aproximadamente 10 ajustado con hidróxido de amonio. Disolvente de elución: disolución de 90 % de metanol/agua con pH de aproximadamente 5 ajustado con ácido acético. Después de la activación y acondicionamiento, 100 μl de muestra de suero y 200 μl de patrón interno se cargaron sobre la placa de EFS, se lavó con agua y 350 μl de disolvente de lavado. La elución se hizo usando 100 μl de disolvente de elución y se diluyó con 100 μl de agua. El eluato de 200 μl resultante estuvo listo para análisis de CL-EM.

Optimización por ESI-EM/EM

Se determinaron iones precursores y de producto para hepcidina humana (H-hep; SEC ID N $^{\circ}$: 4) por infusión directa de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hepcidina en 50:50 de metanol: agua (v/v) que contenía 0,1 % de ácido fórmico. Como la hepcidina es un péptido básico, se usó un modo de ionización positivo por ESI. Como se muestra en la figura 2, la formación de iones de hepcidina con el estado de carga +4 (m/z 698,5) y +3 (m/z 930,8) es predominante. Después de la deconvolución de carga, un masa promedio de 2788, que es 8 Da menos que la masa calculada a partir de la secuencia de hepcidina, indica cuatro enlaces disulfuro formados entre los ocho aminoácidos de cisteína. Las figuras 3 y 4 muestran los espectros de EM/EM para ambos estados de carga. La disolución asistida por colisión de los iones precursores de hepcidina a m/z 698 y m/z 931 producen iones de producto importantes a m/z 110 correspondiente al ión imonio de histidina y a m/z 120 correspondiente al ión imonio de fenilalanina. Los parámetros de ESI-EM/EM para las transiciones iónicas que conducen a iones de producto de m/z 110 se optimizaron para la cuantificación de hepcidina como se muestra en la Tabla II.

Tabla II - Método de EM

Compuesto	Q1	Q3		Tiempo (ms)		DP	CE	CXP
H-hep	698,10	110,15		150		71	75	8
H-hep	930,60	110,15		150		81	117	8
Patrón interno	619,10	132,15		150		86	59	10
CAD	CUR	GS1	GS2	IS	TEM	Q1 RES.		Q3 RES.
8	20	20	20	4000	450	Unidad		Baja

5 Q1 - cuadrupolo 1; Q3 - cuadrupolo 3; DP - potencial de desagrupamiento; CE - energía de colisión; CXP - compensación de la colisión; CAD - gas de colisión; CUR - gas cortina; GS1 - gas 1 de la fuente de iones; GS2 - gas 2 de la fuente de iones; IS - voltaje de pulverización iónica; TEM - temperatura; Q1 RES - resolución del cuadrupolo 1; Q3 RES - resolución del cuadrupolo 3.

Optimización de la extracción en fase sólida para la cuantificación de hepcidina

10 Aún cuando la espectrometría de masas en tándem (EM/EM) ofrece gran especificidad por detección del analito de interés, la competición por la ionización en la superficie de separación de CL-EM de componentes interferentes co-
 15 diluidos de la separación con CL puede producir un efecto de matriz significativo y no conforme que conduce a efectos no deseables, tales como supresión iónica y ruidos químicos. Así, la limpieza de muestras antes de la separación por CL tiene un gran impacto sobre el bioanálisis de CL-EM/EM debido a la complejidad de matrices biológicas y la potencia de
 20 resolución limitada de HPLC, especialmente para separación rápida por CL. La extracción en fase sólida se usa para bioanálisis de hepcidina mediante la cual la hepcidina se extrae y se pre-concentra, mientras que la cantidad de los
 25 componentes interferentes se reduce enormemente.

La extracción en fase sólida de hepcidina de suero humano se realizó en una placa Waters Oasis HLB. El sorbente fue un polímero equilibrado hidrófilo/lipófilo que tenía mayor retentiva y capacidad que C18. Debido a que la hepcidina es un péptido básico, el rendimiento de la extracción está enormemente influido por el pH, además de la concentración orgánica de los disolventes de lavado y elución. La figura 5 muestra las curvas de elución de cantidad fijada de hepcidina usando disolventes de metanol/agua con pH de aproximadamente 10 ajustado por hidróxido de amonio y disolventes con pH de aproximadamente 5 ajustado por ácido acético. El lavado de la hepcidina del sorbente de EFS se produce incluso con agua en condición ácida. A diferencia, un máximo de 50 % de metanol en condición básica no produce elución de hepcidina del sorbente de EFS. Se eligió un 30 % de metanol con pH de aproximadamente 10 para el lavado y se usó 90 % de metanol con pH de aproximadamente 5 para la elución de EFS de hepcidina.

CL-EM/EM de hepcidina humana en extracto de suero

30 La figura 5 muestra un cromatograma de MRM de hepcidina humana extraída de suero humano de blanco. La transición iónica de m/z 930,60 → 110,15 da fondo mucho más limpio y menos interferencia de la matriz de suero que la transición iónica m/z 698,10 → 110,15, luego se eligió para la cuantificación de hepcidina. La figura 6 muestra el cromatograma de hepcidina y el patrón interno extraído de suero de pacientes con septicemia.

Características, exactitud y precisión de la curva de calibración

40 Se obtuvo una curva de calibración lineal para hepcidina humana en suero en el intervalo de 10 a 100 ng/ml, las desviaciones para los siete patrones distintos de cero (10, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml) por duplicado están todas dentro del 15 % como se muestra en la figura 7.

45 La exactitud, expresada como el porcentaje de desviación de la concentración calculada con respecto a la nominal (% de RE), se evaluó a tres concentraciones: CC1 (20 ng/ml), CC2 (200 ng/ml) y CC3 (800 ng/ml). Las tres muestras de control de calidad tienen desviaciones inferiores al 10 %. La precisión también se evaluó a tres CC, y todos los valores de % de RSD fueron inferiores al 10 % como se muestra en la Tabla III.

Tabla III

CC (ng/ml)	Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3	Ejecución 4	Ejecución 5	Ejecución 6	Promedio (ng/ml)	% de RE	% de RSD
20,0	19,2	16,1	17,9	19,3	21,3	18,2	18,7	6,7	9,3
200,0	187,0	185,0	195,0	196,0	187,0	195,0	190,8	4,6	2,6
800,0	794,0	791,0	806,0	808,0	772,0	781,0	792,0	1,0	1,8

El método se aplicó a niveles de hepcidina de ensayo en suero de pacientes con septicemia y muestras de pacientes con

anemia de donantes. La Tabla IV muestra los resultados del nivel de hepcidina de sueros de pacientes con septicemia.

Tabla IV

Muestra de septicemia	1	2	3	4	5	6	Promedio	% de RSD
1	135	152	133	158	133	137	141,3	7,7
2	194	222	199	218	203	209	207,5	5,3
3	204	213	187	197	190	181	195,3	6,0
4	<10 ng/ml							
5	<10 ng/ml							

5 Estabilidad de hepcidina humana

Se sabe que los péptidos son susceptibles a degradación por las enzimas endógenas dentro de las matrices biológicas. Además de la hepcidina humana de 25 péptidos, también se ha informado que existen una hepcidina-20 y hepcidina-22 truncadas en el extremo N en orina humana. Así, la evaluación de la estabilidad de hepcidina y la identificación de sus productos de degradación es importante en el desarrollo del método. La estabilidad de hepcidina se evaluó incubando hepcidina en 10 % de suero humano/agua a temperatura ambiente con una concentración inicial de 1 µg/ml, seguido de análisis de CL-EM/EM. La relación del área pico de hepcidina con respecto al patrón interno se usó para evaluar la estabilidad, y todos los datos se normalizaron al valor en el momento de tiempo 0 h. Los datos de estabilidad (figura 8) indicaron que la hepcidina humana es relativamente estable. En el plazo de cinco horas de incubación, la hepcidina mostró menos del 10 % de degradación.

El producto de degradación se identificó por el método de CL-EM/EM dependiente de datos usando el instrumento Finnigan LTQ. La figura 9 muestra el cromatograma pico base de la disolución de incubación en el momento de tiempo 0 h. La secuenciación de péptidos basada en el espectro de masas en tándem confirma que el pico en el tiempo de retención 8,18 min es hepcidina humana (figura 10). Debido a los cuatro enlaces disulfuro de las cisteínas internas, los principales iones de fragmentos son iones b pequeños (b3, b4) e iones y grandes (y21, y22, y23 y y24). La figura 11 muestra el cromatograma pico base de la disolución después de cuatro horas de incubación. Se detectó un nuevo pico en el tiempo de retención de 7,53 min y se identificó como la hepcidina humana con una metionina oxidada (M21) por su EM/EM (figura 12).

25 Mediciones del nivel de hepcidina de pacientes

Se recogieron muestras de pacientes que padecían anemia de cáncer (obtenidas de ProteoGenex) o voluntarios (control). 100 µl de cada muestra, blancos de suero y patrones de calibración que consistieron en siete concentraciones distintas de cero por duplicado (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml) se extrajeron por EFS usando un placa de 96 pocillos Oasis HLB mElution (Waters, Milford, MA). El disolvente de lavado fue 30 % de metanol/agua con un pH de aproximadamente 10 ajustado con hidróxido de amonio. El disolvente de elución fue disolución de 90 % de metanol/agua con un pH de aproximadamente 5 ajustado con ácido acético. La placa de EFS se activó con 500 µl de metanol y se acondicionó con 500 µl de agua, luego se cargaron 100 µl de muestra de suero y 200 µl de patrón interno sobre la placa de elución, se lavó con 350 µl de agua y 350 µl de disolvente de lavado. La elución se hizo usando 100 µl de disolvente de elución y se diluyó con 100 µl de agua. El eluato de 200 µl resultante se analizó por CL-EM/EM.

20 µl de cada muestra extraída se inyectaron sobre una columna de HPLC Polaris C18A, 5 µm (2,1 x 50 mm, Varian). La velocidad de flujo de CL se fijó a 300 µl/min. La fase A móvil de HPLC fue 5:95 de metanol/agua y la fase B móvil fue 95:5 metanol/agua, conteniendo ambas 0,1 % de ácido fórmico. Las condiciones del gradiente se fijaron del siguiente modo: 0-0,1 min, isocrático 2 % de B/98 % de A; 2 % de B al 95 % de B a 0,1-4,5 min; 95 % de B a 4,5-4,9 min; 95 % de B al 2 % de B a 4,9-5,0 min; 5,0-6,0 min, isocrático 2 % de B.

Se usó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Sciex API4000 de Applied Biosystems (Foster City, CA) con fuente de ESI Turbo para la detección de hepcidina en modo MRM con transición iónica de m/z 930,60 a m/z 110,15. La cuantificación se logró comparando la relación de las áreas pico de CL de la hepcidina y el patrón interno con las relaciones obtenidas de una serie de patrones en los que se conocían las cantidades de hepcidina y patrón interno.

Este experimento permitió la determinación de niveles en suero de hepcidina en una población de control que supuestamente contenía un gran número de individuos sanos, además del nivel en suero de hepcidina de pacientes que sufren anemia de cánceres (AdC). Los resultados se muestran en la figura 14A.

Después de la identificación de niveles de hepcidina elevados, entonces se analizó una muestra para otras concentraciones de índice de hierro para determinar si un paciente tenía o no inflamación o anemia por deficiencia de hierro (figura 14B). Los parámetros se midieron del siguiente modo: hierro en suero, UIBC, ferritina y CRP se midieron en

un analizador de laboratorio clínico Olympus AU400 usando procedimientos convencionales; sTfR se midió usando un método de ELISA convencional (R&D systems).

Separación y determinación de hepcidina-20, hepcidina-22 y hepcidina-25 en una muestra

5 Los niveles relativos y/o absolutos de hepcidina-20, hepcidina-22 y hepcidina-25 en una muestra pueden ser relevantes para la actividad biológica que se espera. Se cree que la hepcidina-20 y la hepcidina 22 se descomponen en productos del péptido maduro de longitud completa. Se ha demostrado que la hepcidina-20 es inactiva en un ensayo biológico, supuestamente debido a la incapacidad para unirse a ferroportina. De ahí que la hepcidina-20 y posiblemente la hepcidina-22 puedan ser constituyentes inactivos del conjunto de hepcidina circulante. Como en ciertos estados de enfermedad tales como enfermedad renal crónica la eliminación normal de hepcidina puede afectarse, puede afectarse la abundancia relativa de diferentes formas. Por este motivo, hay ventajas en desarrollar métodos de detección que permitan la estimación de material de longitud completa (hepcidina -25) con respecto a hepcidina-22 y hepcidina -20.

15 Iones precursores y de producto para hepcidina humana truncada del extremo N Hpec-20 (SEC ID N°: 15), Hpec-22 (SEC ID N°: 16) y Hpec-25 intacta (SEC ID N°: 4) se determinaron por infusión directa de 10 µg/ml de hepcidina en 50:50 de metanol : agua (v/v) que contenía 0,1 % de ácido fórmico. Se usó un modo de ionización positiva por ESI. Como se muestra en la figura 15-17, la formación de estados de carga de iones 4+ y 3+ para los tres péptidos de hepcidina es predominante.

20 La disociación asistida por colisión de los iones precursores de Hpec-20, Hpec-22 y Hpec-25 produjeron iones de producto únicos que se optimizaron y se usaron para la cuantificación de Hpec-20, Hpec-22 y Hpec-25 como se muestra en la Tabla V. La hepcidina marcada con isótopo Hpec-25* se usó como patrón interno.

25 Tabla V

Compuesto	Q1	Q3	Tiempo (ms)	DP	CE	CXP
Hpec-25* IS	700,58	354,05	150	76	41	26
Hpec-22	610,01	763,95	150	41	27	12
Hpec-20	548,88	693,55	150	36	21	10
Hpec-25d	698,08	354,05	150	76	41	26
CUR	GS1	GS2	IS	TEM	CAD	
40	70	50	5000	450	10	

Q1 - cuadrupolo 1; Q3 - cuadrupolo 3; DP - potencial de desagrupamiento; CE - energía de colisión; CXP - compensación de la colisión; CUR - gas cortina; GS1 - gas 1 de la fuente de iones; GS2 - gas 2 de la fuente de iones; IS - voltaje de pulverización iónica; TEM - temperatura; CAD - gas de colisión.

30 La separación de las tres hepcidinas en cada muestra se realizó sobre una columna Polaris C18A, 5 µm (75 x 2,0 mm, Varian). La velocidad de flujo se fijó a 400 µl/min. El disolvente A de elución fue 5:95 de metanol : agua (v/v) y el disolvente B fue 95:5 de metanol : agua, conteniendo ambos 0,1 % de ácido fórmico. El sistema de HPLC se compuso de un inyector automático HTS PAL de LEAP Technologies (Carrboro, NC) y una bomba binaria Rheos. Las condiciones del gradiente se fijaron del siguiente modo: 0-0,5 min, isocrático 2 % de B/98 % de A; 2 % de B al 95 % de B a 0,5-4,0 min; 95 % de B a 4,0-5,4 min; 95 % de B al 2 % de B a 5,4-5,5 min; 5,5-6,5 min, isocrático 2 % de B. El volumen de inyección de muestra fue 20 µl para todos los experimentos.

Los patrones de calibración se prepararon recientemente enriqueciendo suero de blanco con péptidos de hepcidina humana, produciendo concentraciones de 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng/ml de Hpec-20, Hpec-22 y Hpec-25 en patrones de suero. Tanto Hpec-20 como Hpec-22 mostraron excelente intervalo lineal de 2,5 a 500 ng/ml, mientras que Hpec-25 mostró excelente intervalo lineal de 5 a 500 ng/ml (figura 18).

45 La extracción en fase sólida se llevó a cabo sobre placa de 96 pocillos Oasis HLB (Waters, Milford, MA). El disolvente de lavado fue 30 % de metanol en agua a pH 10 ajustado con hidróxido de amonio. El disolvente de elución fue disolución de 90 % de metanol en agua a pH 5 ajustado con ácido acético. Después de la activación y acondicionamiento, 100 µl de muestra de suero y 200 µl de patrón interno se cargaron sobre la placa de EFS, luego se lavó con agua y 350 µl de disolvente de lavado. La elución se realizó usando 100 µl de disolvente de elución y se diluyó con 100 µl de agua. El eluato de 200 µl resultante estuvo listo para análisis de CL-EM.

50 Se analizaron nueve muestras de septicemia usando el protocolo anterior. Las concentraciones de Hpec-20, Hpec-22 y Hpec-25 se determinaron usando la curva de calibración, indicando BQL que el nivel estuvo por debajo del nivel cuantificable (tanto 5 ng/ml para Hpec-25 como 2,5 ng/ml para Hpec-20 y Hpec-22). Los resultados se muestran a continuación en la Tabla VI.

Tabla VI

Muestra de septicemia	Hepc-25	Hepc-22	Hepc-20
Blanco de suero humano	BQL	BQL	BQL
Blanco de suero humano	BQL	BQL	BQL
Blanco de suero humano	BQL	BQL	BQL
1	1260	33,4	68,4
2	1220	34,9	78,7
3	350	5,59	11,2
4	18,2	BQL	BQL
5	26,5	BQL	BQL
6	20	2,82	16,3
7	790	7,22	105
8	216	6,25	40,1
9	BQL	BQL	BQL
	BQL: <LLOQ=5 ng/ml	BQL: <LLOQ=2,5 ng/ml	BQL: <LLOQ=2,5 ng/ml

5 Se usaron pacientes con septicemia para el análisis debido a sus altos niveles de hepcidina, permitiendo la exacta cuantificación de especies de hepcidina menos abundantes tales como hepcidina-22 y hepcidina-20. Estos resultados demuestran que la exacta detección de las formas menos abundantes puede observarse usando este ensayo. De ahí que la utilización de este método permita la evaluación de la relación de hepcidina activa con respecto a hepcidina total en poblaciones de enfermedad.

10 **Listado de secuencias**

<110> Li, y col.
 <120> Método de detección y/o medición de hepcidina en una muestra
 <130> 01017/41927A
 <150> 60/832.625
 <151> 21/07/2006
 <160> 19
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 1

```

Met Ala Leu Ser Thr Arg Thr Gln Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu
 1           5           10           15

Leu Ala Ser Leu Ser Ser Thr Thr Tyr Leu His Gln Gln Met Arg Gln
 20           25           30

Thr Thr Glu Leu Gln Pro Leu His Gly Glu Glu Ser Arg Ala Asp Ile
 35           40           45

Ala Ile Pro Met Gln Lys Arg Arg Lys Arg Asp Thr Asn Phe Pro Ile
 50           55           60

Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn Ser Gln Cys Gly Ile Cys
 65           70           75           80

Cys Lys Thr
  
```

<210> 2
 <211> 84
 <212> PRT

ES 2 446 266 T3

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

```

Met Ala Leu Ser Thr Arg Ile Gln Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu
 1          5          10          15

Leu Ala Ser Leu Ser Ser Gly Ala Tyr Leu Arg Gln Gln Thr Arg Gln
      20          25          30

Thr Thr Ala Leu Gln Pro Trp His Gly Ala Glu Ser Lys Thr Asp Asp
      35          40          45
Ser Ala Leu Leu Met Leu Lys Arg Arg Lys Arg Asp Thr Asn Phe Pro
      50          55          60

Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn Ser Ser Cys Gly Leu
65          70          75          80

Cys Cys Ile Thr
    
```

5 <210> 3
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

```

Met Ala Leu Ser Ser Gln Ile Trp Ala Ala Cys Leu Leu Leu Leu Leu
 1          5          10          15

Leu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Gly Ser Val Phe Pro Gln Gln Thr Gly
      20          25          30

Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser
      35          40          45

Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro
50          55          60

Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
65          70          75          80

Cys Cys Lys Thr
    
```

10 <210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 4

```

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
 1          5          10          15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
      20          25
    
```

<210> 5
 <211> 25
 <212> PRT
 20 <213> Hapcidina de cino
 <400> 5

```

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
 1          5          10          15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Arg Thr
      20          25
    
```

<210> 6
 <211> 25
 25 <212> PRT
 <213> Cercopithecus aethiops
 <400> 6

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg
 1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Arg Thr
 20 25

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 7

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Ser Cys Cys Arg Asn
 1 5 10 15

Ser Lys Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
 20 25

<210> 8

<211> 25

10 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Leu Phe Cys Cys Lys Cys Cys Lys Asn
 1 5 10 15

Ser Ser Cys Gly Leu Cys Cys Ile Thr
 20 25

<210> 9

15 <211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Asp Thr Asn Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Lys Cys Cys Asn Asn
 1 5 10 15

Ser Gln Cys Gly Ile Cys Cys Lys Thr
 20 25

20 <210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Canis familiaris

25 <400> 10

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys Lys Thr
 1 5 10 15

Pro Lys Cys Gly Phe Cys Cys Arg Thr
 20 25

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

30 <213> Canis familiaris

<400> 11

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys Lys Thr
 1 5 10 15

Pro Lys Cys Gly Phe Cys Cys Lys Thr
 20 25

<210> 12

<211> 25

35 <212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 12

Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys Lys Thr
 1 5 10 15

Pro Lys Cys Gly Leu Cys Cys Lys Thr
 20 25

<210> 13

ES 2 446 266 T3

<211> 60
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

5 Ser Val Phe Pro Gln Gln Thr Gly Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln
 1 5 10 15
 Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg
 20 25 30

 Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys
 35 40 45

 Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
 50 55 60

<210> 14
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

10 Ser Val Phe Pro Gln Gln Thr Gly Gln Leu Ala Glu Leu Gln Pro Gln
 1 5 10 15

 Asp Arg Ala Gly Ala Arg Ala Ser Trp Met Pro Met Phe Gln Arg Arg
 20 25 30

 Arg Arg Arg Asp Thr His Phe Phe Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys
 35 40 45

 Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
 50 55 60

<210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

15 Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
 1 5 10 15

 Cys Cys Lys Thr
 20

<210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

20 Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys
 1 5 10 15

 Gly Met Cys Cys Lys Thr
 20

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> Péptido sintético
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa=acetilo

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=trans 4-hidroxi-prolina
 <220>

40 <221> misc_feature

<222> (8)..(8)
 <223> Xaa=ciclopentilglicina
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa=ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 10 <223> Xaa=ciclopentilglicina
 <400> 17

	Xaa	Lys	Lys	Arg	Pro	Xaa	Gly	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	
<210> 18	1				5						10	
<211> 193												
15 <212> PRT												
<213> Homo sapiens												
<220>												
<221> mat_peptide												
<222> (28)..(192)												
20 <400> 18												

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
      -25                    -20                    -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
      -10                    -5                    -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
      10                    15                    20
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
      25                    30                    35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
      40                    45                    50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
      55                    60                    65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
      70                    75                    80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
      90                    95                    100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
      105                    110                    115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
      120                    125                    130

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
      135                    140                    145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
      150                    155                    160 165

Arg
  
```

<210> 19
 <211> 193
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (28)..(192)

ES 2 446 266 T3

<400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 -25 -20 -15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 -10 -5 -1 1 5

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 10 15 20
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 25 30 35

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 40 45 50

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 55 60 65

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 70 75 80 85

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 90 95 100

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 105 110 115

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 120 125 130

Thr Ala Asp Thr Phe Glu Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 135 140 145

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 150 155 160 165

Arg

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación de una concentración de hepcidina en una muestra que comprende (1) separar la hepcidina de la muestra antes de someter la hepcidina a espectrometría de masas usando extracción en fase sólida; (2) someter la hepcidina y un patrón interno a espectrometría de masas en tándem para producir un espectro de masas que tiene una señal de hepcidina y una señal del patrón interno; (3) medir una intensidad de la señal de hepcidina y la señal del patrón interno; y (4) correlacionar la intensidad de la señal de hepcidina y la intensidad de la señal del patrón interno con una curva patrón de concentraciones de hepcidina para determinar la concentración de hepcidina en la muestra, en el que el patrón interno comprende SEC ID N° 4 isotópicamente marcada.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la hepcidina comprende 20 a 25 residuos de aminoácidos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la hepcidina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID N°: 3; SEC ID N°: 4; SEC ID N°: 13; SEC ID N°: 14; SEC ID N°: 15; y cualquier combinación de las mismas.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la separación de hepcidina comprende introducir la muestra a una columna de fase inversa y tratar la columna de fase inversa con un disolvente eluyente, en el que un eluyente resultante comprende hepcidina, en el que el disolvente eluyente comprende metanol, agua, o mezclas de los mismos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de plasma o una muestra de suero de un mamífero, y preferentemente un ser humano.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el ser humano sufre o se sospecha que padece una afección inflamatoria o relacionada con inflamación.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la afección está seleccionada del grupo que consiste en septicemia, anemia de inflamación, anemia de cáncer, anemia inflamatoria crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, trastorno renal terminal, enfermedad renal crónica, anemia por deficiencia de hierro, enfermedad de la ferroportina, hemocromatosis, diabetes, artritis reumatoide, arteriosclerosis, tumores, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, hemoglobinopatías, trastornos eritrocitarios e insuficiencia renal.
8. El método de la reivindicación 5, en el que el ser humano sufre o se sospecha que padece una afección no inflamatoria.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la afección no inflamatoria está seleccionada del grupo que consiste en deficiencia de vitamina B6, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de folato, pelagra, mielosis funicular, pseudoencefalitis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardíaca coronaria y enfermedad arterial oclusiva periférica.
10. El método de la reivindicación 5, en el que el ser humano sufre o se sospecha que padece una reacción de fase aguda.
11. El método de la reivindicación 5, en el que el ser humano es hiposensible a terapia con eritropoyetina o una terapia eritropoyética.
12. Un método que comprende determinar una concentración de hepcidina en una muestra de un paciente que padece anemia, en el que la determinación comprende separar la hepcidina de la muestra; añadir un patrón interno a la hepcidina; y determinar la concentración de hepcidina según el método de la reivindicación 1.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la concentración de hepcidina es 10 ng/ml o menos, preferentemente 5 ng/ml o menos, y más preferentemente 1 ng/ml o menos.
14. El método de la reivindicación 12, en el que la concentración de hepcidina es 30 ng/ml o superior o 50 ng/ml o superior.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la hepcidina se ioniza por ionización por electropulverización (ESI).

Esquema de estratificación de pacientes

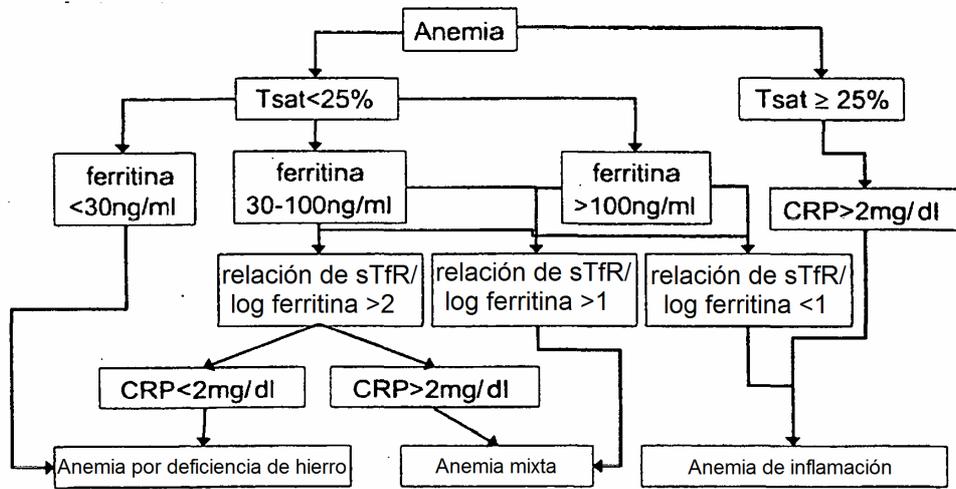


FIG. 1A

Esquema de estratificación de pacientes propuesto

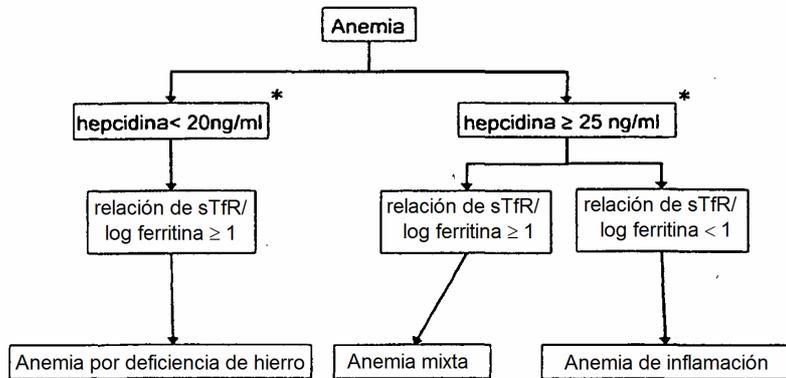


FIG. 1B

Espectro de masas de hepcidina

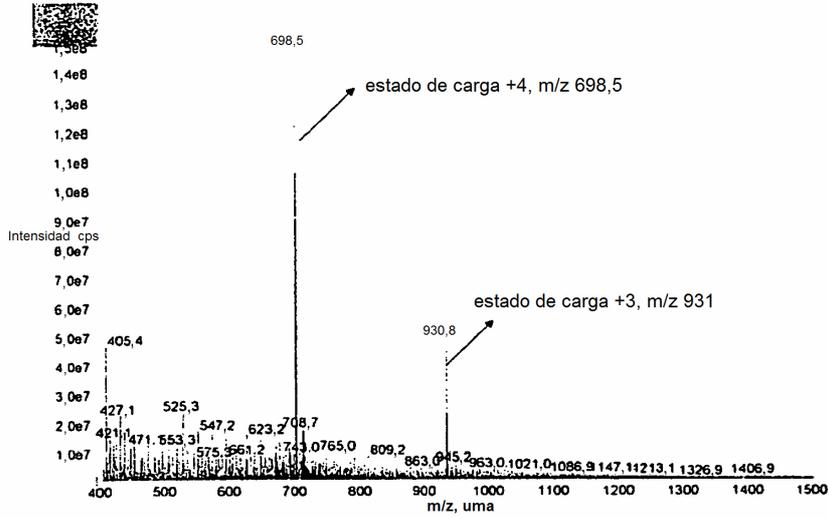


FIG. 2

Espectro de EM/EM de hepcidina

■ •EM2 (930,56) CE (30): 26 barridos de MCA de Muestra 1 (AjusteMuestraNombre) de HHep-1105-931_ini... Máx 3,8e6 cps

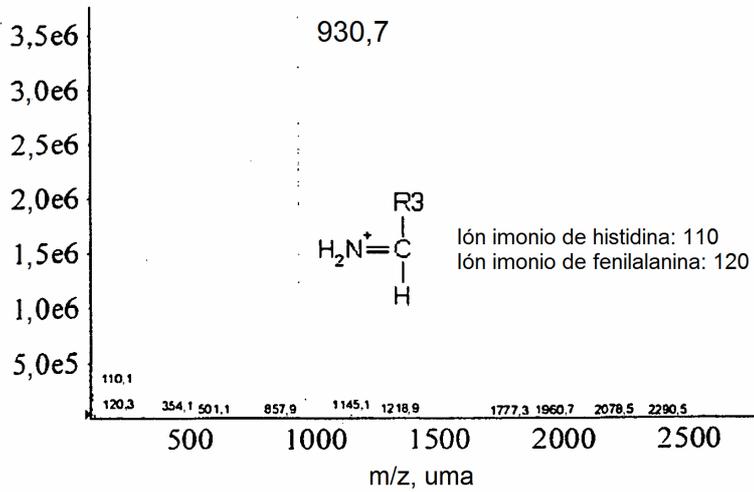


FIG. 3

■ -EM2 (698,16) CE (30): 25 barridos de MCA de Muestra 1 (AjusteMuestraNombre) de Hnep+4_IniProduct.. Máx. 9 1e5 cps.

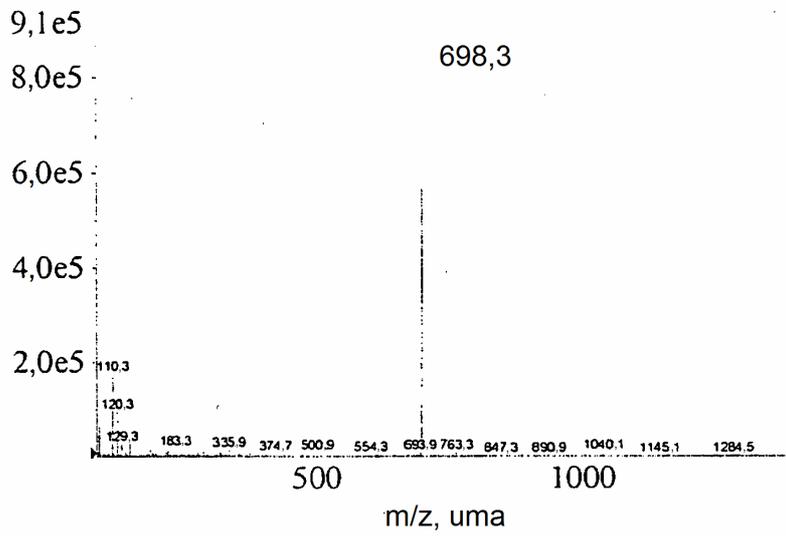


FIG. 4

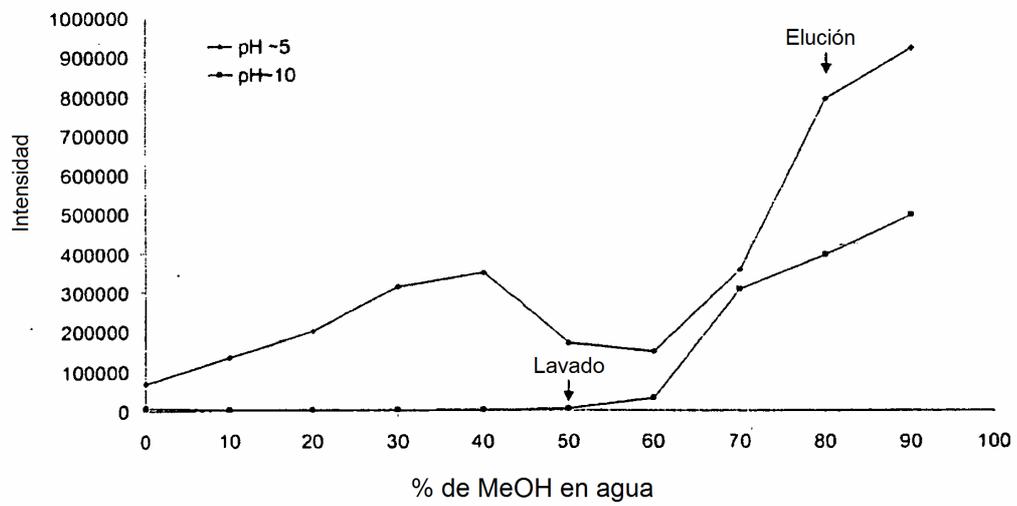


FIG. 5

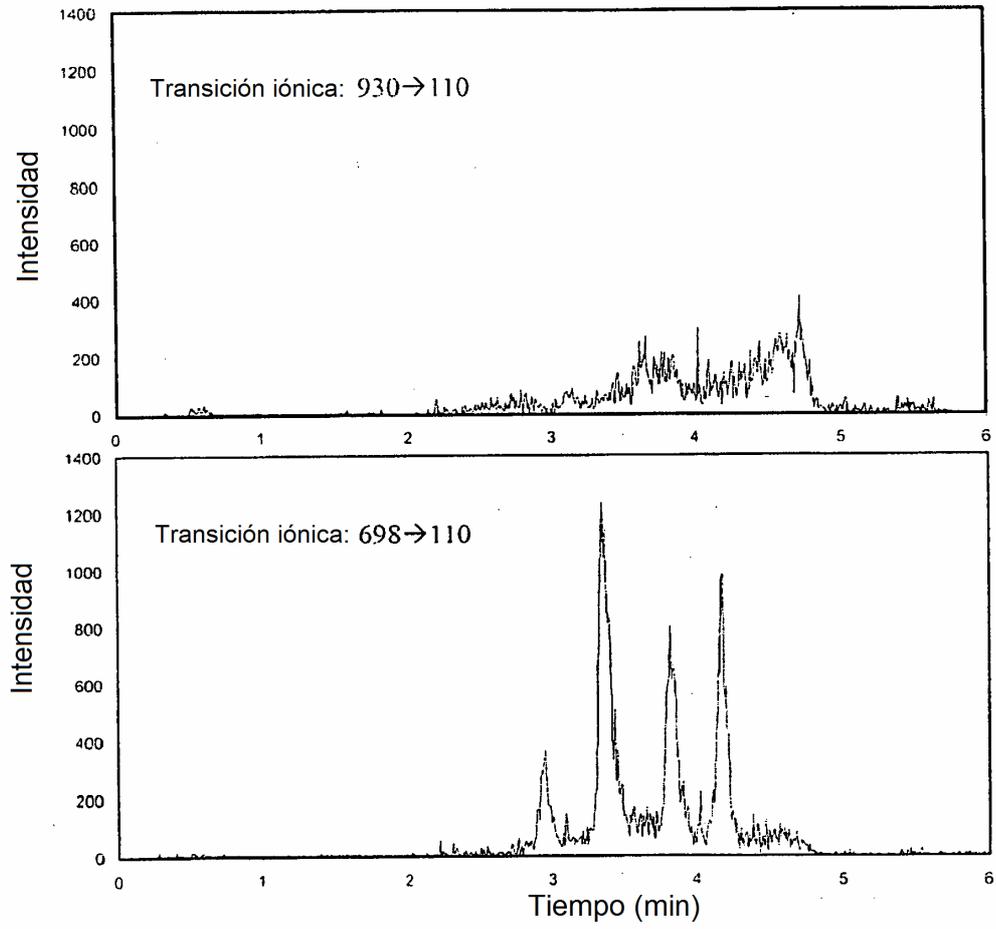


FIG. 6

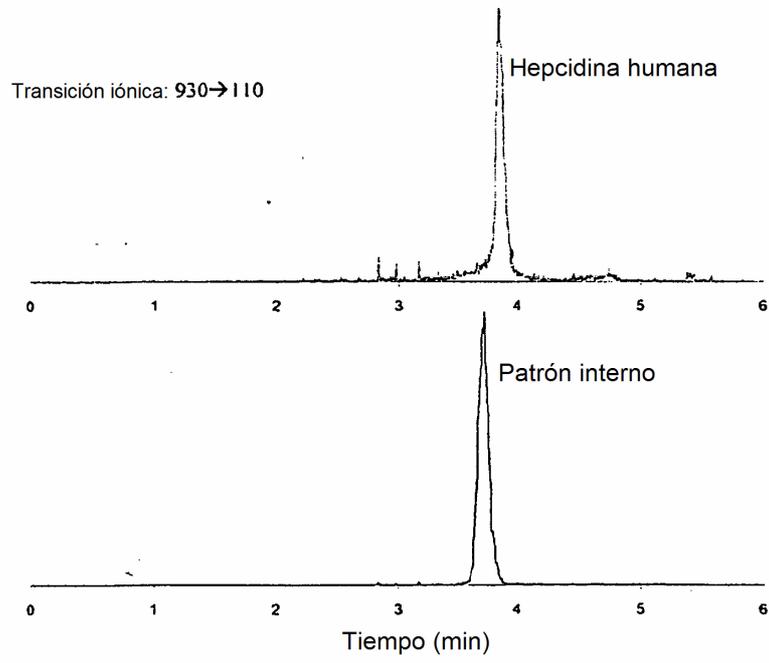


FIG. 7

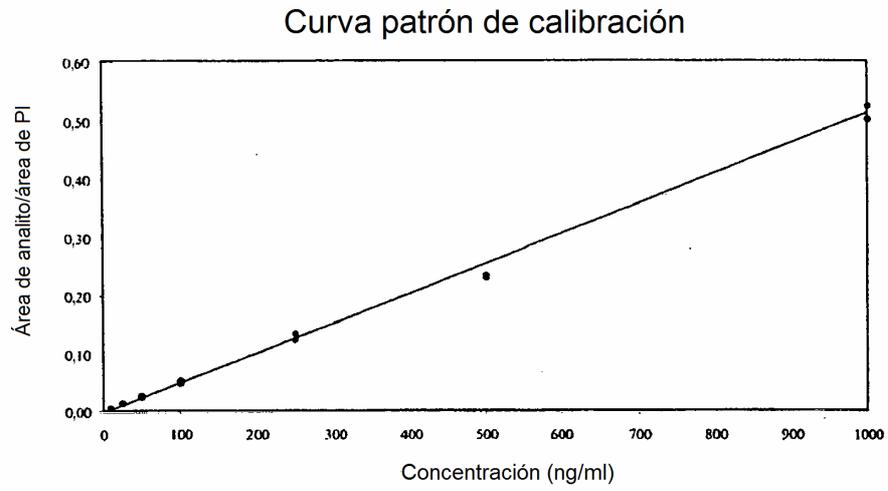


FIG. 8

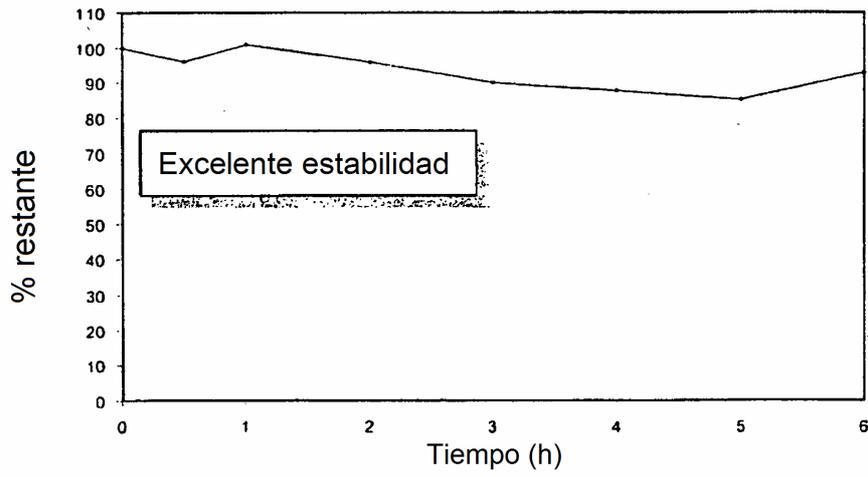


FIG. 9

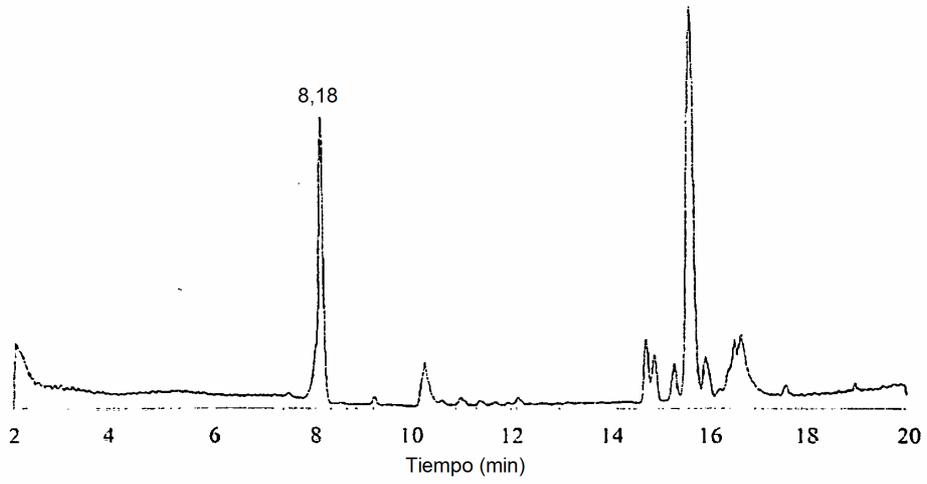


FIG. 10

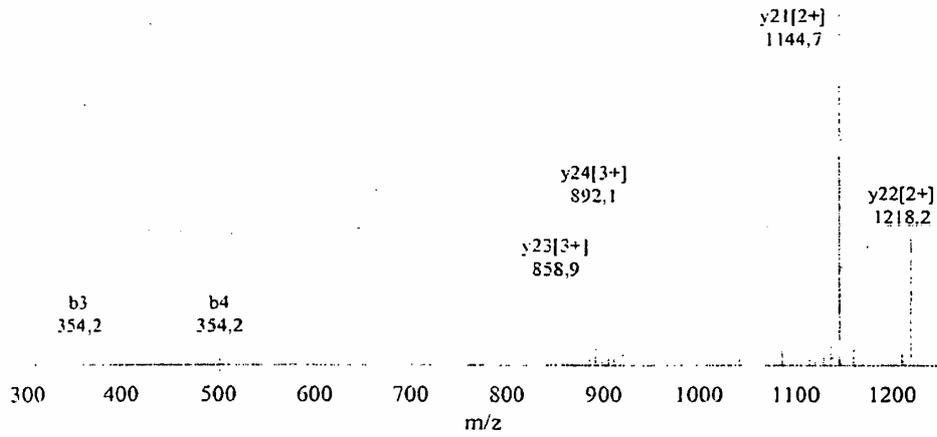


FIG. 11

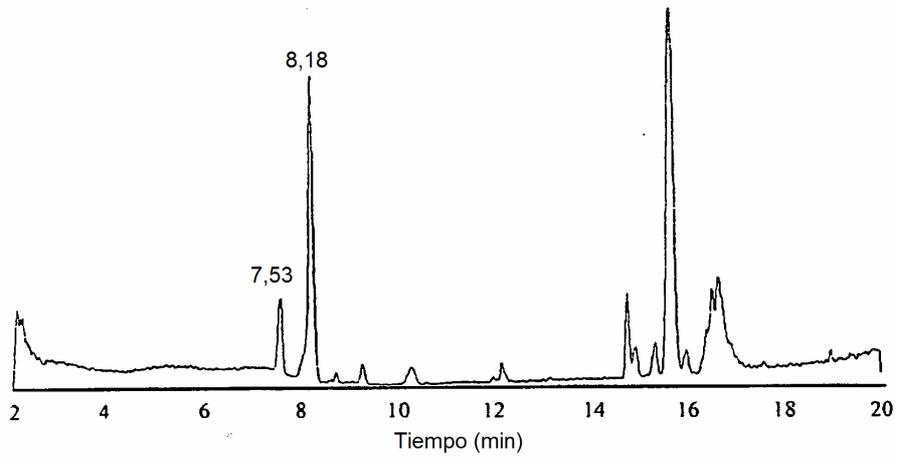


FIG. 12

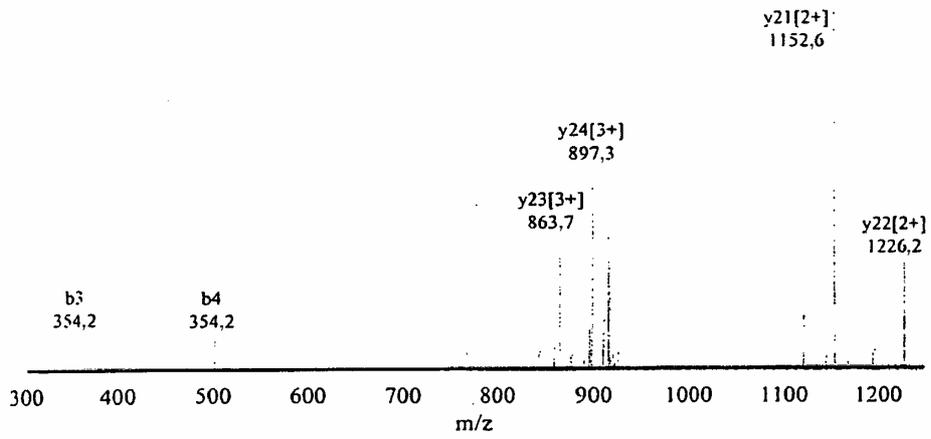


FIG. 13

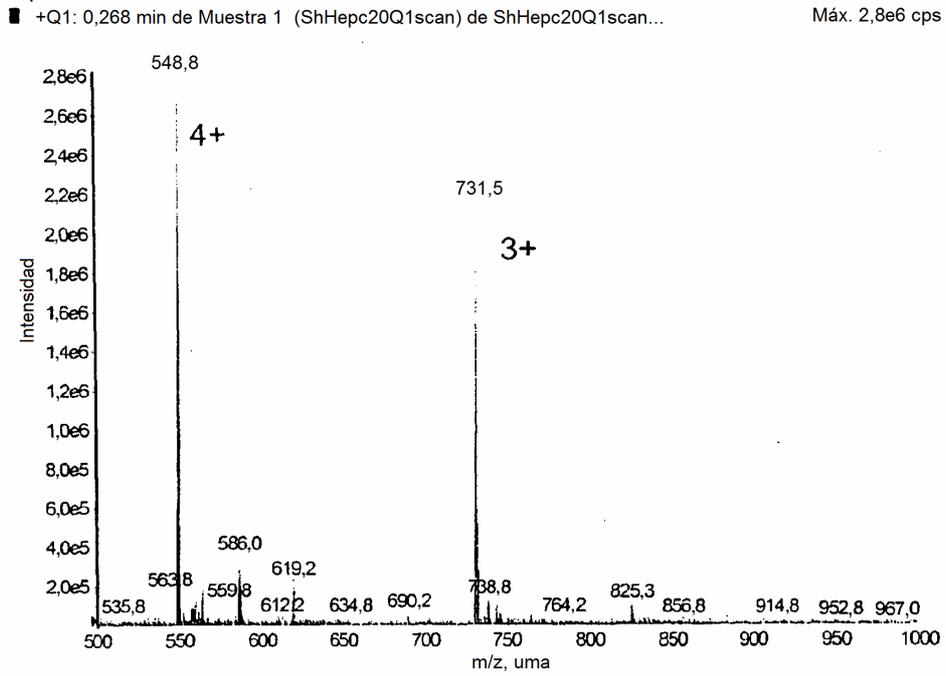


FIG. 15

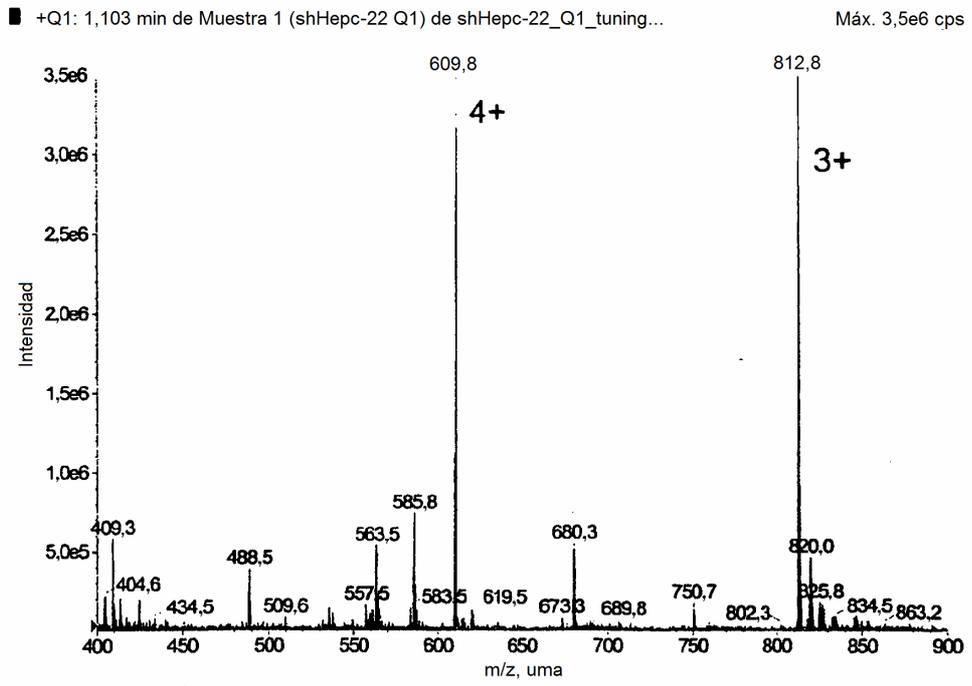
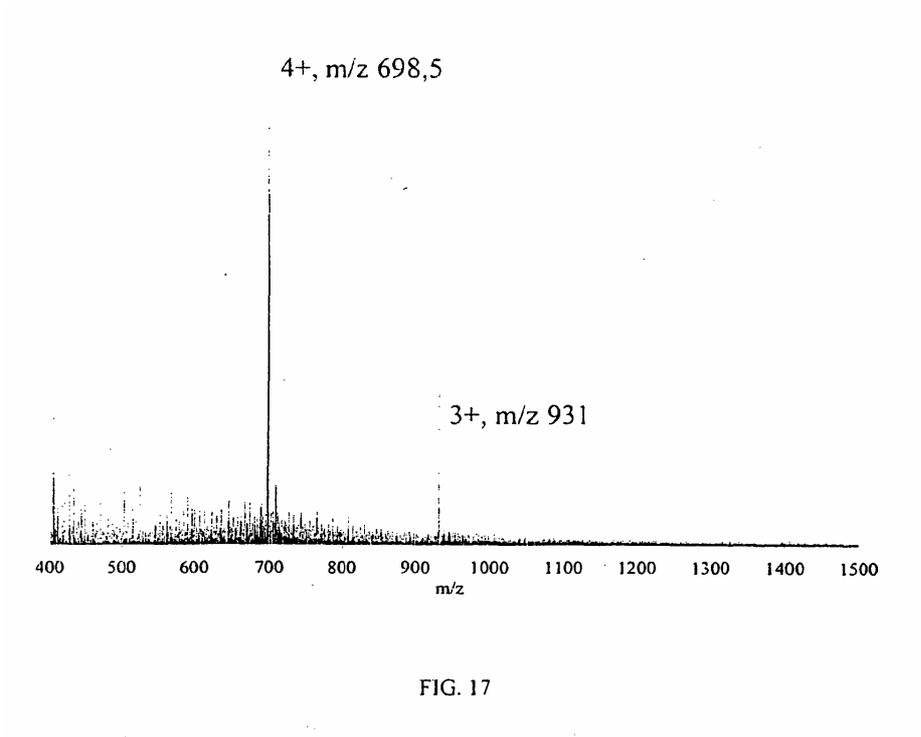


FIG. 16



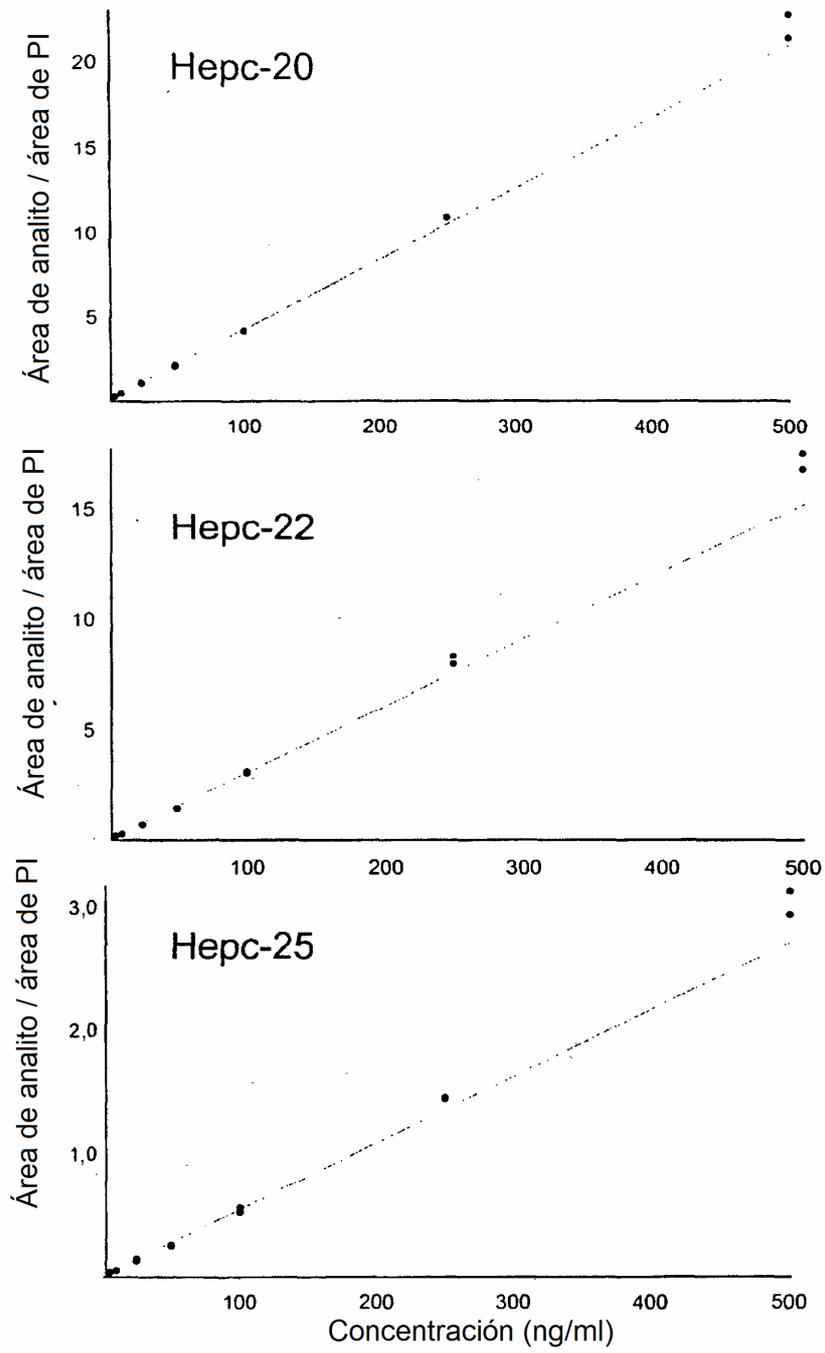


FIG. 18