

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 860**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2007 E 07753293 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1994415**

54 Título: **Diagnóstico y pronóstico de estados patológicos relacionados con la dipeptidil peptidasa**

30 Prioridad:

13.03.2006 US 781924 P

09.06.2006 US 804397 P

02.03.2007 US 892767 P

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

02.11.2015

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

1 BECTON DRIVE

FRANKLIN LAKES, NJ 07417, US

72 Inventor/es:

O'MULLAN, PATRICK y

GELFAND, CRAIG A.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 549 860 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y pronóstico de estados patológicos relacionados con la dipeptidil peptidasa

Campo técnico

5 La invención se refiere de forma general al diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad metabólica de la diabetes de tipo II.

Antecedentes de la técnica

10 Los actuales procedimientos para la evaluación del riesgo de enfermedades o para su diagnóstico se basan a menudo en un diagnóstico por reducción, en un proceso de eliminación o mediante una cirugía invasiva o biopsias. Incluso después de haberse obtenido un diagnóstico definitivo, el pronóstico se basa generalmente en factores subjetivos.

15 En ciertas enfermedades, tal como en una enfermedad metabólica, los procedimientos mediante los cuales se realizan los diagnósticos objetivos son a menudo engorrosos, lentos y costosos. Por ejemplo, el principal procedimiento de diagnóstico de la diabetes de tipo 2 es la prueba de la glucosa en plasma en ayunas, que evalúa los niveles sanguíneos de azúcar en el plasma. Esta prueba requiere que el paciente esté en ayunas durante 8 - 14 horas, y a menudo requiere múltiples extracciones de sangre durante un periodo de entre horas y días. Además, aunque la prueba de la glucosa en plasma en ayunas es útil en el diagnóstico de la presencia de la diabetes de tipo 2, la prueba está muy limitada en su capacidad para proporcionar un pronóstico sobre la enfermedad.

20 En medicina hay una investigación constante de formas menos invasivas, menos agotadoras físicamente y más precisas para diagnosticar y tratar enfermedades o afecciones. Según se desarrolla una mayor comprensión de los procesos biológicos y de la bioquímica asociada con estos procesos, han evolucionado ciertas teorías sobre qué composiciones podrían ser identificadas como marcadores o indicadores de ciertas enfermedades o afecciones. Las proteasas y las peptidasas, como clase, han sido investigadas por su utilidad en el diagnóstico y como objetivos para el tratamiento de pacientes.

25 A modo de antecedentes generales, las proteasas / peptidasas se clasifican normalmente según varios criterios, tales como el sitio de acción, la preferencia por el sustrato y el mecanismo. Por ejemplo, las aminopeptidasas actúan preferentemente en los restos N-terminales de un polipéptido, las carboxipeptidasas actúan preferentemente en el C-terminal y las endopeptidasas actúan en sitios entre estos dos terminales.

30 Las peptidasas de dipeptidilo (DPP) son peptidasas que escinden específicamente unidades de dipéptido, es decir, una unidad de dos aminoácidos, a partir de sus sustratos específicos. Existen varias DPP diferentes, y la preferencia por el sustrato se expresa frecuentemente en términos de restos de aminoácidos inmediatamente N-terminales al sitio de escisión. Por ejemplo, la DPP-I (nomenclatura enzimática de la IUBMB EC.3.4.14.1) es una peptidasa lisosomal de tipo cisteína que libera un dipéptido N-terminal, Xaa-Yaa-|- zaa- excepto cuando Xaa es Arg o Lys, o Yaa o Zaa es Pro. La DPP-II (nomenclatura enzimática de la IUBMB EC.3.4.14.2) es una peptidasa lisosomal de tipo serina que libera un dipéptido N-terminal, Xaa-Yaa-|-, preferentemente cuando Yaa es Ala o Pro. La DPP-III (nomenclatura enzimática de la IUBMB EC.3.4.14.4) es una peptidasa citosólica que tiene una amplia actividad sobre péptidos, aunque es muy eficaz para Arg-Arg-Z, donde Z es cualquier aminoácido, a un pH de 9,2. La DPP-IV (nomenclatura enzimática de la IUBMB EC.3.4.14.4) es una peptidasa de tipo serina unida a la membrana que libera un dipéptido N-terminal a partir de Xaa-Yaa-|-zaa-, preferentemente cuando Yaa es Pro, siempre que Zaa no sea Pro ni hidroxiprolina.

40 Las DPP están implicadas en una amplia variedad de actividades fisiológicamente importantes, y se han relacionado con la regulación del sistema neurológico, del sistema endocrino, del sistema inmunitario y del sistema digestivo. Se ha demostrado la actividad de la DPP en numerosas funciones intracelulares y extracelulares, tales como la degradación de proteínas y la activación de enzimas.

45 Con respecto a las DPP específicas mencionadas previamente, la DPP-IV ha sido ampliamente estudiada, junto con sus correspondientes isoformas e isozimas u homólogos estructurales, y aquellas proteínas que muestran una actividad similar a la de la DPP-IV. Las proteínas que muestran una actividad similar a la de la DPP-IV se han denominado homólogos de actividad y/o estructurales de la dipeptidil peptidasa IV o "DASH". La DPP-IV es una proteína de membrana de tipo II que se conoce por muchos nombres, que incluyen, pero no se limitan a, DPP4, DP4, DAP-IV, proteína complejante de la desaminasa de adenosina FAP β 2, proteína de unión a la desaminasa de adenosina (ADAbp), aminodipeptidil peptidasa IV; aminopeptidasa de Xaa-Pro-dipeptidilo; naftilamidasa de Gly-Pro; aminodipeptidil peptidasa de postprolina IV; antígeno linfocitario CD26; glucoproteína GP110; peptidasa IV; aminopeptidasa de glicilprolina; aminopeptidasa de glicilprolina; aminodipeptidil peptidasa de X-prolilo; pep X; antígeno leucocitario CD26; aminodipeptidil peptidasa de glicilprolilo; hidrolasa de dipeptidilo-péptido; aminopeptidasa de glicilprolilo; aminodipeptidil peptidasa IV; DPP IV / CD26; aminodipeptidil peptidasa de amino acil-prolilo; molécula desencadenante de linfocitos T Tp103 ; X-PDAP (Burgess y col., Patente de EE.UU. N° 7.169.926).

Se han notificado varias proteínas DASH, tales como la seprasa, la proteína de activación de fibroblastos α , la DPP6, la DPP8, la DPP9, la atractina, las dipeptidasas ácidas *N*-acetiladas unidas por α I, II y

5 Según se usa en el presente documento, el término "enfermedad o afección relacionada con la DPP caracterizada por una enfermedad metabólica en particular" se refiere a aquellas enfermedades o afecciones que están caracterizadas por una diferencia en uno o más parámetros mensurables de la DPP. Las enfermedades o las afecciones relacionadas con la DPP no son necesariamente provocadas por un cambio en la DPP, pero pueden ser diagnosticadas o monitorizadas mediante la medición de uno o más parámetros de la DPP.

10 Las enfermedades metabólicas, según se usa el término en el presente documento, son trastornos del metabolismo e incluyen tanto enfermedades adquiridas como genéticas. Varias de ellas se describen en el Principes of Internal Medicine de Harrison. En general, las enfermedades metabólicas se dividen en tres clases principales, las enfermedades de almacenamiento de glucógeno (es decir, aquellas enfermedades que afectan al metabolismo de los carbohidratos, tales como la diabetes de tipo II), los trastornos en la oxidación de los ácidos grasos (es decir, aquellos trastornos que afectan al metabolismo de los componentes grasos, tales como la enfermedad de Fabry) y los trastornos mitocondriales (es decir, aquellos trastornos que afectan a las mitocondrias, tales como el síndrome de Leigh).

15 Algunos estados patológicos metabólicos que pueden ser detectados con la presente invención incluyen, pero no se limitan a: Diabetes de tipo II, Hipoglucemia, Hiperglucemia, enfermedad de Graves, síndrome de Cushing, Alcaptonuria, Albinismo, Histidinemia, Hiperomitinemia, enfermedad de Wilson, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Paget, de orina con olor a jarabe de arce o fenilcetonuria. En una forma de realización ejemplar, la DPP es la DPP-IV, y la enfermedad es la diabetes de tipo II.

20 Según se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier organismo vivo en necesidad de un diagnóstico, de un pronóstico, de una monitorización de la progresión de una enfermedad o de una evaluación del riesgo de un estado patológico o de una afección relacionada con la DPP, y en el que el paciente posee una actividad que también se ha demostrado que es dependiente de la actividad de la DPP-IV (Schon y col., Scand. J. Immunol. 29: 127 (1989)). Además, parece que la DPP-IV tiene una función estimulante conjunta durante la activación y la proliferación de los linfocitos T (von Bonin y col., Immunol. Rev. 161: 43 - 53 (1998)).

25 La DPP-IV está implicada en otros procesos biológicos, incluyendo una función de anclaje a la membrana para la localización de la enzima extracelular desaminasa de adenosina (ADA) (Franco y col., Immunol. Rev. 161: 27 - 42 (1998)) y de participación en la adhesión a la matriz celular mediante la unión al colágeno y a la fibronectina (Loster y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 217 (1): 341 - 348 (1995)).

30 También se cree que la DPP-IV juega un papel en la regulación endocrina y en la fisiología metabólica. Por ejemplo, la DPP-IV escinde el dipéptido amino-terminal de His-Ala del péptido glucagonoide 1 (GLP-1), generando un antagonista del receptor GLP-1, y acortando así la respuesta fisiológica al GLP-1. La DPP-IV se ha implicado en el control del metabolismo de la glucosa ya que sus sustratos incluyen las hormonas insulínotropas GLP-1 y el péptido inhibidor gástrico (GIP), que son inactivados mediante la eliminación de dos de sus aminoácidos N-terminales (Mannucci y col., Diabetologia 48: 1168 - 1172 (2005)).

35 Además de por su función fisiológica normal, las DPP se han estudiado por su papel en estados patológicos, incluyendo el cáncer, la enfermedad autoinmune, la enfermedad cardiovascular, la enfermedad metabólica y la enfermedad infecciosa.

40 Por ejemplo, se ha sugerido que la DPP-IV es una molécula de adhesión para las células de carcinoma de mama y de próstata con metástasis en pulmón (Johnson y col., J. Cell. Biol. 121: 1423 (1993)). Se ha encontrado una elevada actividad de la DPP-IV en homogeneizados tisulares procedentes de pacientes con hipertrofia prostática benigna y en prostatosomas (Vanhoof y col., Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 30: 333 (1992)).

45 Se han encontrado unos elevados niveles de expresión de la DPP-IV en células de fibroblastos cutáneos humanos procedentes de pacientes con las enfermedades autoinmunes psoriasis, artritis reumatoide (RA) y liquen plano (Raynaud y col., J. Cell. Physiol. 151: 378 (1992)).

50 La DPP-IV se ha relacionado con varias enfermedades metabólicas tales como la obesidad y la regulación del apetito. Por ejemplo, una de las enfermedades metabólicas más ampliamente estudiadas relacionadas con la DPP-IV es la diabetes de tipo 2. Mannucci y col. definen y describen las relaciones entre la hipoglucemia crónica y la DPP-IV en la diabetes. Esta investigación concluye que la actividad de la DPP-IV en circulación se correlaciona directamente con el grado de hiperglucemia en la diabetes de tipo II.

55 Otros estudios analizan la relación entre la DPP-IV y varias hormonas implicadas en la cascada hormonal que regulan los niveles de azúcar en sangre. Estos estudios concluyen que la DPP-IV degrada una hormona que es importante para la secreción de insulina. Específicamente, se ha sugerido que la DPP-IV degrada el péptido glucagonoide 1 (GLP-1), lo que da como resultado una disminución de la secreción de insulina y por lo tanto un aumento en el azúcar sanguíneo. Tomando como base este fenómeno, se están desarrollando inhibidores de la DPP-IV para el tratamiento de la diabetes de tipo II (Green y col., Diab. Vasc. Dis. Res. 3 (3): 159 - 165 (2006)).

La DPP-IV es aparentemente esencial para la penetración y la infectividad de los virus VIH-1 y VIH-2 en los linfocitos T CD4⁺ (Wakselman y col., J. Dermatol. Sci. 22: 152 - 160 (2000)). Por lo tanto, hay algunas sugerencias de que la supresión de la DPP- IV podría suprimir asimismo este mecanismo.

5 Recientemente, algunas vías de investigación sobre la DPP se han centrado en la manipulación de los niveles de DPP como un medio para el desarrollo de tratamientos y de terapias para los estados patológicos y las afecciones relacionados con la DPP. Sin embargo, hasta la fecha se han conseguido pocos tratamientos y terapias a partir de estos trabajos.

Sumario de la invención

10 Todavía se desea al desarrollo de terapias y de herramientas diagnósticas que estén basadas en la DPP y en su papel en los procesos biológicos. Una forma de realización de la invención descrita en el presente documento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico o el pronóstico de la enfermedad metabólica de la diabetes de tipo II, que comprende:

15 la medición de al menos un parámetro de una o más porciones discriminadas parcial o completamente separadas o aisladas de una o más isoformas de la dipeptidil peptidasa (DPP) IV (DPPIV) a partir de la muestra de un paciente, en la que el al menos un parámetro es la cantidad, la concentración, la actividad, la expresión o el tipo o la cantidad de modificaciones post-traduccionales de más de una isoforma de la DPPIV; y la correlación de dicho parámetro medido de la DPP de la más de una isoforma de la DPPIV con la presencia, la ausencia o la gravedad de dicho estado patológico o afección.

20 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico o el pronóstico de la diabetes de tipo II. Específicamente, se mide al menos un parámetro de una o más porciones discriminadas de isoformas de la DPPIV a partir de la muestra de un paciente, y se correlaciona la medición con la presencia, la ausencia o la gravedad de la diabetes de tipo II.

Breve descripción de los dibujos

25 La Fig. 1 representa el flujo de trabajo de una separación mediante electroforesis de flujo libre de las isoformas. Las Figs. 2 A y B son gráficas que muestran los resultados de un ensayo de actividad de la DPP-IV porcina después de un IEF-FFE nativo. La Fig. 2B muestra la actividad específica (U/ng de enzima) de las isoformas porcinas discriminadas de la DPP-IV.

La Fig. 3 es un IEF en gel de acrilamida teñido con plata de las fracciones 27 a 47 de una separación mediante una FFE nativa (pH de 3 - 10) de la DPP-IV porcina.

30 Las Figs. 4 A y B muestran el análisis de la huella de la masa peptídica de las bandas proteicas tripsinizadas escindidas mediante un gel de IEF para las isoformas más ácidas (4 A) y ligeramente más básicas (4 B). El análisis de la PMF identifica todas las isoformas como la DPP-IV.

Las Figs. 5 A y B muestran la confirmación de los picos seleccionados de la DPP-IV con MALDI TOF / TOF.

35 Las Figs. 6 A y B muestran la actividad de la DPP-IV de las isoformas discriminadas mediante FFE de la DPP-IV procedentes de plasma humano en dos sujetos sanos.

La Fig. 7 muestra el perfil de actividad de la DPP-IV de las isoformas discriminadas mediante FFE procedentes de un sujeto humano normal.

La Fig. 8 muestra el perfil de actividad de la DPP-IV de las isoformas discriminadas mediante FFE procedentes de un sujeto humano diabético con un nivel de glucosa de 538 mg/dl.

40 La Fig. 9 muestra un ejemplo del cambio en el perfil de la DPP-IV resultante de la desialilación de las isoformas discriminadas mediante FFE procedentes de un paciente humano sano. La actividad está representada en RFU/min. Las barras oscuras representan la muestra tratada; las barras rayadas representan la muestra no tratada.

45 La Fig. 10 muestra la comparación de la actividad de la DPP-IV entre el pl de las isoformas discriminadas de la DPP-IV en plasma procedente de un paciente sano (barras claras) y de uno diabético (barras oscuras), así como las isoformas desialiladas procedentes de un paciente diabético (línea oscura). La línea discontinua representa el pH al que se discriminó cada porción.

50 La Fig. 11 es una representación cortada del pH frente a la actividad de la DPP-IV del pl de las isoformas discriminadas de la DPP de pacientes sanos y diabéticos. Los S04, S11, S07 y S02 están sanos; el resto son diabéticos.

La Fig. 12 es una representación del pH al cual el pl de las isoformas discriminadas de la DPP-IV procedentes de cada sujeto alcanza una actividad del 90 % de la DPP-IV. Los S04, S11, S07 y S02 están sanos; el resto son diabéticos.

55 La Fig. 13 es una representación del pH al cual el pl de las isoformas discriminadas de la DPP-IV procedentes de cada sujeto alcanza una actividad del 60 % de la DPP-IV. Los S04, S11, S07 y S02 están sanos; el resto son diabéticos.

La Fig. 14 es una gráfica que representa las diversas formas en las que los parámetros medidos de las isoformas discriminadas de la DPP pueden ser correlacionados con una enfermedad.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

5 Los procedimientos descritos en el presente documento permiten la evaluación del riesgo, el diagnóstico o el pronóstico o de un estado patológico o de una afección relacionada con la dipeptidil peptidasa (DPP) caracterizados por una enfermedad metabólica en particular. En particular, los procedimientos descritos se relacionan con un procedimiento de evaluación del riesgo, de diagnóstico o de pronóstico de un estado patológico o de una afección relacionada con un parámetro en particular de la DPP. De acuerdo con las formas de realización del procedimiento descrito, se mide un parámetro de una porción discriminada de una DPP. Después se correlaciona la medición con la presencia, la ausencia o la gravedad de dicho estado patológico o afección.

10 Para los propósitos de esta solicitud, los términos "proteasa" y "peptidasa" se usan de forma intercambiable y se refieren a las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de amida. Las peptidasas de dipeptidilo (DPP) son proteasas que escinden una unidad de dipéptido a partir de un polipéptido.

15 Según se usa en el presente documento, el término "porciones discriminadas de una DPP específica" se refiere a una DPP específica (por ejemplo, a una o más isoformas de una familia específica de DPP, por ejemplo, la DPP-I, la DPP-II, la DPP-III, la DPP-IV, etc.) procedentes de una muestra de un paciente que se han distinguido, separado o aislado entre sí de alguna forma.

20 En una forma de realización, la DPP específica se somete a alguna condición que distinguirá al menos una isoforma de la DPP específica de al menos otra isoforma de la DPP. Cada porción discriminada puede contener una o más isoformas de la DPP de la DPP específica, y algunas porciones pueden no contener ninguna isoforma de la DPP. En otra forma de realización, la DPP (que puede incluir una DPP de una familia o de más de una familia) se somete a alguna condición que distinguirá al menos una isoforma de la DPP de al menos otra isoforma de la DPP.

25 Específicamente, las isoformas individuales de la DPP pueden ser discriminadas completamente o solo parcialmente en porciones, y entre sí. Por lo tanto, una porción discriminada puede contener una o más isoformas, o cada porción discriminada puede contener únicamente una isoforma. Asimismo, una porción discriminada puede contener una isoforma, mientras que otras porciones discriminadas contienen más de una isoforma. Adicionalmente, algunas porciones discriminadas pueden no contener ninguna isoforma de la DPP siempre que una o más de las otras porciones contengan una o más isoformas de la DPP.

La DPP específica puede ser un miembro de cualquier DPP específica o de la familia DASH, incluyendo la DPP-I, la DPP-II, la DPP-III o la DPP-IV. En algunas formas de realización ejemplares, la DPP es la DPP-IV. La DPP que no está designada como específica incluye tanto la DPP específica como la no específica.

30 Según se usa en el presente documento, el término "isoforma" de una DPP se refiere a cualquiera de las múltiples formas de una o más enzimas DPP que difieran en alguna forma física, pero que todas tienen una actividad catalítica característica en común, una estructura primaria / secuencia de aminoácidos homóloga o derivan de los mismos *loci* genéticos. La actividad catalítica de las isoformas de la DPP no tiene por qué ser idéntica en su grado o índice de catálisis, únicamente en un perfil de sustrato común. Asimismo, la estructura primaria de las isoformas no tiene por qué ser idéntica, pero puede ser el resultado de adiciones, deleciones o mutaciones menores en la secuencia de aminoácidos de la enzima.

35 Las isoformas pueden tener una estructura primaria similar o igual, y pueden tener la misma actividad catalítica o distintas actividades catalíticas. La estructura primaria de las isoformas puede diferir significativamente siempre que conserve la misma actividad catalítica. Las isoformas pueden tener una estructura secundaria, una estructura terciaria y/o una estructura cuaternaria igual o diferente, pero ser todavía isoformas entre sí siempre que conserven una estructura primaria y/o una actividad enzimática igual o similar y/o deriven de los mismos *loci* genéticos.

40 Las isoformas pueden derivar del mismo *locus* genético o de diferentes *loci* genéticos. Pueden ser el resultado de diferentes alelos; de múltiples *loci* genéticos; de un ajuste alternativo del ARN mensajero producido a partir del mismo gen; o ser el resultado de una modificación post-traducciona, tal como la adición de un polisacárido, de un grupo fosfato, de un sulfhidrilo, de ácido siálico o de otros grupos.

45 Las "isoformas", cuando se usan en el presente documento, también incluyen isozimas. Según se usa en el presente documento, el término "isozima" (como alternativa, isoenzima), es un tipo de isoforma que se refiere a cualquiera de las múltiples formas de una enzima que surjan de una diferencia determinada genéticamente en la estructura primaria / en la secuencia de aminoácidos.

50 Cualquier grupo de enzimas que comparten la misma actividad catalítica, *loci* genéticos o estructura primaria, son isoformas entre sí. Se conocen múltiples isoformas de la DPP. Por ejemplo, la DPP-I existe en al menos 2 isoformas derivadas de variantes que codifican para transcritos a partir del mismo gen (Entrez Gene GeneID: 1075). Asimismo, se han notificado múltiples isoformas para la DPP-II (DiCarlantonio y col., Gamete Res. 15 (2): 161 175 (2005)), para la DPP-III (Mazzocco y col., FEBS Journal 273 (5): 1056 1064 (2006)) y para la DPP-IV (Schmauser y col., Glycobiol. 9 (12): 1295 1305 (1999)).

Por ejemplo, cualquier enzima que escinde los enlaces de dipéptidos post-prolina es una isoforma de la DPP. El

experto en la materia es fácilmente consciente de las muchas isoformas de la DPP. No todas las isoformas están identificadas en el presente documento. A modo de ilustración, y no de limitación, algunas isoformas de la DPP-IV incluyen, pero no se limitan a, la DPP-IV; las diversas formas sialadas de la DPP-IV; la DPP-IV unida a la membrana; la DPP-IV soluble; y cualquiera de los homólogos de actividad y/o de estructura de la dipeptidil peptidasa IV (DASH), tales como la seprasa, la proteína de activación de fibroblastos α , la DPP6, la DPP8, la DPP9, la atractina, las dipeptidasas ácidas *N*-acetiladas unidas por α I, II y L, la dipeptidasa de prolina de células quiescentes, la proteasa de serina específica de timo y la DPP IV- β .

Los parámetros de la DPP que pueden medirse incluyen la cantidad, la concentración, la actividad, la expresión o la cantidad o el tipo de modificación post-traducciona.

10 La "cantidad" de DPP incluye la presencia, la ausencia o la cantidad de DPP. La "actividad" de la DPP incluye la presencia, la ausencia, la cantidad, el grado o la velocidad de la actividad enzimática, incluyendo la actividad específica. La "expresión" de la DPP incluye la presencia, la ausencia, la velocidad o la cantidad de la expresión de la DPP. La "concentración" de la DPP es la cantidad de la isoforma de la DPP por unidad de volumen presente en una porción.

15 El parámetro de la DPP puede ser medido directa o indirectamente, y puede ser cualitativo o cuantitativo.

La actividad de la DPP puede medirse mediante el uso de cualquier ensayo que pueda medir cuantitativamente o cualitativamente la actividad de la DPP. Algunos ensayos adecuados para la medición de la actividad de la DPP incluyen los ensayos que detectan la presencia o la cantidad de un producto de la actividad de hidrólisis de la DPP sobre un sustrato marcado de forma detectable. El marcaje puede ser detectable directa o indirectamente, y puede ser fluorogénico, quimioluminiscente, colorimétrico o radioactivo. Algunos marcajes fluorogénicos incluyen 7-amino-4-metilcumarina (AMC) y 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC).

Como comprenderá los expertos en la materia, el modo de detección de la señal dependerá del sistema de detección exacto utilizado en el ensayo. El sistema de detección puede detectar cambios en la masa, cambios en la secuencia de aminoácidos o en la longitud del péptido, cambios cromogénicos o cambios fluorogénicos. El procedimiento de detección puede emplear unos esquemas de detección secundaria que incluyan reacciones enzimáticas secundarias que den como resultado el cambio detectable, de entre una gran diversidad de los esquemas de detección descritos en la materia.

Por ejemplo, si se utiliza un reactivo de detección radiomarcado, la señal se medirá mediante el uso de una tecnología capaz de cuantificar la señal procedente de la muestra biológica o de comparar la señal de la muestra biológica con la señal procedente de una muestra de referencia, tal como un recuento de centelleo, una autorradiografía (normalmente combinada con una densitometría de barrido), y similares. Si se usa un sistema de detección quimioluminiscente, entonces la señal se detectará normalmente mediante el uso de un luminómetro. Si se usa un sistema de detección fluorescente, la fluorescencia puede medirse mediante el uso de un espectrofluorómetro. Los procedimientos para la detección de la señal procedente de los sistemas de detección son bien conocidos en la materia.

En algunas formas de realización, la actividad de la DPP se mide a través de un ensayo que detecta la presencia o la cantidad de un producto de la actividad de hidrólisis de la DPP sobre un sustrato marcado de forma detectable. La actividad de la DPP-IV puede medirse mediante el uso de un ensayo que detecta la hidrólisis de cualquier sustrato marcado de forma detectable que sería catalizada por la DPP-IV, es decir, X-Y-R, en el que X es cualquier aminoácido; Y es Pro (Prolina), Ala (Alanina) o Arg (Arginina); y R cualquier marcador detectable directa o indirectamente.

La cantidad de DPP puede medirse mediante el uso de cualquier ensayo que pueda medir cuantitativamente o cualitativamente la cantidad de una o más isoformas de la DPP. Algunos ensayos adecuados para la medición de la cantidad de DPP incluyen, pero no se limitan a, un análisis por inmunotransferencia western, una espectrofotometría de la proteína, un radioinmunoensayo, ensayos de unión competitiva y ensayos de ELISA. A este respecto, los anticuerpos que son específicos para una o más isoformas de la DPP son particularmente útiles.

La concentración de la DPP puede medirse mediante el uso de cualquier ensayo que pueda medir cuantitativamente o cualitativamente la concentración de una o más isoformas de la DPP. Algunos ensayos adecuados para la medición de la concentración de la DPP incluyen un análisis por inmunotransferencia western, una espectrofotometría de la proteína, un radioinmunoensayo, ensayos de unión competitiva y ensayos de ELISA. A este respecto, los anticuerpos que son específicos para una o más isoformas de la DPP son particularmente útiles.

La expresión de la DPP puede medirse mediante el uso de cualquier ensayo que pueda medir cuantitativamente o cualitativamente la expresión de una o más isoformas de la DPP. Algunos ensayos adecuados para la medición de la expresión de la DPP generalmente detectan el ARNm o la proteína DPP, e incluyen análisis por inmunotransferencia northern y análisis por inmunotransferencia western o variaciones de los mismos (por ejemplo, análisis por inmunotransferencia Far Western, chips en micromatriz).

El tipo o el grado de modificación post-traducciona puede medirse mediante el uso de cualquier ensayo que pueda

medir cuantitativamente o cualitativamente la modificación de una o más isoformas de la DPP. Algunos ensayos adecuados para la medición del tipo o del grado de modificación post-traducciona incluyen la unión a lectina, un análisis por inmunotransferencia western, una espectrofotometría de la proteína, un radioinmunoensayo, ensayos de unión competitiva y ensayos de ELISA.

- 5 Pueden medirse uno o más parámetros. Por ejemplo, puede medirse un único parámetro (por ejemplo, la cantidad, la concentración, la actividad, la expresión, la cantidad o el tipo de modificación post-traducciona). Alternativamente, pueden medirse dos o más parámetros, por ejemplo, pueden medirse tanto la cantidad como la concentración, la cantidad y la actividad, la cantidad y la expresión, la concentración y la actividad, la concentración y la expresión o la actividad y la expresión. Asimismo, puede medirse la cantidad, la actividad y la expresión; la cantidad, la concentración y la expresión; o la concentración, la actividad y la expresión.

10 Si se realizan dos o más mediciones, pueden realizarse a la vez o consecutivamente. Por ejemplo, puede medirse la cantidad al mismo tiempo que la actividad. Alternativamente, puede medirse la cantidad antes o después que la actividad. Si se realizan tres o más mediciones, también pueden realizarse consecutivamente o a la vez. Por ejemplo, puede medirse la cantidad antes que el tipo y la actividad de modificación post-traducciona, en la que el tipo y la actividad de modificación post-traducciona se miden a la vez, o la cantidad, el tipo y la actividad de modificación post-traducciona se miden a la vez o consecutivamente entre sí. Asimismo, si se realizan más mediciones, pueden realizarse a la vez o consecutivamente entre sí, o agruparse de todas las formas posibles, de forma que cada grupo se realice a la vez o consecutivamente con respecto a cada uno de los otros grupos. En otras palabras, cada una de las mediciones puede agruparse de una forma factorial o distributiva, y cada grupo puede medirse, con respecto a todos los demás grupos, tanto consecutivamente como a la vez.

Además de las múltiples mediciones, cualquier medición dada, tanto de uno como de más parámetros, puede realizarse más de una vez, es decir, repetirse, para cualquier muestra dada de un paciente.

Adicionalmente, puede realizarse cualquier combinación de mediciones con respecto a las porciones. Por ejemplo, puede medirse un único parámetro para una, para algunas o para todas las porciones. Asimismo, puede medirse más de un parámetro para una, para algunas o para todas las porciones. Puede medirse un único parámetro para una o para algunas porciones, mientras que se mide otro parámetro para las demás o para todas las porciones. Por ejemplo, puede medirse la cantidad únicamente para una porción, mientras que puede medirse la actividad de todas las porciones. Asimismo, puede medirse la actividad únicamente de una porción, mientras que puede medirse la cantidad de todas las porciones.

30 Cuando se miden uno o más parámetros de la DPP, la muestra del paciente puede dividirse en varias alícuotas, usándose las alícuotas separadas para la medición de diferentes parámetros de la DPP o para llevar a cabo mediciones repetidas. Adicionalmente o como alternativa, cada una de las porciones discriminadas de la DPP puede dividirse en varias alícuotas para la medición de diferentes parámetros de la DPP o para mediciones repetidas. Las mediciones repetidas no son necesarias en los procedimientos de la invención, pero muchas formas de realización de la invención utilizarán ensayos repetidos, particularmente ensayos por duplicado y por triplicado.

Alternativamente, la muestra del paciente o una alícuota de la misma puede ensayarse para determinar los niveles de múltiples parámetros de la DPP en una única reacción mediante el uso de un ensayo capaz de medir los niveles individuales de diferentes parámetros de la DPP en un único ensayo, tal como un ensayo de tipo matriz o un ensayo que utiliza la tecnología de detección multiplexada (por ejemplo, un ensayo que utiliza reactivos de detección marcados con diferentes marcadores colorantes fluorescentes).

Según se usa en el presente documento, la "enfermedad metabólica de la diabetes de tipo II" está caracterizada por una diferencia en uno o más parámetros mensurables en particular de la DPP (no necesariamente provocada por un cambio en la DPP, pero puede ser diagnosticada o monitorizada mediante la medición de uno o más parámetros de la DPP).

45 Según se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier organismo vivo en necesidad de un diagnóstico, de un pronóstico, de una monitorización de la progresión de una enfermedad o de una evaluación del riesgo o de un estado patológico o de una afección de diabetes de tipo II, y en el que el paciente posee

Algunos cánceres que pueden ser detectados con la presente invención incluyen, pero no se limitan a: tumores sólidos primarios y metastásicos y carcinomas de mama; de colon; de recto; de pulmón; de orofaringe; de hipofaringe; de esófago; de estómago; de páncreas; de hígado; de vesícula biliar; de los conductos biliares; del intestino delgado; del tracto urinario, incluyendo de riñón, de vejiga y de urotelio; del tracto genital femenino incluyendo de cuello de útero, de útero, de ovarios, coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional; del tracto genital masculino incluyendo de próstata, de la vesícula seminal, de testículos y tumores de células germinales; de las glándulas endocrinas, incluyendo de tiroides, adrenal y de pituitaria; de la piel, incluyendo hemangiomas, melanomas, sarcomas procedentes del hueso o de los tejidos blandos, y sarcoma de Kaposi; tumores del cerebro, de los nervios, de los ojos y de las meninges incluyendo astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas y meningiomas; tumores sólidos procedentes de neoplasias hematopoyéticas tales como leucemias, e incluyendo cloromas, plasmacitomas, placas y tumores de micosis

fungoides y linfoma cutáneo de los linfocitos T / leucemia; linfomas incluyendo tanto de Hodgkin como no Hodgkin.

Las infecciones víricas que pueden ser detectadas con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas infecciones causadas por familias víricas que son patógenas para los seres humanos y para otros animales, tales como: Adenoviridae, Birnaviridae, Bunyaviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Reoviridae, Retroviridae (por ejemplo, VIH), Rhaboviridae o Togaviridae. En ciertas formas de realización, la DPP es la DPP-IV, y la enfermedad vírica es el VIH.

Según se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier organismo vivo en necesidad de un diagnóstico, de un pronóstico, de una monitorización de la progresión de una enfermedad o de una evaluación del riesgo de un estado patológico o de una afección relacionada con la DPP, y en el que el paciente posee la fisiología relacionada con la expresión de la DPP. Dichos pacientes incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates superiores, otros mamíferos (por ejemplo, animales domésticos tales como gatos, perros y caballos, roedores tales como ratas y ratones, y animales salvajes tales como leones, tigres y osos), aves (por ejemplo, pollos, periquitos) y otros animales.

Según se usa en el presente documento, el término "muestra de un paciente" o "muestras biológicas" se refiere a cualquier muestra tomada a partir de, o procedente de, un paciente que podría esperarse que contuviera la enzima objetivo, e incluye tanto muestras celulares como acelulares. Algunas muestras de un paciente incluyen, pero no se limitan a, tejidos, tales como tejido muscular, hepático, pulmonar, esplénico, adiposo, mamario y tumoral; sangre y productos sanguíneos, tales como sangre completa, plasma, suero y células sanguíneas; y otros fluidos biológicos, tales como orina, saliva, lágrimas, mucus, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido de la articulación sinovial y líquido seminal. Las muestras de pacientes también pueden contener una combinación de fluidos y/o de tejidos.

Las muestras pueden obtenerse a partir de un paciente mediante cualquier procedimiento clínicamente aceptable tal como venopunción, punción lumbar, amniocentesis y biopsia tisular.

Aunque las muestras pueden ser usadas directamente según se obtienen a partir del paciente, un aspecto de la invención contempla el procesado de las muestras antes de la discriminación de la DPP en porciones (por ejemplo, la discriminación de las isoformas de la DPP en porciones) o de la medición del parámetro de la DPP. El procesado incluye, pero no se limita a, una homogeneización, una dilución, una concentración, una aplicación de ultrasonidos, una congelación, una mezcla con un conservante u otro agente, o combinaciones de los mismos.

Adicionalmente, pueden procesarse las muestras que contienen células u otros tejidos en los que podría esperarse que la DPP estuviera unida a la membrana, de forma que se libere la DPP de la membrana celular, permitiendo así su utilización en cualquiera de los procedimientos reconocidos en la técnica para la separación / el aislamiento de las proteínas / enzimas a partir de una muestra. Algunos procedimientos para la liberación de las proteínas unidas a la membrana son bien conocidos en la materia e incluyen congelación / descongelación, homogeneización, aplicación de ultrasonidos y liberación química o enzimática de la enzima activa partir de la membrana.

En algunos ejemplos, la muestra del paciente se recoge en un recipiente que comprende EDTA, inhibidores de la proteasa o algún otro componente adecuado para el transporte, la conservación y el tratamiento de una muestra biológica.

Cuando la muestra del paciente constituye un fluido, el procesado puede incluir una forma para la eliminación de las células nucleadas y/o no nucleadas, tales como eritrocitos, leucocitos y plaquetas en muestras sanguíneas (por ejemplo, con objeto de obtener el plasma), o también puede incluir la eliminación de ciertas proteínas, tales como ciertas proteínas de la cascada de la coagulación de la sangre (por ejemplo, con objeto de obtener el suero). Por ejemplo, la sangre puede ser recogida en un recipiente con heparina, con citrato o con inhibidores de la proteasa, o ponerse en contacto con heparina, con citrato o con inhibidores de la proteasa tras su recolección.

Un procesado adicional puede incluir la concentración o la dilución de la muestra de forma que, por ejemplo, se normalice el contenido proteico total antes de la discriminación o de la medición. Los protocolos para llevar a cabo estas actividades son bien conocidos en la materia.

Después de que se haya realizado la correlación entre la medición del parámetro de la DPP con el estado patológico o la afección, el resultado puede ser comunicado a un operador. El resultado incluye la presencia, la ausencia o la gravedad de un estado patológico o de una afección.

Un "operador" puede ser un médico, una enfermera, un médico asistente, un técnico médico, un técnico de laboratorio o cualquiera que maneje una máquina o un aparato que lleve a cabo una o más etapas de la invención, o cualquiera que pueda recibir la información sobre el diagnóstico o el pronóstico, incluyendo el paciente. Por ejemplo, la información sobre el diagnóstico o el pronóstico puede ser comunicada de forma automática al paciente o al representante del paciente a través de un facsímil, por teléfono, mediante un mensaje de texto o un correo electrónico.

Puede usarse cualquier medio para transmitir el resultado, e incluyen, pero no se limitan a, mostrar el estado

patológico en un medio tal como una pantalla electrónica, una pantalla digital o un sustrato imprimible; efectuar una señal audible, tal como un zumbido, una campana, una voz generada electrónicamente o una voz grabada; por teléfono, mediante un mensaje de texto, un correo electrónico o un facsímil.

5 Las isoformas de la DPP pueden ser parcialmente o completamente discriminadas en porciones de la DPP antes de, o simultáneamente con, la medición de cualquier parámetro de la DPP. Por ejemplo, asumiendo que hay más de dos tipos de isoformas de la DPP presentes en una muestra, las isoformas pueden ser discriminadas en solo dos porciones, incluyendo cada una, más de un tipo de isoforma (es decir, discriminadas parcialmente); o las isoformas pueden ser discriminadas en porciones en las que cada porción solo contiene un tipo de isoforma (es decir, discriminadas completamente). Asimismo, las isoformas pueden ser discriminadas parcialmente en dos o más porciones, conteniendo una porción solo un tipo de isoforma, y conteniendo las otras porciones más de un tipo de isoforma.

Las porciones de la DPP pueden ser discriminadas mediante cualquier medio, incluyendo una separación o un aislamiento físico u otros procedimientos para identificar o distinguir las isoformas entre sí.

15 Por ejemplo, la discriminación puede basarse en las diferencias en las propiedades bioquímicas, tales como la movilidad electroférica o el punto isoeléctrico (pI); la estabilidad térmica; el peso molecular; la secuencia de aminoácidos, en el caso de isoformas que difieren en la estructura primaria; la afinidad o avidez por un anticuerpo; la magnitud o el tipo de modificaciones post-traduccionales; y las propiedades cinéticas, tales como la K_m o la constante de velocidad.

20 Pueden usarse anticuerpos o lectinas específicos para las diferentes isoformas de la DPP para separar físicamente las porciones de la DPP o para distinguir las porciones sin una separación física. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para cada diferente isoforma de la DPP pueden portar un marcador detectable diferente, lo que no requiere una separación física para discriminar entre las porciones. Alternativamente, dos anticuerpos pueden usarse sobre un soporte o una columna para separar físicamente las diferentes isoformas de la DPP en porciones.

25 Algunos procedimientos de separación incluyen isoelectroenfoque, que separa según el pI; procedimientos electroforéticos, ya sea en matriz, tales como un gel o un filtro, o exentos de gel, que pueden distinguir según la carga eléctrica y/o el peso molecular; el grado de unión a la lectina o la variedad de lectinas que tienen afinidad por las isoformas; la unión a un anticuerpo; y procedimientos de discriminación mediante cromatografía de afinidad o de exclusión por tamaños.

30 Según se usa en el presente documento, el término "punto isoeléctrico" (pI) es el pH al cual una molécula no porta una carga eléctrica neta. El pI también se denomina pH isoeléctrico. Por lo tanto, para los fines de esta solicitud, el término "pI" y "pH isoeléctrico" se usan de forma intercambiable. En una forma de realización ejemplar, las porciones de la DPP son discriminadas según el pI, y la DPP específica es la DPP-IV.

35 Algunos procedimientos de isoelectroenfoque incluyen electroforesis de flujo libre, electroforesis de isoelectroenfoque, o cromatoenfoque u otra separación en fase sólida facilitada por el flujo de un sistema tamponante cuyo pH cambia con el tiempo a través de la fase sólida.

En la electroforesis para isoelectroenfoque se inyecta o administra directamente una muestra de interés en un bloque de gel, en un filtro o en otro medio que contiene un gradiente de pH inmovilizado

40 El gradiente de pH corre paralelo a la dirección del campo eléctrico, y la(s) proteína(s) de la muestra se separa(n) entre sí migrando en una dirección a través de los diferentes entornos de pH antes de alcanzar el entorno de pH que es equivalente a su pI.

45 Una vez que la proteína ha alcanzado su pI, permanecerá inmóvil en el material de matriz. En este punto puede obtenerse una muestra partir del material de matriz y utilizarse en análisis adicionales, tales como una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Zuo y col., Analytical Biochem. 284: 266 - 278 (2000)), una separación de segunda dimensión en un chip plano, (Becker y col., J. Micromech. Microeng. 8: 24 28 (1998)), un ensayo para la detección de la actividad enzimática tal como una fluorimetría, o un ensayo adecuado para la medición de cualquiera de los parámetros de la DPP.

50 La electroforesis de flujo libre es un procedimiento de electroforesis que no usa ninguna matriz sólida, tal como el gel de acrilamida de las electroforesis tradicionales, o la separación de fases usada en cromatografía. En su lugar, los analitos se separan de acuerdo con su carga y/o su movilidad electroforética en un flujo laminar continuo o en una solución tampón con un campo eléctrico aplicado perpendicular a la dirección de flujo.

55 Un ejemplo de una máquina que realiza una electroforesis de flujo libre es el sistema de electroforesis de flujo libre BD™ (Becton Dickenson modelo #441117). Mediante la utilización de este sistema se recogen las muestras discriminadas en 96 capilares al final de la cámara de separación, lo que permite que el fraccionamiento continuo fluya hacia un divisor de recolección en el que el flujo de salida permanece separado físicamente en una pluralidad de fracciones. Este procedimiento es adecuado para la separación de muestras a través de al menos tres principios de separación: isoelectroenfoque (IEF), electroforesis de zona (ZE) e isotacoforesis (ITP). Una vez recogidas, las

fracciones pueden ser analizadas adicionalmente a través de cualquiera de los ensayos descritos para su uso después del isoelectroenfoque, es decir, una SDS-PAGE, a separación de segunda dimensión en un chip plano y ensayos de la actividad enzimática.

5 La discriminación y la medición no están limitadas a ningún orden en particular. La discriminación puede tener lugar antes o después de la medición del parámetro, o junto con la medición. Por ejemplo, la DPP específica puede ser separada físicamente en porciones mediante el uso de un procedimiento tal como una electroforesis, y después pueden medirse uno o más parámetros de algunas o de todas las porciones.

10 Alternativamente, cuando la medición y la discriminación se realizan a la vez, la DPP específica puede ser discriminada en porciones, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra del paciente con anticuerpos específicos para las diferentes isoformas de la DPP, estando unido cada uno de los anticuerpos a un marcador detectable diferente, mientras que se miden las señales de cada marcador detectable.

15 En otra forma de realización, las porciones o las isoformas pueden ser discriminadas mediante el uso de un sistema de detección doble. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto las isoformas de la DPP con un anticuerpo unido a una fase sólida que se une a todas o a la mayoría de las isoformas de la DPP y uno o más anticuerpos o lectinas específicos para una porción más pequeña de las isoformas de la DPP. Cada uno de los anticuerpos o lectinas más específicos contienen un marcador detectable único. Las isoformas pueden ponerse en contacto con ambos anticuerpos, o con el anticuerpo y las lectinas simultáneamente o en cualquier serie, por ejemplo, ponerse en contacto con el anticuerpo unido y después con el anticuerpo / lectina más específico, o con el anticuerpo / lectina más específico y después con el anticuerpo unido.

20 Las DPP pueden ser discriminadas en dos o más porciones. El número de porciones depende del grado de discriminación deseado, y del procedimiento de discriminación realizado. No hay ninguna limitación sobre el número de porciones en las que pueden discriminarse las DPP, pero, por ejemplo, las DPP pueden discriminarse en 2 o más porciones, tal como en 2, en 3, en 4, en 5, en 6, en 7, en 8, en 9, en 10, en 11, en 12, en 18, en 24, en 36, en 48, en 96, en 100, en 200, en 300, en 384, en 400, en 500 o en 1.536 porciones. Por ejemplo, en algunas formas de
25 realización, es conveniente discriminar las isoformas de la DPP en, por ejemplo, 96 porciones, para permitir la manipulación y la medición del parámetro en placas estándar de 96 pocillos.

30 Para una completa discriminación de las isoformas, cada porción de DPP no debería contener más de una isoforma de la DPP, y algunas porciones pueden no contener ninguna isoforma de la DPP. Para una discriminación parcial de las isoformas, al menos una porción de las DPP debería contener más de una isoforma de la DPP, mientras que otras porciones pueden no contener ninguna isoforma de la DPP, una isoforma de la DPP, o más de una isoforma de la DPP.

35 En ciertas formas de realización de la invención, las muestras de pacientes se obtienen a partir de un individuo en más de un punto temporal. Dicha toma de muestras "en serie" es muy adecuada para la determinación de la aparición temprana de las típicas anomalías médicas, y facilita por tanto unas estrategias terapéuticas de remedio más tempranas que podrían dar lugar a un tratamiento más eficaz de la enfermedad o incluso a la evitación de la enfermedad. Dicha toma de muestras en serie también es muy adecuada para los aspectos de la invención relacionados con la monitorización de la progresión de una enfermedad, por ejemplo, de la diabetes de tipo II, en un paciente. Esto es especialmente útil para la evaluación de la eficacia de cualquier tratamiento que pueda estar
40 siguiendo el paciente en relación con la enfermedad. La toma de muestras en serie o la toma de muestras repetida también puede ser útil para la determinación del riesgo individual de desarrollar la enfermedad o la afección.

45 La toma de muestras en serie puede ser llevada a cabo con cualquier cronología deseada, tal como cada hora, dos veces al día, una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes, una vez al trimestre (es decir, cada tres meses), dos veces al año, una vez al año, una vez cada dos años o menos frecuentemente. La comparación entre los niveles medidos y el nivel de referencia puede llevarse a cabo cada vez que se mide una muestra nueva, o pueden conservarse los datos relativos a los niveles para un análisis menos frecuente.

La medición o la discriminación tiene lugar preferiblemente *ex vivo* o *in vitro*. En una forma de realización, tanto la medición como la discriminación tienen lugar *ex vivo*.

50 Como apreciará el experto en la materia, los procedimientos divulgados en el presente documento pueden incluir la medición de cualquiera de una diversidad de parámetros de la DPP o que no son de la DPP (que pueden ser o no parámetros relacionados con la enfermedad) para determinar la integridad y/o las características de la muestra del paciente. Por ejemplo, pueden medirse los niveles de estrógenos, que generalmente son mayores en las hembras, como un marcador de género, u otras mediciones de la química sanguínea tales como los niveles de colesterol.

55 Pueden medirse otros parámetros relacionados con enfermedad que no son de la DPP para confirmar el diagnóstico o el pronóstico. En algunas formas de realización, el parámetro que no es de la DPP es el nivel de hemoglobina A1C, y la enfermedad es la diabetes. Unos niveles de hemoglobina A1C por debajo del 7 % de la hemoglobina global son indicativos de ausencia de diabetes; unos niveles por encima del 7 % de la hemoglobina global son indicativos de la presencia de diabetes. El parámetro que no es de la DPP puede medirse antes o después del parámetro de la DPP, o pueden medirse simultáneamente.

Con objeto de correlacionar el parámetro medido de la DPP con un estado patológico o una afección, el parámetro medido de la DPP puede compararse con una referencia, es decir, un estándar o un control interno. Un aumento, una disminución o un cambio en el parámetro de la DPP, tanto individualmente como aditivamente, en comparación con una referencia, tanto positiva como negativa, puede correlacionarse con un estado patológico.

- 5 Alternativamente, puede compararse el parámetro de la DPP de una porción de las enzimas discriminadas con un parámetro de otra porción de enzimas discriminadas, o puede compararse con la medición total de dos o más porciones discriminadas.

Por supuesto, el parámetro medido debería compararse con un parámetro correspondiente. Por ejemplo, si se mide la cantidad de DPP, entonces el valor de la cantidad de DPP debería compararse con el valor de la cantidad de DPP de una referencia o de otra porción. Si se mide la expresión de la DPP, debería compararse con la expresión de la DPP de una referencia o de otra porción.

En ciertas formas de realización, se mide el parámetro de un intervalo continuo de porciones. Por ejemplo, para las isoformas separadas según su punto isoeléctrico, pueden medirse uno o más parámetros de dos o más porciones que se separan a un pH o a unos puntos isoeléctricos adyacentes.

- 15 Puede obtenerse un perfil del (los) parámetro(s) medido(s) a lo largo del intervalo continuo de porciones. Alternativamente, puede obtenerse un perfil del (los) parámetro(s) medido(s) basándose en las mediciones de un intervalo no continuo de porciones. El perfil puede basarse en todas las porciones o puede basarse en un subconjunto de porciones.

Las diversas comparaciones que pueden realizarse entre las diversas porciones para determinar la correlación con un estado patológico son numerosas. Las técnicas para el análisis de los datos de los parámetros medidos o para comparar los datos con otros datos son bien conocidas por el experto en la materia. Consecuentemente, todas estas técnicas no se analizan con detalle en el presente documento. Una técnica ejemplar para el análisis de los datos con objeto de extraer la conclusión deseada (es decir, la presencia o la ausencia de un estado patológico) está ilustrada mediante referencia a la gráfica de la Fig. 14. En la Fig. 14, el eje y representa el nivel de un parámetro de la DPP (por ejemplo, la actividad, la expresión, la cantidad, la concentración, el tipo o la cantidad de modificación post-traducciona). El eje x representa la dimensión de discriminación (por ejemplo, el pI, el pH o el tipo de isoforma).

En referencia a la gráfica, se destacan tres áreas, el área "a," el área "b" y el área "c." Para cada área, puede medirse la medición total en un intervalo (por ejemplo, el área bajo la curva para un intervalo dado), proporcionando los valores "a" y "b", totalizando el valor "c". Otros valores que pueden medirse incluyen el valor del pico en un intervalo, el punto en el cual se alcanza el valor del pico en un intervalo, la actividad específica en cualquier punto del intervalo (por ejemplo, a un pI o pH específico), los puntos en los cuales el parámetro medido aumenta o disminuye (por ejemplo, un punto de inflexión), los cambios en el parámetro medido a lo largo del eje x en comparación con otras mediciones, y cualquier combinación de los mismos. Los valores pueden calcularse basándose en un perfil obtenido mediante la medición de un intervalo continuo de porciones, o pueden calcularse basándose en las mediciones de una única porción o de una pluralidad de porciones.

Con objeto de correlacionar un estado patológico con una de las mediciones, se podría comparar el intervalo "a" de valor(es) con el intervalo "b" de valor(es); el intervalo "a" de valor(es) con el intervalo "c" de valor(es); el intervalo "b" de valor(es) con el intervalo "c" de valor(es); el intervalo "a" de valor(es) con un control interno o con un estándar; el intervalo "b" de valor(es) con un control interno o un con estándar; y/o el intervalo "c" de valor(es) con un control interno o un con estándar.

Alternativamente, pueden realizarse mediciones cuantitativas individuales en cualquier intervalo o en cualquier proporción de dichas mediciones cuantitativas asociadas con una dimensión o dimensiones dadas de discriminación, y compararse con unos valores de referencia o con intervalos de valores conocidos para dichas mediciones, habiéndose establecido el intervalo de referencia a través de ensayos clínicos para proporcionar una escala con la cual se determine la presencia, la ausencia o la gravedad de la enfermedad. Las mediciones cuantitativas también pueden estar complementadas con la inclusión de un estándar interno o externo, realizarse simultáneamente o en serie con la dimensión de discriminación (por ejemplo, discriminaciones de la isoforma) que puede usarse para normalizar la lectura cuantitativa de los intervalos de referencia preestablecidos.

Según se usa en el presente documento, el término "estándar" se refiere a un valor, generalmente un valor promedio, mediano o medio, obtenido a partir de un segmento de la población. El estándar puede ser un estándar positivo o un estándar negativo, y puede obtenerse a partir de una población de edades emparejadas. Las poblaciones de edades emparejadas (a partir de las que pueden obtenerse los valores estándar) son idealmente de la misma edad que el individuo que se va a ensayar, pero también son aceptables poblaciones de edades aproximadamente emparejadas. Las poblaciones de edades aproximadamente emparejadas pueden ser de entre 1 - 20 años, incluyendo de aproximadamente 1, de aproximadamente 5, de aproximadamente 10, de aproximadamente 15 o de aproximadamente 20 años de la edad del individuo ensayado, o pueden ser grupos de diferentes edades que engloban la edad del individuo que se está ensayando. Las poblaciones de edades aproximadamente emparejadas pueden estar en incrementos de 2, de 3, de 4, de 5, de 6, de 7, de 8, de 9 o de 10 años (por ejemplo,

un grupo de "incremento de 5 años " que sirve como la fuente de los valores estándar para un individuo de 62 años de edad podría incluir individuos de 58 - 62 años de edad, individuos de 59 - 63 años de edad, individuos de 60 - 64 años de edad, individuos de 61 - 65 años de edad o individuos de 62 - 66 años de edad).

5 Un estándar positivo se refiere a un valor, por ejemplo, un valor promedio, que se obtiene a partir de un segmento de la población con el estado patológico en particular. Un estándar negativo se refiere a un valor, por ejemplo, un valor promedio, que se obtiene a partir de un segmento de la población sin el estado patológico en particular.

10 Según se usa en el presente documento, el término "control interno" se refiere a un valor obtenido a partir de una muestra o muestras procedentes de un único paciente o de un grupo de pacientes cuyo estado patológico es conocido. Un control interno puede ser un control positivo, un control negativo o un control del mismo paciente. Por ejemplo, el control interno puede ser un control positivo de un paciente o pacientes con el estado patológico en particular; o puede ser un control negativo de un paciente o pacientes con un estado patológico en particular. Finalmente, un control interno puede ser un valor obtenido del paciente que se va a diagnosticar, bien a partir de una muestra derivada de un sitio físico diferente (es decir, sangre con respecto a hígado), en un momento diferente para medir la progresión de la enfermedad, o bien a partir de dos o más muestras que han sido procesadas de forma diferente antes de la medición, o recogidas en recipientes distintos que pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes (por ejemplo, dos tubos de plasma con EDTA o un tubo de plasma con EDTA y un tubo con suero).

El valor del control interno puede obtenerse a la vez que, o simultáneamente con, la medición del paciente que se va diagnosticar, o puede obtenerse en cualquier otro momento.

20 Los resultados de la comparación entre el (los) valor(es) medido(s) o entre el (los) valor(es) medido(s) y el (los) valor(es) de referencia se usan para diagnosticar o ayudar en el diagnóstico o en el pronóstico de una enfermedad, para estratificar los pacientes de acuerdo con la gravedad de su enfermedad o para monitorizar la progresión de la enfermedad en un paciente en particular. Consecuentemente, si la comparación indica una diferencia (es decir, un aumento o una disminución) entre el (los) valor(es) medido(s) y el (los) valor(es) de referencia que es sugestiva / indicativa de enfermedad, entonces se ayuda a, o se realiza, un diagnóstico apropiado. Por el contrario, si la comparación del (los) nivel(es) medido(s) y el (los) nivel(es) de referencia no indica diferencias que sugieran o que indiquen un diagnóstico de enfermedad, entonces no se ayuda a, ni se realiza, un diagnóstico apropiado.

25 Cuando se mide más de un parámetro de la DPP relacionado con la enfermedad, pero las diversas mediciones no sugieren ni indican claramente un diagnóstico de enfermedad, se usa la "mayoría" de las sugerencias o indicaciones (por ejemplo, cuando un procedimiento utiliza cuatro parámetros de la DPP relacionados con la enfermedad, tres de los cuales sugieren / indican enfermedad). Dicho resultado se consideraría sugestivo o indicativo de un diagnóstico de enfermedad para el individuo.

30 El proceso de comparar un valor medido y un valor de referencia puede llevarse a cabo de cualquier forma conveniente apropiada para el tipo de valor y de valor de referencia medidos para el parámetro en cuestión de la DPP relacionado con la diabetes. La "medición" puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas de medición cuantitativas o cualitativas, y el modo de comparar un valor medido y un valor de referencia puede variar dependiendo de la tecnología de medición empleada. Por ejemplo, cuando se usa un ensayo cualitativo para la medición de los niveles de actividad de la DPP, los niveles pueden compararse mediante la comparación visual de la intensidad del producto de la reacción de fluorescencia, o mediante la comparación de los datos procedentes de un espectrofotómetro (por ejemplo, comparando los datos numéricos con los datos gráficos, tales como gráficos de barras, derivados del dispositivo de medición). Sin embargo, se espera que los valores medidos usados en los procedimientos de la invención serán lo más habitualmente valores cuantitativos (por ejemplo, mediciones cuantitativas de la concentración, tal como nanogramos de la isoforma de la DPP por mililitro de muestra, o cantidad absoluta). En otros ejemplos, los valores medidos son cualitativos. Como con las mediciones cuantitativas, la comparación puede realizarse inspeccionando los datos numéricos e inspeccionando las representaciones de los datos (por ejemplo, inspeccionando las representaciones gráficas tales como los gráficos de barras o de líneas).

35 El proceso de comparación puede ser manual (tal como una inspección visual por la persona que realiza el procedimiento) o puede estar automatizado. Por ejemplo, un dispositivo de ensayo (tal como un luminómetro para la medición de las señales quimioluminiscentes) puede incluir circuitos y programas informáticos que permitan la comparación del valor medido con un valor de referencia para el (los) parámetro(s) de la DPP. Alternativamente, puede usarse un dispositivo por separado (por ejemplo, un ordenador digital) para la comparación entre el (los) valor(es) medido(s) y el (los) valor(es) de referencia. Algunos dispositivos automatizados para la comparación pueden incluir valores de referencia almacenados para el (los) parámetro(s) de la DPP relacionados con la enfermedad que se están midiendo, o pueden comparar el (los) valor(es) medido(s) con los valores de referencia que derivan de las muestras de referencia medidos simultáneamente.

50 En algunas formas de realización, los procedimientos de la invención utilizan una comparación "simple" o "binaria" entre el (los) nivel(es) medido(s) y el (los) nivel(es) de referencia, por ejemplo, la comparación entre un nivel medido y un nivel de referencia determina si el nivel medido es mayor o menor que el nivel de referencia. En algunas formas de realización, cualquier diferencia en el valor puede indicar enfermedad.

Según se describe en el presente documento, los parámetros pueden medirse cuantitativamente (valores absolutos) o cualitativamente (valores relativos). Los respectivos niveles del (los) parámetro(s) de la DPP relacionados con la enfermedad para una valoración dada pueden solapar o no. Según se describe en el presente documento, para algunas formas de realización, los datos cualitativos indican un nivel dado de estado patológico (leve, moderado o grave) y en otras formas de realización, los datos cuantitativos indican un nivel dado de estado patológico.

En ciertos aspectos de la invención, la comparación se realiza para determinar la magnitud de la diferencia entre los valores medidos y los de referencia, por ejemplo, la comparación del "número de veces" o porcentaje de diferencia entre el valor medido y el valor de referencia. Una diferencia en un número de veces que es aproximadamente 2 veces menor o mayor que una diferencia en número de veces mínimo sugiere o indica, por ejemplo, la presencia de una enfermedad. Una diferencia en un número de veces puede ser determinada mediante la medición de la cantidad absoluta, de la concentración, de la actividad o de la expresión de una DPP, y la comparación con el valor absoluto de una referencia, o puede medirse una diferencia en el número de veces mediante la diferencia relativa entre un valor de referencia y el valor de una muestra, cuando ningún valor es una medición de una cantidad, concentración, actividad o expresión absoluta, y/o cuando ambos valores se miden simultáneamente. Alternativamente, las diferencias en el número de veces pueden medirse dentro de los propios datos del ensayo, por ejemplo, mediante la comparación del número de veces de diferencia de "a" con respecto a "c" en comparación con "b" con respecto a "c", o cualquier otra proporción de parámetros mensurables del sistema de ensayo. Consecuentemente, la magnitud de la diferencia entre el valor medido y el valor de referencia que sugiere o que indica un diagnóstico en particular dependerá del parámetro en particular que se está midiendo para producir el valor medido, y del valor de referencia usado.

Según se describe en el presente documento, existe una correlación entre el perfil de actividad de la DPP-IV obtenido a partir de un intervalo continuo de isoformas de la DPP-IV separadas por el pl, y la presencia, la ausencia o la gravedad de la diabetes de tipo II. Esta correlación se usa en un procedimiento para el diagnóstico o el pronóstico de la diabetes de tipo II que comprende la medición de uno o más parámetros de la DPP-IV de porciones discriminadas de la DPP-IV a partir de la muestra de un paciente, y correlacionando dicho parámetro medido de la DPP-IV con la presencia, la ausencia o la gravedad de la diabetes de tipo II en el paciente. En ciertas formas de realización, el parámetro de la DPP-IV es la actividad de la DPP-IV. En ciertas formas de realización, las porciones de la DPP-IV son discriminadas según su pl.

El parámetro de la DPP-IV puede compararse con un estándar poblacional o con un control interno. Cualquier diferencia con respecto a un estándar poblacional negativo o un control interno negativo puede ser correlacionada con la presencia o la gravedad de la diabetes. Cuanto mayor sea el grado de diferencia entre el parámetro medido de la DPP-IV y la referencia negativa, más grave será el pronóstico. Asimismo, cualquier diferencia con respecto a un estándar poblacional positivo o un control interno positivo puede ser correlacionada con la ausencia de diabetes. Como se ha analizado anteriormente, algunos parámetros incluyen la actividad, la cantidad, la expresión o la concentración.

Las porciones de la DPP-IV pueden ser discriminadas mediante cualquier característica o procedimiento divulgados en el presente documento. En algunas formas de realización ejemplares, las porciones de la DPP-IV son discriminadas según su pl. En ciertas formas de realización, las porciones de la DPP-IV se separan mediante una electroforesis de flujo libre.

La Fig. 10 muestra la comparación entre el perfil de actividad de la DPP-IV entre porciones discriminadas según su pl de la DPP-IV en plasma procedentes de un paciente sano y de uno diabético. Los presentes inventores han demostrado que, en los pacientes diabéticos, el perfil de actividad de la DPP-IV cambia a un mayor pH. Cualquier diferencia en el perfil de actividad de la DPP-IV en cualquier punto o puntos con respecto al valor de cualquier paciente sano mostrada aquí, o cualquier diferencia en el perfil de actividad de la DPP-IV en cualquier punto o puntos con respecto al valor obtenido a partir de un control negativo interno o de un estándar poblacional, puede ser correlacionada con la diabetes.

Por lo tanto, un cambio en el perfil de actividad de la DPP-IV con respecto al estándar negativo mostrado en el presente documento, o al estándar poblacional negativo hacia un pH mayor, es indicativo de diabetes. Asimismo, un cambio en el perfil de actividad de la DPP-IV con respecto a un control negativo de control hacia un pH mayor es indicativo de la presencia de diabetes de tipo II. Cuanto más pronunciado sea el cambio en el perfil de actividad, más grave será la enfermedad.

Un estándar positivo asociado con una medición "opuesta" extrema de una muestra o población sana puede ser representado por la medición de la isoforma más extrema en el intervalo de pl en cuestión. Dicho estándar positivo podría ser establecido, por ejemplo, mediante el tratamiento de la muestra del paciente con procedimientos químicos o enzimáticos para eliminar completamente todas las glucosilaciones, en el caso de que la ausencia completa de todos los glucanos representara la condición de la isoforma mensurable más alejada de las isoformas contenidas en las muestras sanas típicas. Debería apreciarse que una isoforma extrema resultante de este tratamiento nunca puede ser realmente posible en las muestras reales, pero todavía puede usarse para establecer el intervalo más lejano posible de pH, con el fin de proporcionar un control mensurable para el ensayo. Como alternativa, esta isoforma positiva "extrema" podría ser un control externo, que podría medirse por separado o medirse después de

añadirla a la muestra que se va a analizar. En ciertas formas de realización, dicho control positivo también podría usarse para ayudar en la normalización de las mediciones resultantes de la muestra.

Por "cambio" en la actividad se entiende cualquier diferencia en la actividad de la DPP-IV en una o más porciones de la DPP-IV. Por ejemplo, el valor medido para la actividad de la DPP-IV puede diferir de la referencia en solo una porción discriminada, o puede diferir en alguna o en todas las porciones. Las tendencias en el nivel de actividad de la DPP-IV, por ejemplo, un mayor nivel de actividad a un pH mayor, son especialmente útiles para la detección de la diabetes de tipo II.

Los pacientes diabéticos y los pacientes sanos también muestran los picos principales en el perfil de actividad de la DPP-IV cuando se discrimina la DPP-IV según su pl. Los pacientes diabéticos tienden a mostrar unos picos aproximadamente a un pH de 4,4 y aproximadamente a un pH de 4,8. Cada uno de esos picos está asociado con aproximadamente un 10 % de la actividad total medida de las isoformas discriminadas según el pl. Los pacientes sanos tienden a mostrar unos picos aproximadamente a un pH de 3,9 y aproximadamente a un pH de 4,1.

Por "pico" se entiende uno de un pequeño número de valores extremos locales para todos los valores medidos. Cada valor está asociado con una porción discriminada. Un valor del pico puede asociarse con una porción discriminada o con un grupo de porciones discriminadas. Ese valor puede ser por lo tanto un valor individual para una única porción discriminada, o una interacción de los valores individuales para un intervalo de porciones discriminadas. Por ejemplo, un perfil de valores en función de las porciones discriminadas puede contener únicamente un pico, o puede contener más de un pico. Generalmente, únicamente los 1, 2, 3, 4 o 5 valores superiores serán considerados como picos. Opcionalmente, por ejemplo, el pico puede ser un valor relacionado, preferiblemente en o cerca del perfil de una pluralidad de valores adyacentes, en el que los valores cambian desde una magnitud que sube hacia una magnitud que baja.

Por lo tanto, un pico máximo en la actividad de la DPP-IV de las isoformas discriminadas mediante su pl de la DPP-IV a, o aproximadamente a, un pH de 3,9 y/o a, o aproximadamente a, un pH de 4,1, puede ser correlacionado con la ausencia de diabetes.

Asimismo, un pico en la actividad de la DPP-IV de las isoformas discriminadas mediante su pl de la DPP-IV a, o aproximadamente a, un pH de 4,4 y/o a, o aproximadamente a, un pH de 4,8 puede ser correlacionado con la presencia de diabetes. Los picos que son al menos aproximadamente un 10 % de la actividad total medida para el intervalo continuo de la DPP-IV son especialmente útiles para la presencia de diabetes. Cuanto mayor sea el pico a, o aproximadamente a, un pH de 4,4 y/o a un pH de 4,8, más grave será el diagnóstico.

La Fig. 11 es una gráfica que muestra el perfil de actividad acumulada de la DPP-IV de las isoformas discriminadas mediante su pl a partir de pacientes sanos y diabéticos. Cada punto de la gráfica representa el porcentaje acumulado de la actividad total en función del pH creciente del intervalo continuo de las isoformas discriminadas. Como se ha explicado previamente, las isoformas de la DPP son discriminadas mediante su separación en porciones individuales discriminadas, asociada cada una con una estrecha banda de pH en particular.

La Fig. 12 muestra el pH al cual la actividad acumulada de las porciones discriminadas según su pl de la DPP-IV procedentes de pacientes individuales alcanzó el 90 % de la actividad total del intervalo medido, sumando la actividad de las porciones discriminadas de la isoforma, comenzando por el extremo ácido del intervalo de pH medido. Los pacientes sanos alcanzaron el 90 % de la actividad de la DPP-IV para las isoformas discriminadas a, y por debajo de, aproximadamente un pH de 4,2. Por el contrario, los pacientes diabéticos no alcanzaron el 90 % de la actividad de la DPP-IV para las isoformas discriminadas a, y por debajo de, aproximadamente un pH de 4,4. La actividad acumulada de la DPP-IV a partir de los pacientes enfermos no alcanzó el 90 % de la actividad total acumulada de la DPP-IV hasta que se tuvieron en cuenta las isoformas discriminadas a unos pH incluso mayores.

Por lo tanto, puede usarse el pH al cual la actividad acumulada de las porciones discriminadas según su pl de la DPP-IV a partir de una muestra alcanza el 90 % de la actividad total de la muestra para correlacionar la medición de la actividad de la DPP-IV con la enfermedad. Por lo tanto, si el porcentaje de la actividad total actividad de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas discriminadas a un punto isoelectrónico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, aproximadamente un pH de, cuatro, no excede aproximadamente el 90 %, entonces se detecta la presencia de diabetes. Si al menos aproximadamente el 10 % de la actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas discriminadas a un punto isoelectrónico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, aproximadamente un pH 4,4, entonces se detecta la presencia de diabetes. Cuanto mayor sea el pH por encima de un pH de 4,4 al que se alcanza un 90 % de la actividad, será indicativo de un pronóstico más grave.

Si al menos aproximadamente el 90 % de la actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas discriminadas a un punto isoelectrónico asociado con un intervalo de pH por debajo de aproximadamente un pH de 4,2, entonces se detecta la ausencia de diabetes. Si el porcentaje de actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas discriminadas a un punto isoelectrónico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, aproximadamente un pH de 4,2, no excede aproximadamente el 10 %, entonces se detecta la ausencia de diabetes.

La Fig. 13 muestra el pH al cual la actividad acumulada de las porciones discriminadas según su pI de la DPP-IV procedentes de pacientes individuales alcanzó el 60 % de la actividad total, comenzando la suma de la actividad de las isoformas en el extremo ácido del intervalo de pH medido. Los pacientes sanos alcanzaron el 60 % de la actividad de la DPP-IV a aproximadamente un pH de 3,9. Por el contrario, los pacientes diabéticos no alcanzaron el 60 % de la actividad de la DPP-IV hasta aproximadamente un pH de 4,15 y superior. La actividad acumulada de la DPP-IV a partir de los pacientes enfermos no alcanzó el 60 % de la actividad total acumulada de la DPP-IV hasta que se tuvieron en cuenta las isoformas discriminadas a unos pH incluso mayores.

Por lo tanto, puede usarse el pH al cual la actividad acumulada de las porciones discriminadas según su pI de la DPP-IV procedentes de una muestra alcanza el 60 % de la actividad total de la muestra para correlacionar la medición de la actividad de la DPP-IV con la enfermedad. Por lo tanto, si el porcentaje de la actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presentes en las isoformas discriminadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, aproximadamente un pH de 4,15, no excede aproximadamente el 60 %, entonces se detecta la presencia de diabetes. Si al menos aproximadamente el 40 % de la actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas discriminadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de un pH a, y por encima de, aproximadamente un pH de 4,15, entonces se detecta la presencia de diabetes. Cuanto mayor sea el pH por encima de un pH de 4,15 al que se alcanza un 60 % de la actividad, será indicativo de un pronóstico más grave.

Si al menos aproximadamente el 60 % de la actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas discriminadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, aproximadamente un pH de 3,9, entonces se detecta la ausencia de diabetes. Si el porcentaje de actividad total de la DPP-IV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas discriminadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, aproximadamente un pH de 3,9, no excede aproximadamente el 40 %, entonces se detecta la ausencia de diabetes.

EJEMPLO 1

Mediante el uso de la electroforesis en forma libre (FFE) (sistema de electroforesis de flujo libre BD™), que separa las proteínas según su carga, se separaron las isoformas de la DPP-IV en porciones y se caracterizaron. Se prefirió el aislamiento de las isoformas de las proteínas para el análisis del papel de las modificaciones específicas sobre la actividad. El análisis de la actividad indica que el aumento en la actividad específica se correlaciona con un aumento en el pI de la isoforma. Esto sugiere que las modificaciones post-traduccionales pueden jugar un papel en la regulación de la actividad de la DPP-IV. La FFE puede facilitar estudios adicionales que pueden correlacionar la(s) modificación(es) de la enzima con el estado patológico.

La FFE se realizó mediante el uso del sistema de electroforesis de flujo libre BD™ como sigue: se obtuvo DPP-IV porcina en Sigma™ (1 - 100 mg) se diluyeron (generalmente a 1:5) en un medio de separación con un pH apropiado. Las proteínas diluidas se cargaron después en la entrada de muestras más catódica de la cámara de FFE Becton™, y se separaron mediante la aplicación de 1.200 - 1.500 V y de 20 - 25 mA, con un caudal medio de separación de aproximadamente 60 ml/h mediante el uso de un gradiente de pH de 3 - 10.

Los tampones y los medios para el isoelectroenfoque (IEF)-FFE se prepararon de acuerdo con los protocolos de los fabricantes (manual de aplicación de la FFE de Becton™) mediante el uso de las condiciones naturales, con un gradiente de pH de 3 - 10. La electroforesis en gel de poliacrilamida con isoelectroenfoque (PAGE) (IEF) se llevó a cabo con geles hechos a medida con T:4 %, o mediante el uso de blancos Precoats™ (Serva) equilibrados al intervalo de pH apropiado. Se realizó una tinción con plata para detectar las bandas proteicas, y el resultado se muestra en la Fig. 3.

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo como sigue: se añadieron 45 µl de tampón de ensayo (Tris-Cl 100 mM [pH 8,0]; 0,05 % v/v de DMSO) a una muestra de proteína de 5 µl, y se midió el aumento en la fluorescencia a partir del T inicial. La actividad se expresó como el incremento en las unidades de fluorescencia relativa (RFU)/min resultantes de la hidrólisis del sustrato de Gly-Pro-AMC (250 µM) a 30 °C. Los resultados se muestran en las Figs. 2 A y 2 B.

La digestión de las proteínas con tripsina se realizó mediante la escisión de las bandas teñidas con Sypro Ruby que fueron visualizadas después de la PAGE (IEF) o de la SDS-PAGE y la posterior digestión de acuerdo con las recomendaciones del kit (Pierce/Sigma).

La desorción / ionización de la matriz asistida por láser (MALDI) MS se llevó a cabo como sigue: los péptidos digeridos "in gel" se extrajeron (según las indicaciones) y se limpiaron mediante el uso de puntas de pipeta ZipTip® (Millipore). Los péptidos digeridos se mezclaron a 1:1 con matriz (solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 60 %) y se puntearon en un objetivo de acero inoxidable (Bruker Daltonics).

Se usaron las huellas de masa peptídica (PMF) del tiempo de vuelo de la MALDI (TOF) iniciales para la identificación de las proteínas digeridas, seguido de una identificación mediante TOF / TOF de los péptidos específicos (ambas mediante el uso de Mascot). Los resultados se muestran en las Figs. 4 A y 4 B.

EJEMPLO 2

Los experimentos descritos en el Ejemplo 2 siguieron al mismo protocolo presentado en el Ejemplo 1, excepto porque la muestra proteica derivaba de plasma humano procedente de pacientes sanos.

5 Las muestras de plasma humano (anticoaguladas con EDTA) se obtuvieron a partir de dos individuos, y las isoformas de la DPP-IV se separaron en porciones según se ha descrito en el Ejemplo 1. La actividad se midió como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se analizaron los patrones de la actividad de la DPP-IV para observar si existía un perfil de actividad similar al de las isoformas porcinas de la DPP-IV. Los resultados se presentan en las Figs. 6 A y 6 B.

10 A partir de los resultados indicados en las Figs. 6 A y 6 B, se observó una diseminación de la actividad similar a la observada con la DPP-IV porcina para la actividad de la DPP-IV en plasma humano. Se observó un aumento de la actividad a los valores de pH más altos (con un máximo aproximadamente a un pH de 5,2). Sería necesaria una cuantificación precisa de la proteína (DPP-IV) para la determinación de la actividad específica.

15 En los Ejemplos 1 y 2 se demuestra que las isoformas de las proteínas pueden ser separadas mediante el uso de una FFE (IEF), y se permite la caracterización bioquímica de las isoformas separadas. El modelo porcino de DPP-IV muestra múltiples isoformas (identificadas mediante el uso de una espectrometría de masas) que muestra las diferentes actividades específicas. La DPP-IV humana (separada del plasma) muestra una tendencia similar cuando es analizada después de una FFE. Las modificaciones post-traduccionales (PTM) pueden jugar un papel en la regulación de la actividad específica de la DPP-IV. La FFE puede facilitar la identificación y las implicaciones de las potenciales PTM para las isoformas individuales de la DPP- IV, así como para otras proteínas.

20 La DPP-IV se midió como se ha descrito previamente. Los resultados, presentados en las Figs. 6 A y 6 B, cuando se comparan con los resultados de los experimentos con la DPP-IV porcina, indican que la DPP-IV humana muestra una tendencia de actividad similar cuando es analizada después de la FFE, al igual que la similarmente analizada DPP-IV porcina.

25 Tomados en conjunto, los resultados de los ejemplos 1 y 2 sugieren que las modificaciones post-traduccionales (PTM) pueden jugar un papel en la regulación de la actividad específica de la DPP-IV, y que la FFE puede facilitar la identificación y las implicaciones de las potenciales PTM en las isoformas individuales de la DPP-IV, así como en otras proteínas.

EJEMPLO 3

30 Los experimentos descritos en el Ejemplo 3 siguieron el mismo protocolo al presentado en el Ejemplo 1, excepto por que la muestra proteica derivaba de plasma humano, y el IEF se llevó a cabo con un gradiente de pH de 3 - 7. Específicamente, se obtuvieron 2 muestras de plasma humano tratadas con heparina, una de una persona con diabetes de tipo 2 (nivel de glucosa de 538 mg/dl) y otra de una persona sana.

Los resultados, presentados en las Figs. 7 y 8, indican que la muestra diabética presenta un perfil de una isoforma de la DPP con un mayor intervalo isoelectrónico.

EJEMPLO 4

35 Se discriminó el plasma de cuatro pacientes sanos y de cinco diabéticos según su pl. La FFE se llevó a cabo mediante el uso de la cámara de FFE Becton™ como sigue: se mezclaron 25 µl de plasma (diluido a 1:8) con 25 µl de glicerol, 25 µl de HPMC al 0,08 %, 125 µl de tampón de separación a pH 3 - 7. Después se cargaron las proteínas diluidas en la entrada de muestras más catódica de la cámara de FFE Becton™, y se separaron mediante un isoelectroenfoque a intervalos (IIEF)-FFE mediante el uso de las condiciones naturales y a un intervalo de pH de 3 - 7 con la aplicación de 1.200 - 1.500 V y de 20 - 25 mA. El IIEF-FFE se llevó a cabo a 10 °C con un tiempo de residencia que totalizaba 64 minutos. Se usó un caudal de tampón de 50 ml/h en intervalos de 5 minutos (5 minutos hacia delante, después 5 minutos hacia atrás) totalizando 60 minutos. La aplicación de la muestra se realizó a 6.000 µl/h durante 2 min con un caudal medio de 180 ml/h durante la aplicación de la muestra. Después de la aplicación de 40 la muestra se aplicó el voltaje y el caudal medio se estableció para que fluyera a 50 ml/h en intervalos de 5 minutos (5 min hacia delante, después 5 min hacia atrás) totalizando 60 min. La muestra se recogió después de la separación por intervalos mediante el aumento del flujo de tampón hacia delante hasta 300 ml/h durante 2 minutos, pausando y recolectando después durante 2 minutos en 96 pocillos. La actividad de la DPP-IV se ensayó según se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en las Figs. 10 y 11.

50 En la Fig. 10, las barras claras representan el valor obtenido a cada pl de un paciente sano, y las barras oscuras representan el valor promedio obtenido a cada pl de un paciente diabético.

55 Se observan los picos principales en los pacientes sanos, aproximadamente a un pH de 3,9 y aproximadamente a un pH de 4,1. Asimismo, se observan dos picos principales en los pacientes diabéticos, aproximadamente a un pH de 4,4 y aproximadamente a un pH de 4,8. El perfil plasmático diabético se ha desplazado hacia el pH mayor, o a la derecha del perfil plasmático de los pacientes sanos.

En este ejemplo, el Grupo 1 son sanos (S04, S11, S07, y S02) y el Grupo 2 son diabéticos diagnosticados: L205 - Glucosa en sangre = ~ 139 mg/dl; S09 - Glucosa en sangre desconocida; S08 - Glucosa en sangre = ~ 90 mg/dl, la enfermedad del paciente está controlada con medicación; S01 - Glucosa en sangre = -150 mg/dl; y S139 - Glucosa en sangre = ~ 350 mg/dl.

- 5 Se dividió una alícuota del plasma de un sujeto sano, y una mitad se desialiló con neuraminidasa y la otra se dejó como control. Cada porción se separó en las condiciones descritas anteriormente en este Ejemplo, y el perfil de la isoforma se midió mediante un análisis enzimático. La eliminación del ácido siálico dio como resultado un desplazamiento del perfil desde aproximadamente un pH 4,0 hasta aproximadamente un pH de 5,0. Los resultados se presentan en un gráfico de barras en la Fig. 9.
- 10 La disialilación también dio como resultado un aumento de dos o tres veces en la actividad específica, según se muestra en la Tabla 1.

ID de la muestra	Actividad específica normal	Actividad específica desialilada
S07	38,71	85,01
S08	22,93	61,80
S11	47,23	88,08

- 15 Parece que el exceso de sialilación reduce la eficacia (también conocida como la actividad específica) de la DPP-IV. Por lo tanto, una de las razones por la que los pacientes con diferentes estados patológicos pueden mostrar diferentes perfiles de isoformas es debida a la modificación post-traducciona, tal como la sialilación.

Para tener en cuenta los gradientes reales de pH de las múltiples muestras, se semi-integró la lectura del pH frente al % de actividad local (a ese pH). Después se añadió la actividad porcentual a lo largo del intervalo de pH. Esto se muestra en la Fig. 11. Esencialmente, esto permite la visualización de a qué pH se alcanzó un cierto "umbral" de actividad.

- 20 Los datos de sanos y de diabéticos se muestran al 60 % en la Fig. 12 y al 90 % en la Fig. 13. Todos los pacientes sanos están estrechamente en un pH de 4,2 para una actividad del 90 %; mientras que todos los pacientes diabéticos están ligeramente por encima de un pH de 4,4, y a un pH mayor al aumentar la gravedad de la enfermedad. Todos los pacientes sanos están estrechamente en un pH de aproximadamente 3,9 para una actividad del 60 %; mientras que todos los pacientes diabéticos están ligeramente por encima de un pH de pH 4,15.
- 25 Concebido sin desviarse del espíritu y del ámbito de la presente invención, según se define mediante las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico o pronóstico de la enfermedad metabólica de la diabetes de tipo II, que comprende:
 - 5 medir al menos un parámetro de una o más porciones discriminadas parcialmente o completamente separadas o aisladas de más de una isoforma de la dipeptidil peptidasa (DDP) IV (DPPIV) a partir de la muestra de un paciente, en el que el al menos un parámetro es la cantidad, la concentración, la actividad, la expresión o el tipo o la cantidad de la modificación post-traducciona l de la más de una isoforma de la DPPIV; y correlacionar dicho parámetro medido de la DPP de la más de una isoforma de la DPPIV con la presencia, la ausencia o la gravedad de dicha enfermedad.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que cada porción contiene una o más isoformas de la DPPIV.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una o más porciones no contienen ninguna isoforma de la DPPIV, y otras porciones contienen una o más isoformas de la DPPIV.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho parámetro es la actividad de la DPPIV.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha actividad de la DPPIV se mide a través de un ensayo que detecta la presencia o la cantidad de un producto de la actividad de hidrólisis de la DPPIV sobre un sustrato marcado.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho sustrato es X-Y-R, en la que X es cualquier aminoácido, Y es alanina, prolina o arginina, y R es cualquier marcador detectable.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que se mide la actividad de la DPPIV de un intervalo continuo de porciones, y que opcionalmente comprende adicionalmente la obtención de un perfil de actividad de la DPPIV a lo largo del intervalo continuo de porciones.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho parámetro se mide mediante el uso de un anticuerpo o de una lectina específica para más de una isoforma de la DPPIV.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se mide más de un parámetro de la DPPIV.
- 25 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha muestra de un paciente se selecciona de entre sangre, plasma, suero y combinaciones de los mismos.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente comunicar la presencia, la ausencia o la gravedad de la enfermedad metabólica a un operador.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha más de una isoforma de la DPPIV se separa o se aísla sobre la base del punto isoeléctrico.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se correlaciona la presencia de la diabetes de tipo II con una característica del perfil de actividad seleccionada de entre:
 - 35 a) el porcentaje de actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, un pH de aproximadamente 4,4, en el que el porcentaje no excede aproximadamente el 90 %;
 - b) el porcentaje de actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, un pH de aproximadamente 4,15, en el que el porcentaje no excede aproximadamente el 60 %;
 - 40 c) al menos aproximadamente el 10 % de la actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, un pH de aproximadamente 4,4;
 - d) al menos aproximadamente el 40 % de la actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, un pH de aproximadamente 4,15;
 - 45 e) un pico del perfil de actividad de la DPPIV a aproximadamente un pH de 4,4, en el que dicho pico está asociado con al menos aproximadamente el 10 % de la actividad total medida del intervalo continuo;
 - f) un pico del perfil de actividad de la DPPIV a aproximadamente un pH de 4,8, en el que dicho pico está asociado con al menos aproximadamente el 10 % de la actividad total medida del intervalo continuo;
 - 50 g) un cambio en el perfil de actividad de la DPPIV hacia un pH mayor en comparación con un control interno negativo; y
 - h) un cambio en el perfil de actividad de la DPPIV hacia un pH mayor en comparación con un estándar negativo; y combinaciones de los mismos.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se correlaciona la ausencia de la diabetes de tipo II con una

característica del perfil de actividad seleccionada de entre:

- 5 a) al menos aproximadamente el 90 % de la actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, un pH de aproximadamente 4,2;
- b) al menos aproximadamente el 60 % de la actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo está presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por debajo de, un pH de aproximadamente 3,9;
- 10 c) el porcentaje de actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, un pH de aproximadamente 4,2, en el que el porcentaje no excede aproximadamente el 10 %;
- d) el porcentaje de actividad total de la DPPIV de todas las porciones medidas del intervalo continuo presente en las isoformas separadas a un punto isoeléctrico asociado con un intervalo de pH a, y por encima de, un pH de aproximadamente 3,9, en el que el porcentaje no excede aproximadamente el 40 %;
- 15 e) un cambio en el perfil de actividad de la DPPIV hacia un pH menor en comparación con un control interno positivo; y
- f) un cambio en el perfil de actividad de la DPPIV hacia un pH menor en comparación con un estándar positivo; y combinaciones de los mismos.

Figura 1 - Flujo de trabajo de la FFE

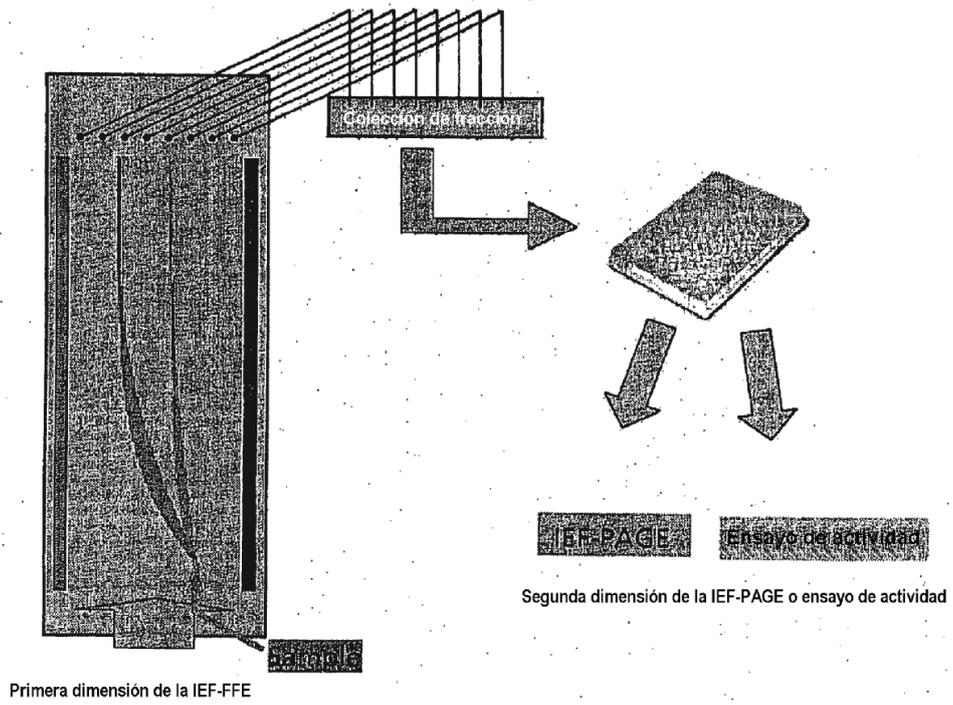


Figura 2A. Ensayo de actividad de la DPP-IV después de una IEF-FFE nativa. Las fracciones seleccionadas se mezclaron con el sustrato fluorogénico Gly-Pro-AMC

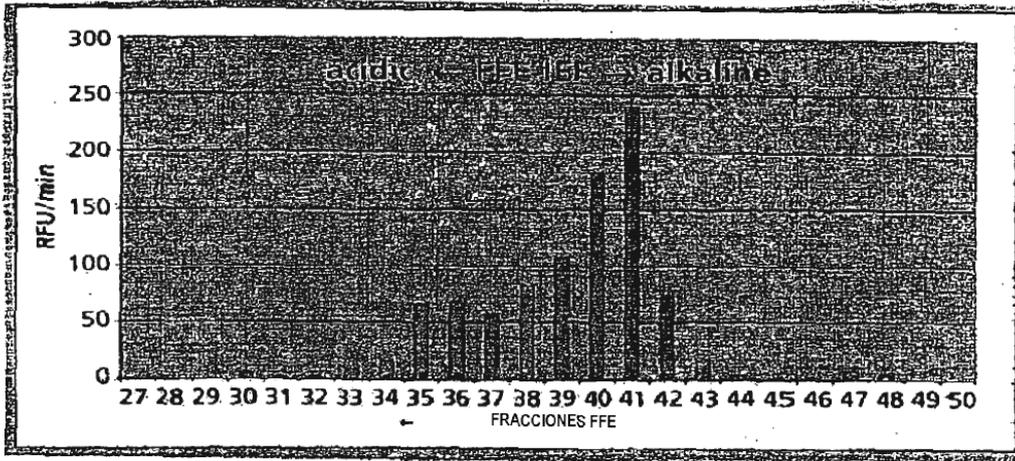
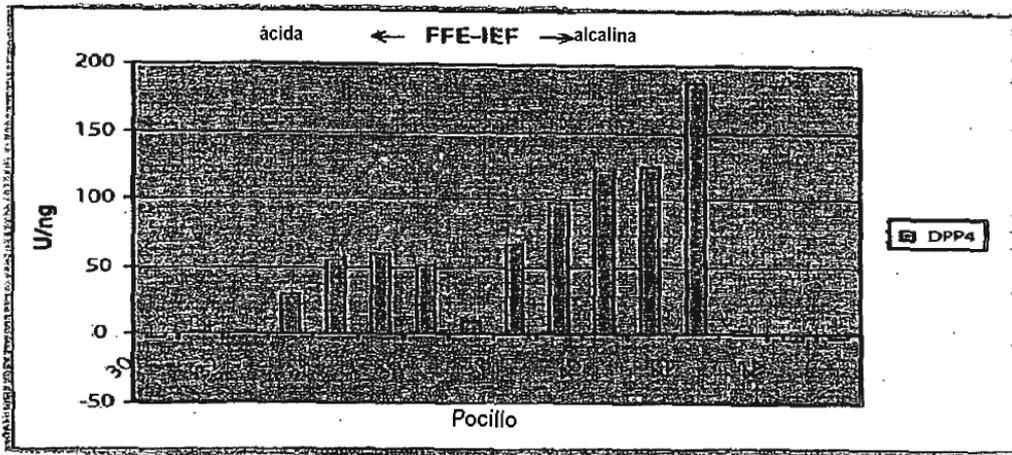


Figura 2B. La actividad específica (U/ng de enzima) muestra el aumento real en la actividad específica



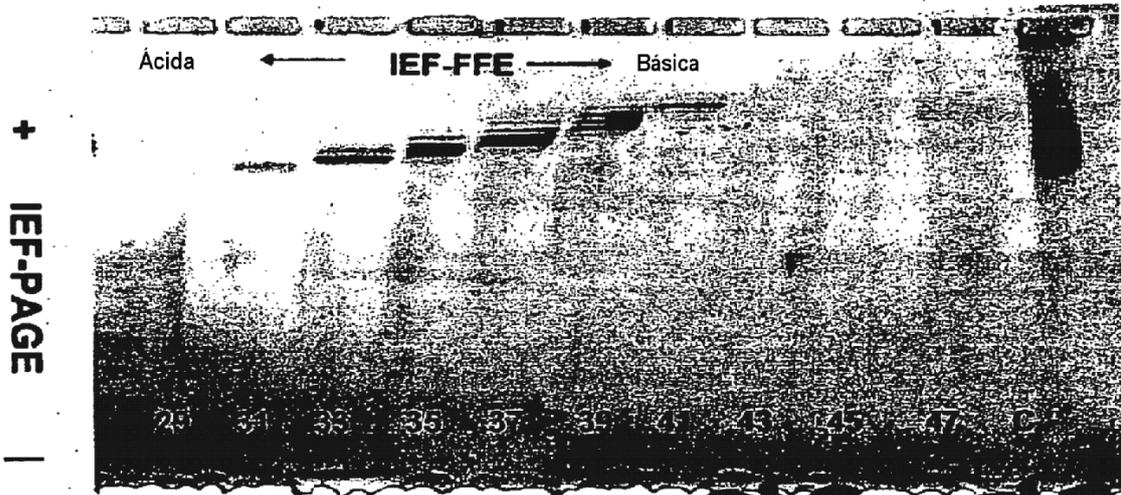


Figura 3

Figura 4A Isoforma más ácida

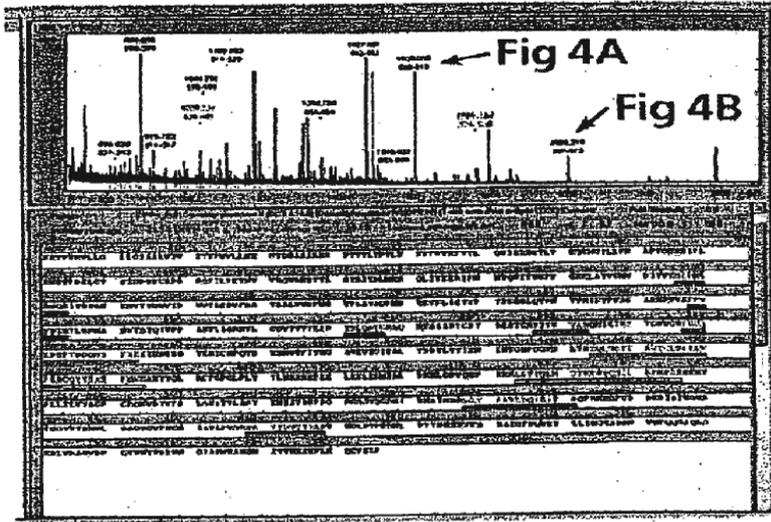


Figura 4B Isoforma ligeramente más básica

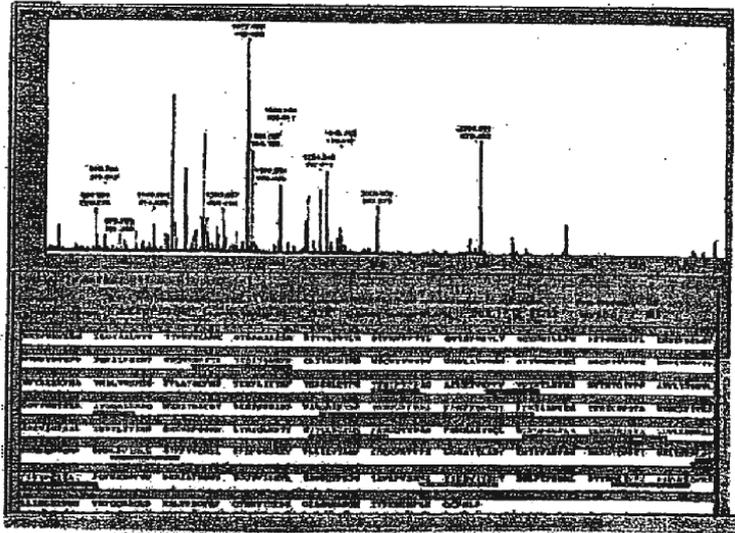


Figura 5A

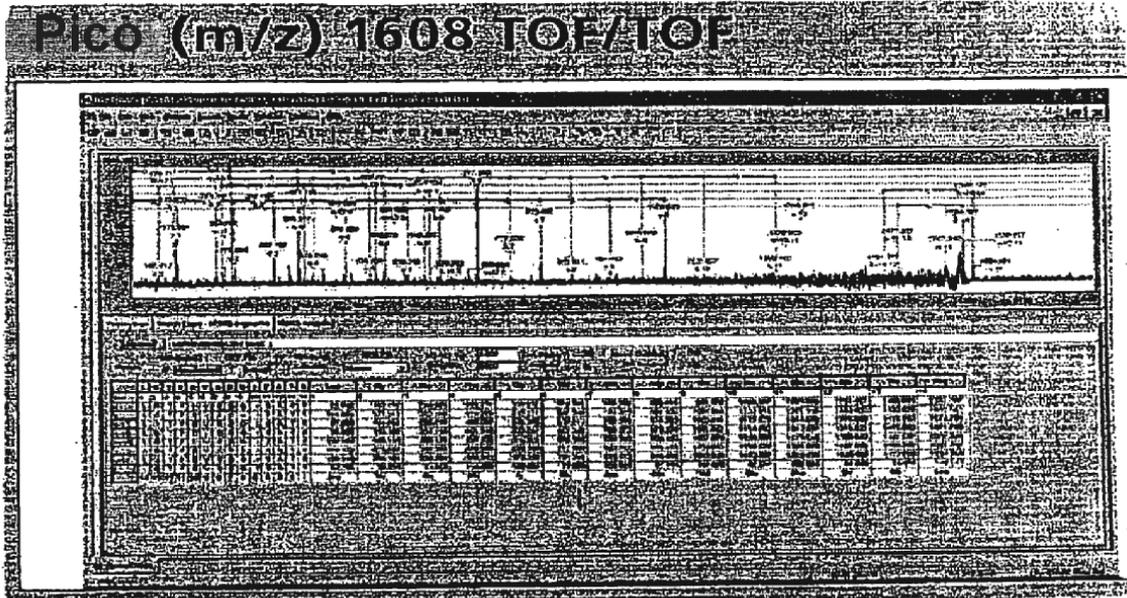


Figura 5B

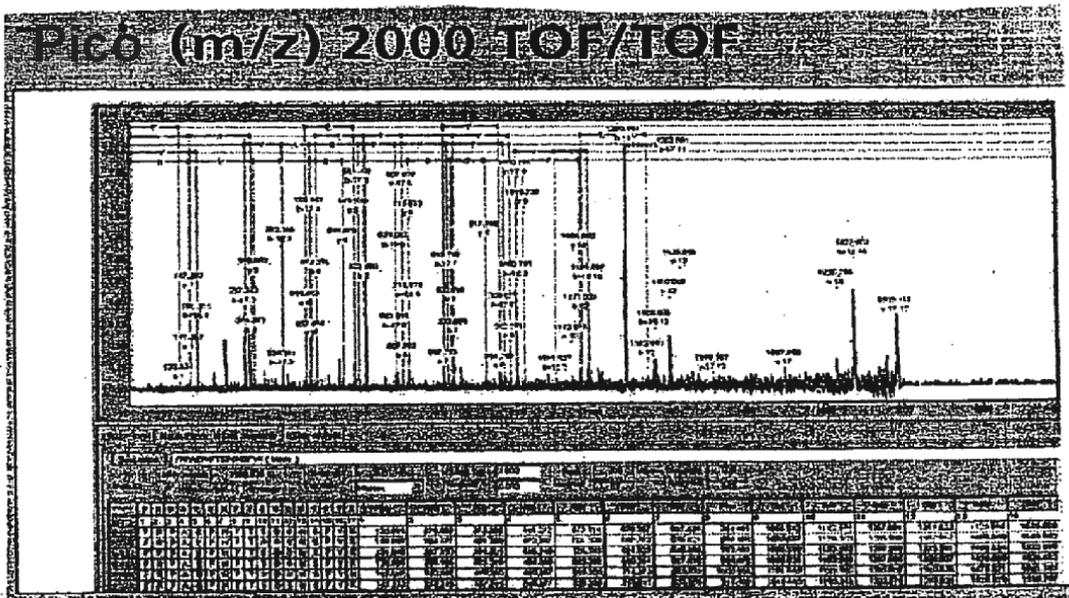


Figura 6A

Sujeto 1

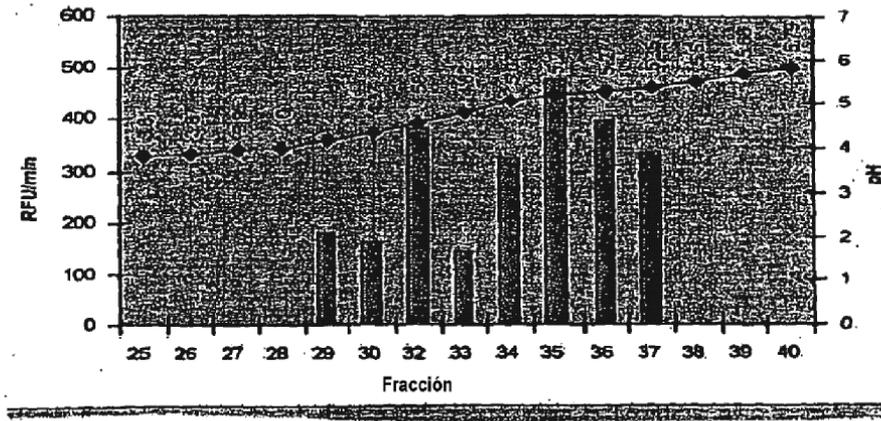


Figura 6B

Sujeto 2

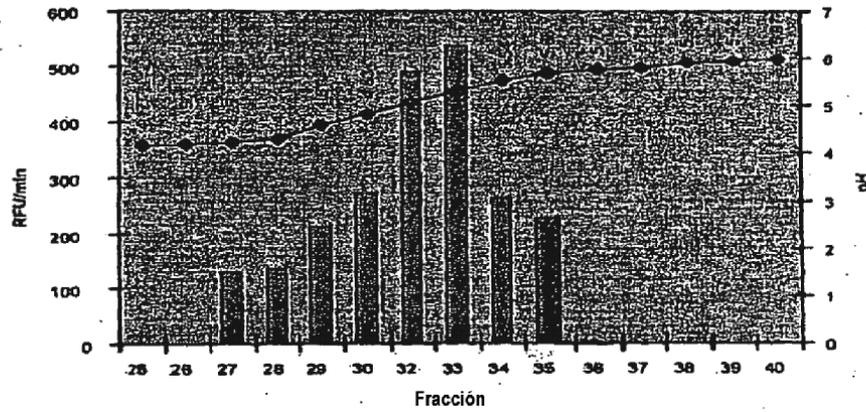


Fig. 7 Sujeto humano normal

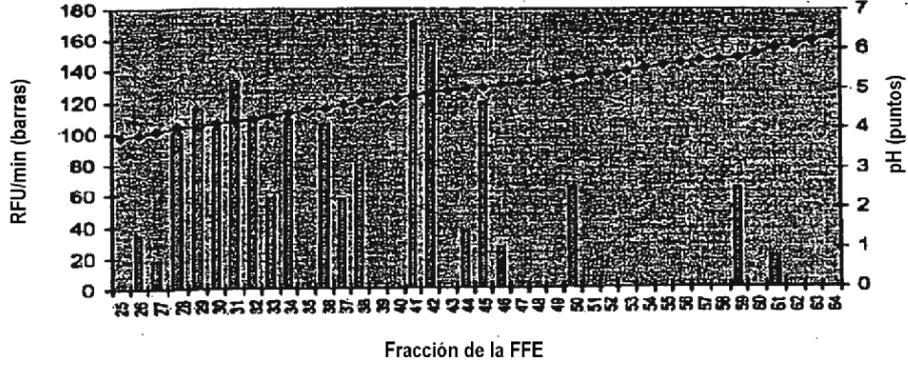
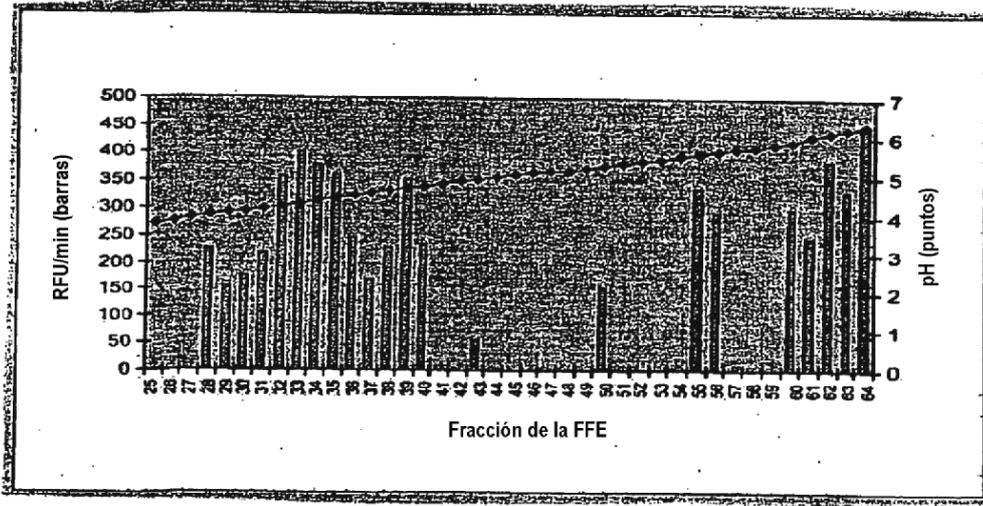


Fig. 8 Sujeto diabético con un nivel de glucosa de 538 mg/dl



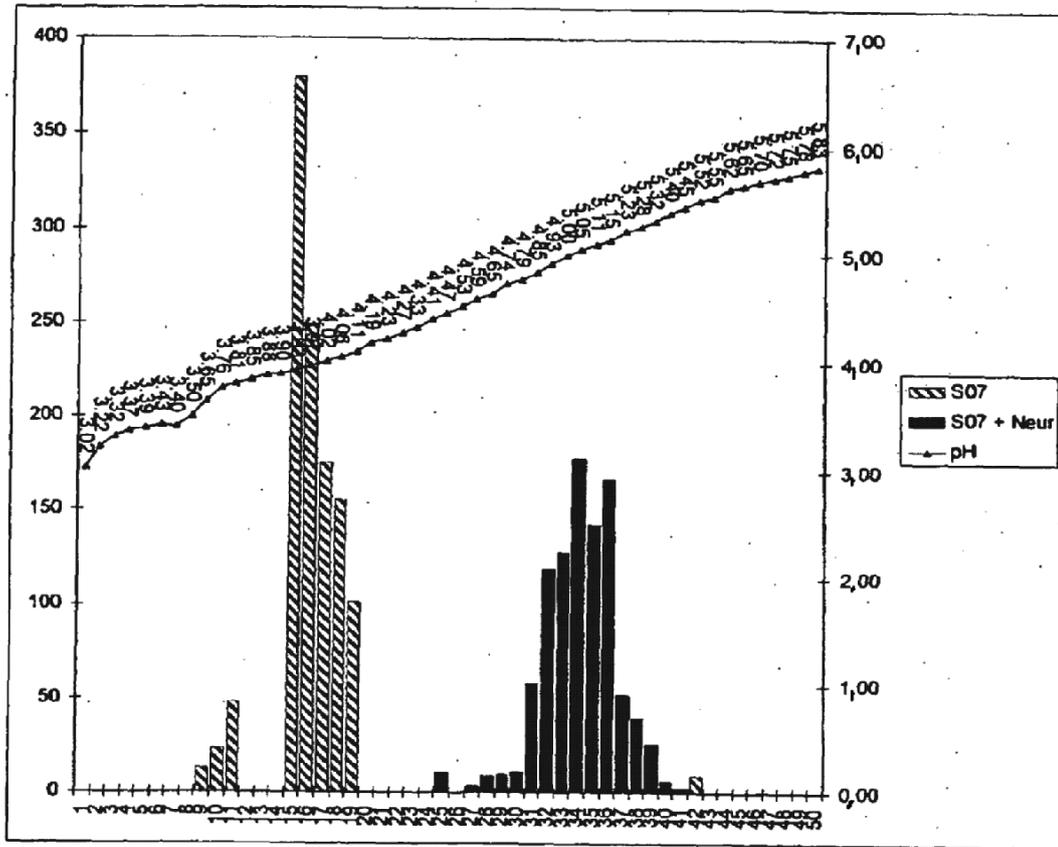


Figura 9

Fig. 10

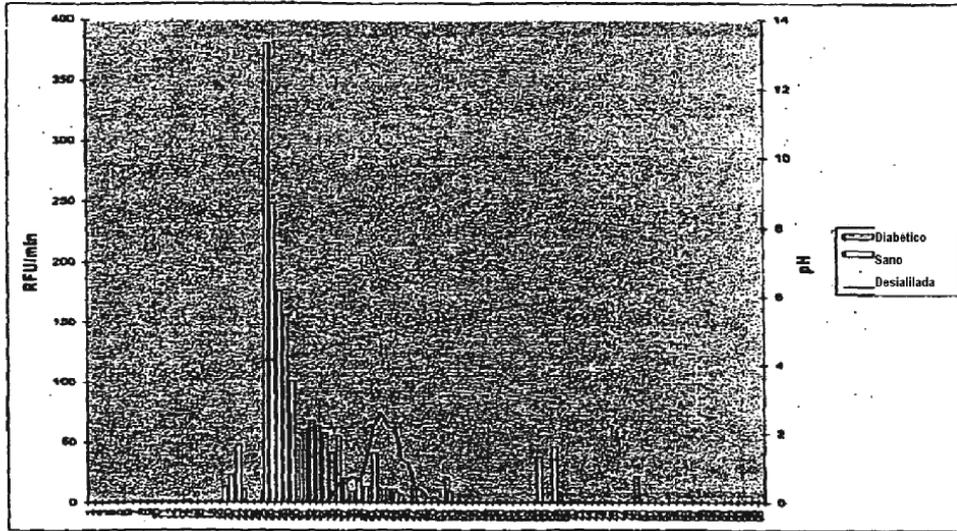


Fig. 11

S04, S05 y S11 están sanos, el resto son diabéticos (en diversos grados).

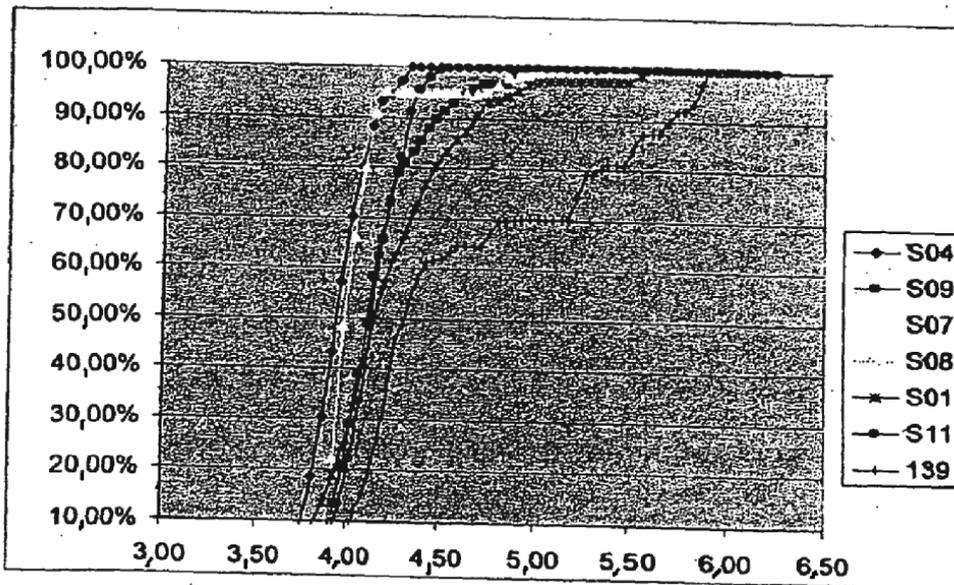
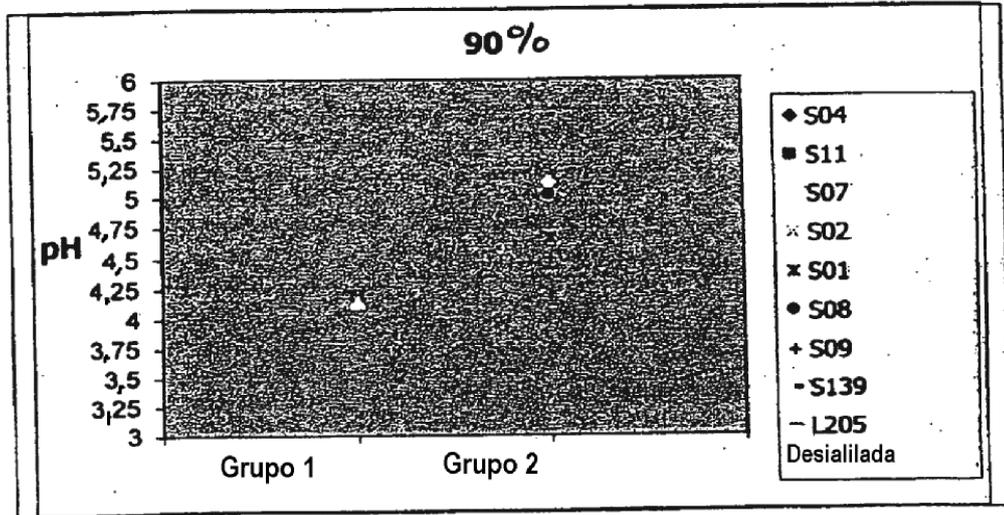


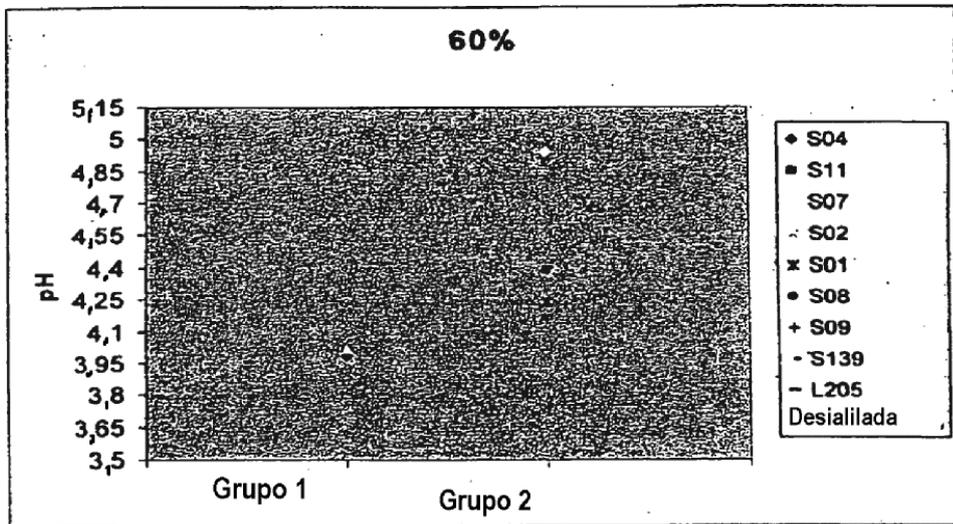
Fig. 12



Grupo 1: **S04, S11, S07, S02** (sanos)

Grupo 2: **S01, S08, S09, S139, L205** (diabéticos)

Fig. 13



Grupo 1: **S04, S11, S07, S02** (sanos)

Grupo 2: **S01, S08, S09, S139, L205** (diabéticos)

Fig. 14 Formas de correlacionar los parámetros medidos con la enfermedad

