

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 979**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/US2013/044008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184628**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13729199 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2856170**

54 Título: **Métodos de diagnóstico de la enfermedad valvular crónica**

30 Prioridad:

05.06.2012 US 201261655704 P

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

30.10.2018

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**LI, QINGHONG;
LAFLAMME, DOROTHY, P. y
HANNAH, STEVEN, S.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 687 979 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

Métodos de diagnóstico de la enfermedad valvular crónica

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional US nº 61/655704, presentada el 5 de junio de 2012.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La invención se refiere de manera general a métodos de diagnóstico de la enfermedad valvular crónica y en particular a métodos de diagnóstico de la enfermedad valvular crónica mediante la medición de metabolitos asociados a la misma.

Descripción de la técnica relacionada

20 Las enfermedades cardíacas son de los trastornos más comunes en los animales, incluyendo animales tales como los perros. Aproximadamente el 11% de los perros sufre de enfermedad cardíaca, 95% de los cuales aparecen en la edad adulta. Un tercio de los perros de más de 10 años de edad tiene enfermedad valvular crónica (EVC). La EVC se caracteriza por una degeneración y deformación progresiva de las válvulas auriculoventricular, más comúnmente las válvulas mitrales, resultando en insuficiencia valvular mitral precoz. Ello a su vez conduce a la aparición de un soplo cardíaco sistólico debido a la regurgitación mitral, en el que el cierre inadecuado de la válvula mitral provoca el flujo de retorno de sangre hacia la aurícula izquierda. Los perros afectados finalmente desarrollan sobrecarga de carga auriculoventricular izquierda, edema pulmonar, dilatación auricular y arritmias supraventriculares.

30 Aunque el tratamiento quirúrgico o médico de las válvulas afectadas resulta posible, los cuidadores animales y profesionales sanitarios prefieren la intervención nutricional. La detección y tratamiento precoces resultan esenciales. Sin embargo, la detección puede resultar difícil debido a la ausencia de síntomas.

35 Los biomarcadores correlacionados con una enfermedad o condición particular resultan útiles para detectar dicha enfermedad o condición en el caso de que el animal manifieste síntomas mínimos o sea asintomático o para el diagnóstico de dicha enfermedad o condición. En muchas situaciones, algunos metabolitos son biomarcadores útiles. De Laforcade et al., 2003, dan a conocer que el nitrito y el nitrato, que representan productos finales del metabolismo de NO, se encuentran incrementados en el suero de perros con enfermedad valvular crónica en comparación con los perros sanos. Por lo tanto, existe una necesidad de biomarcadores que resulten útiles para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en animales. Dichos biomarcadores permitirían a un cuidador animal o profesional sanitario a proporcionar el nivel de tratamiento más apropiado y eficaz, p.ej. evitar la cirugía, en caso posible. Dicho tratamiento mejoraría la calidad de vida del animal.

Sumario de la invención

45 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en animales.

50 Este objetivo y otros se consiguen utilizando métodos de diagnóstico de la enfermedad valvular crónica en un animal que implica obtener una muestra biológica del animal, analizar la muestra para la presencia de uno o más metabolitos asociados a la enfermedad valvular crónica; comparar la cantidad de cada uno de dichos metabolitos identificada en la muestra con una cantidad correspondiente del mismo metabolito presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y utilizar dicha comparación para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en el animal en el caso de que los metabolitos observados en la muestra del animal sean mayores o menores que la cantidad de los mismos metabolitos presentes en la muestra del animal de control, dependiendo del metabolito particular y si la cantidad de dicho metabolito en la muestra es conocido que se incrementa en animales que sufren de enfermedad valvular crónica o es conocido que se reduce en animales que sufren de enfermedad valvular crónica.

60 Otros objetivos, y objetivos, características y ventajas adicionales de la presente invención resultarán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

65 El término "animal" se refiere a cualquier animal susceptible de sufrir o que sufre de enfermedad valvular crónica.

Los términos "metabolito" o "biomarcador" se refieren a moléculas pequeñas, los niveles o intensidades de las cuales se miden en una muestra biológica, que pueden utilizarse como marcadores para diagnosticar un estado de enfermedad.

5 La expresión "animal de control comparable" se refiere a un animal de la misma especie y tipo o un animal individual evaluado en dos tiempos diferentes.

El término "diagnosticar" se refiere a determinar si un animal está sufriendo, o predecir si el animal es susceptible de desarrollar, enfermedad valvular crónica.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, los intervalos se expresan en la presente memoria abreviadamente, de manera que se evita listar y describir todos y cada uno de los valores dentro del intervalo. Puede seleccionarse cualquier valor apropiado dentro del intervalo, en caso apropiado, como valor superior, valor inferior o extremo del intervalo.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la forma singular de un término incluye el plural, y viceversa, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, las referencias "un", "una", "el" y "la" son generalmente inclusivas de los plurales de los términos respectivos. Por ejemplo, la referencia a "un método" incluye una pluralidad de dichos "métodos". De manera similar, los términos "comprende" y "comprendiendo" deben interpretarse de manera inclusiva y no excluyente. De manera similar, los términos "incluye", "incluyendo" y "o" deben interpretarse todos como inclusivos, a menos que dicha construcción se encuentre claramente negada por el contexto.

25 Los métodos y composiciones y otros avances dados a conocer en la presente memoria no se encuentran limitados a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente memoria, como apreciará el experto en la materia; pueden variar. Además, la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no limita el alcance de lo dado a conocer o reivindicado.

30 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos, términos de la técnica, y acrónimos utilizados en la presente memoria, presentan los significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en el campo o campos de la invención o en el campo o campos en los que se utiliza el término.

35 Todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, artículos técnicos y/o académicos, y otras referencias citadas o referenciadas en la presente memoria se encuentran incorporadas en su totalidad en la presente memoria como referencia en el grado permitido por la legislación. El comentario de dichas referencias pretende meramente resumir las afirmaciones realizadas en ellas. No se reconoce que ninguna de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones o referencias, o cualquier parte de las mismas, sean material relevante o técnica anterior. El derecho de negar la exactitud y pertinencia de cualquier afirmación de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones y otras referencias como material relevante o técnica anterior se encuentra específicamente reservado.

40 La invención

45 En un aspecto, la invención proporciona métodos para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en un animal. Las muestras se analizan para la presencia de uno o más metabolitos asociados a la enfermedad valvular crónica; comparando la cantidad de cada uno de dichos metabolitos identificados en la muestra con una cantidad correspondiente del mismo metabolito presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y utilizando dicha comparación para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en el animal en el caso de que los metabolitos observados en la muestra del animal sean superiores o inferiores a la cantidad presente en la muestra del animal de control. La cantidad o concentración de algunos metabolitos en dicha muestra es conocido que se incrementa en animales que sufren de enfermedad valvular crónica, mientras que la cantidad o concentración de algunos metabolitos en dichas muestras es conocido que se encuentra reducida en animales que sufren de enfermedad valvular crónica. El diagnóstico puede realizarse basándose únicamente en metabolitos que es conocido que se incrementan en cantidad tal como se ha indicado, únicamente metabolitos que es conocido que se reducen en cantidad tal como se ha indicado, o una combinación de los mismos.

55 En diversos ejemplos, los métodos comprenden obtener una muestra biológica del animal; analizar la muestra para la presencia de dos o más metabolitos asociados a enfermedad valvular crónica; comparar la cantidad de cada uno de dichos metabolitos identificada en la muestra con una cantidad correspondiente del mismo metabolito presente en una muestra de uno o más animales de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica; y utilizar dicha comparación para diagnosticar una enfermedad valvular crónica en el animal en el caso de que la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observada en la muestra del animal sea inferior a la cantidad presente en la muestra del animal de control, superior a la cantidad presente en la muestra del animal de control, o una combinación de los mismos.

60 La invención se basa en la observación de que los metabolitos de la invención se encuentran presentes en la

muestra biológica de un animal y de que la cantidad de los metabolitos en la muestra sirve como indicador bioquímico para diagnosticar la enfermedad valvular crónica indicando o prediciendo el umbral para enfermedad valvular crónica. La invención permite a los cuidadores y veterinarios u otros profesionales de la atención sanitaria a realizar ensayos de dichos "biomarcadores" en una muestra y a determinar si el animal es susceptible de sufrir o

5 sufre de enfermedad valvular crónica y de si existe una necesidad de diagnósticos o tratamientos adicionales. El establecimiento de la necesidad de diagnósticos o tratamientos adicionales justifica el coste y riesgo de dichos diagnósticos o tratamientos adicionales.

En diversas realizaciones, se evalúa uno o más animales de control comparables que no son el animal que se está evaluando para enfermedad valvular crónica y que se ha determinado que no sufre de enfermedad valvular crónica, para por lo menos uno de los metabolitos y los resultados de dichas evaluaciones se utilizan como valor de línea base para la comparación con los resultados de un animal que se está evaluando para dicho metabolito o metabolitos. En realizaciones preferentes, el valor de línea base para el metabolito se determina mediante la

10 evaluación de numerosos animales de control comparables.

En otras realizaciones, la cantidad de por lo menos uno de los metabolitos se determina para un animal en diversos tiempos durante la vida del animal y los resultados se utilizan para determinar si el animal es susceptible de sufrir o está sufriendo de enfermedad valvular crónica, p.ej. en el caso de que la cantidad de dicho metabolito o metabolitos se incrementa o se reduce (según sea el caso para el biomarcador particular analizado, dependiendo de si la

15 cantidad de dicho biomarcador es conocido que se incrementa o se reduce a medida que un animal desarrolla enfermedad valvular crónica) a medida que el animal envejece, puede diagnosticarse que el animal es susceptible de sufrir o está sufriendo de enfermedad valvular crónica. En realizaciones preferentes, el animal se evalúa periódicamente y se registran los resultados para los metabolitos analizados. A continuación, en el caso de que una evaluación posterior muestre que la cantidad de uno o más metabolitos se ha incrementado o se ha reducido (según

20 sea el caso para el biomarcador particular analizado dependiendo de si la cantidad de dicho biomarcador es conocido que se incrementa o se reduce a medida que un animal desarrolla enfermedad valvular crónica) desde la última o últimas evaluaciones, se diagnostica que el animal es susceptible de sufrir o sufre de enfermedad valvular crónica.

Cualquier muestra biológica que contenga el metabolito o metabolitos de interés resulta útil en la invención. Entre los ejemplos se incluye, aunque sin limitarse a ellos, sangre (suero/plasma), líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, heces, aliento, saliva o la biopsia de cualquier tejido. En una realización, la muestra es una muestra de suero. Aunque en la presente memoria se utiliza el término "suero", el experto en la materia reconocerá que también puede utilizarse

25 plasma o sangre completa o una subfracción de la sangre completa.

Las muestras biológicas se analizan para un metabolito particular utilizando cualquier método adecuado conocido de la técnica para dicho metabolito. Por ejemplo, y sin pretensión de ser limitativo en modo alguno, los extractos de muestras biológicas pueden someterse a análisis en esencialmente cualquier plataforma de espectrometría de masas, mediante inyección directa o después de la separación cromatográfica. Los espectrómetros de masas típicos

30 comprenden una fuente que ioniza moléculas de la muestra y un detector para detectar las moléculas o fragmentos de moléculas ionizados. Entre los ejemplos no limitativos de fuentes comunes se incluyen el impacto de electrones, la ionización por electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés), la ionización química a presión atmosférica (APCI), la fotoionización a presión atmosférica (APPI), la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), la ionización por desorción láser asistida por superficie (SELDI) y derivadas de las mismas. Entre los sistemas

35 comunes de separación y detección de masas pueden incluirse el cuadrupolo, la trampa de iones con cuadrupolo, la trampa de iones lineal, el tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés), sector magnético, ciclotrón iónico (FTMS), Orbitrap y derivadas, y combinaciones de los mismos. La ventaja de FTMS respecto a otras plataformas basadas en la EM es su elevada capacidad de resolución, que permite la separación de metabolitos que difieren únicamente en centésimos de dalton, muchos de los cuales podrían no detectarse en instrumentos de resolución más baja.

En realizaciones preferentes, las muestras biológicas se analizan para un metabolito seleccionado (biomarcador) utilizando la espectrometría de masas-cromatografía líquida (EM-CL), la cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) o la cromatografía líquida y la espectrometría de masas con trampa de iones lineal en el caso de que el método requerido sea un método de alto rendimiento.

40

Aunque la utilización de uno de los metabolitos resulta suficiente para diagnosticar la enfermedad valvular crónica, la utilización de uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más de dichos metabolitos se encuentra comprendida dentro de la invención y puede resultar preferente en muchas circunstancias. Los metabolitos pueden analizarse y utilizarse para un diagnóstico en cualquier combinación.

45

En algunos ejemplos, el diagnóstico se basa en la determinación de la cantidad de uno o más metabolitos seleccionados de glutamato, C-glucosilriptófano, beta-hidroxiisovalerato, glutatión oxidado, eritronato, N-acetilneuraminato, lactato, cis-aconitato, succinilcarnitina, malato, pentadecanoato (15:0), margarato (17:0), metil palmitato (15 o 2), 12-HEPE, hexanoilcarnitina, glicerofosforilcolina, 1-estearoilglicerofosfoinositol, N6-carbamoyltreoniladenosina, citidina, pantotenato, N-glicolilneuraminato, X - 11400, X - 12729, X - 13422, X - 13543, X - 14272, X - 16277, 12-HETE, tromboxano B2, sarcosina (N-metilglicina), beta-hidroxipiruvato, serina, treonina,

50

5 valina, metionina, dimetilarginina (SDMA + ADMA), gamma-glutamilmetionina, glucosa, 2-hidroxi octanoato, desoxicarnitina, 1-palmitoleoilglicerofosfocolina, 1-oleoilglicerofosfocolina, 2-oleoilglicerofosfocolina, 1-linoleoilglicerofosfocolina, 2-linoleoilglicerofosfocolina, 1-eicosadienilglicerofosfocolina, 1-araquidonoilglicerofosfocolina, 1-docosapentaenilglicerofosfocolina, 4-hidroximandelato, X - 03088, X - 04357, X - 11793, X - 11818, X - 12771, X - 12786 y X - 13494.

10 En otros ejemplos, el diagnóstico se basa en determinar si la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observados en la muestra del animal es superior a la cantidad presente en la muestra del animal de control, en el que los metabolitos son glutamato, C-glucosilriptófano, beta-hidroxiisovalerato, glutatión oxidado, eritronato, N-acetilneuraminato, lactato, cis-aconitato, succinilcarnitina, malato, pentadecanoato (15:0), margarato (17:0), palmitato de metilo (15 o 2), 12-HEPE, hexanoilcarnitina, glicerofosforilcolina, 1-estearoilglicerofosfoinositol, N6-carbamoiltreoniladenosina, citidina, pantotenato, N-glucosilneuraminato, X-11400, X-12729, X-13422, X-13543, X-14272, X-16277, 12-HETE y tromboxano B2. En un ejemplo preferente, el diagnóstico se basa en determinar si la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observados en la muestra del animal es superior a la cantidad presente en la muestra del animal de control, en el que los metabolitos son glutatión oxidado, N-acetilneuraminato, lactato, succinilcarnitina, hexanoilcarnitina, 12-HETE y tromboxano B2.

20 En un ejemplo, el diagnóstico se basa en determinar si la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observada en la muestra del animal es inferior a la cantidad presente en la muestra del animal de control, en el que los metabolitos son sarcosina (-N-metilglicina), beta-hidroxi piruvato, serina, treonina, valina, metionina, dimetilarginina (SDMA + ADMA), gamma-glutamilmetionina, glucosa, 2-hidroxi octanoato, desoxicarnitina, 1-palmitoleoilglicerofosfocolina, 1-oleoilglicerofosfocolina, 2-oleoilglicerofosfocolina, 1-linoleoilglicerofosfocolina, 2-linoleoilglicerofosfocolina, 1-eicosadienilglicerofosfocolina, 1-araquidonoilglicerofosfocolina, 1-docosapentaenilglicerofosfocolina, 4-hidroximandelato, X- 03088, X - 04357, X - 11793, X - 11818, X - 12771, X - 12786 y X - 13494. En un ejemplo preferente, el diagnóstico se basa en determinar si la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observada en la muestra del animal es inferior a la cantidad presente en la muestra del animal de control, en el que los metabolitos son dimetilarginina (SDMA + ADMA), glucosa y desoxicarnitina.

30 En diversas realizaciones, el animal es un animal canino, tal como un perro.

Ejemplos

35 La invención puede ilustrarse adicionalmente mediante los ejemplos a continuación, aunque se entenderá que estos ejemplos se incluyen meramente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención a menos que se indique específicamente lo contrario.

Ejemplo 1

40 Diseño del estudio. Se obtuvieron muestras de suero de dos grupos representativos de animales caninos. El grupo de control (11) no mostraba signos de enfermedad cardíaca y el otro grupo consistía en sujetos (18) en los que se que había sido diagnosticado anteriormente una enfermedad cardíaca. Las muestras se analizaron con el fin de obtener perfiles metabólicos y analizar los datos para biomarcadores indicativos de enfermedad cardíaca.

45 Preparación de las muestras. Todas las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. El procedimiento de preparación de las muestras se llevó a cabo utilizando el sistema automático MicroLab STAR® (Hamilton Company, Reno, NV). Se añadieron los estándares de recuperación antes de la primera etapa durante el procedimiento de extracción con fines de control de calidad. La preparación de las muestras se llevó a cabo utilizando una serie de extracciones orgánicas y acuosas para eliminar la fracción de proteínas, permitiendo simultáneamente una máxima recuperación de las moléculas pequeñas. El extracto resultante se dividió en dos fracciones: una para el análisis mediante cromatografía líquida (CL) y una para el análisis mediante cromatografía de gases (CG). Las muestras se introdujeron brevemente en un TurboVap® (Zymark, Claiper Life Science, Hopkinton, MA) para eliminar el solvente orgánico. A continuación, se congeló cada muestra y se secó bajo vacío. Seguidamente las muestras se prepararon para el instrumento apropiado, CL/EM o CG/EM.

55 Cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM, CL/EM²): La parte CL/EM de la plataforma se basaba en un UPLC Waters ACQUITY y un espectrómetro de masas Thermo-Finnigan LTQ (Thermo Fisher Corporation, Waltham, MA), que consistía en una fuente de ionización mediante electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés) y un analizador de masas de trampa de iones lineal (LIT) El extracto de muestra se dividió en dos alícuotas, se secó y después se reconstituyó en solventes compatibles con la CL ácidos o básicos, cada uno de los cuales contenía 11 o más estándares de inyección a concentraciones fijas. Se analizó una alícuota utilizando condiciones optimizadas para iones positivos ácidos y el otro utilizando condiciones optimizadas para iones negativos básicos, en dos inyecciones independientes utilizando columnas dedicadas separadas. Los extractos reconstituidos bajo condiciones ácidas se eluyeron en gradiente utilizando agua y metanol, en los que ambos contenían ácido fórmico al 0,1%, mientras que los extractos básicos, que también utilizaron agua/metanol, contenían bicarbonato amónico 6,5 mM. El análisis de EM alternó entre EM y barridos de MS² dependientes de datos utilizando exclusión dinámica.

- 5 Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM): Las muestras destinadas al análisis de CG/EM se secaron nuevamente bajo secado al vacío durante un mínimo de 24 horas antes de derivatizarse bajo nitrógeno seco utilizando bistrimetil-silil-trifluoroacetamida (BSTFA). La columna de CT era de fenilo al 5% y la rampa de temperatura iba de 40°C a 300°C en un periodo de 16 minutos. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de cuadrupolo único de barrido rápido Thermo-Finnigan Trace DSQ (Thermo Fisher Corporation, Waltham, MA) utilizando la ionización por impacto electrónico. El instrumento se ajustó y calibró para resolución y precisión de la determinación de masas diariamente. La salida de información a partir de los ficheros de datos en bruto se extrajo automáticamente tal como se explica posteriormente.
- 10 Determinación precisa de masas y fragmentación EM7EM (CL/EM), (CL/EM/EM): La parte de CL/EM de la plataforma se basaba en un UPLC Waters ACQUITY y un espectrómetro de masas Thermo-Finnigan LTQ-FT (Thermo Fisher Corporation, Waltham, MA) que presentaba un extremo frontal de trampa de iones lineal (LIT) y un extremo trasero de espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR). Para iones con recuentos superiores a 2 millones, pudo llevarse a cabo una medición precisa de la masa. Resultó posible 15 realizar mediciones precisas de la masa del ion parental y también de los fragmentos. El error típico de la masa era inferior a 5 ppm. Los iones con menos de dos millones de recuento requirieron un mayor esfuerzo para su caracterización. Los espectros de fragmentación (EM/EM) se generaron típicamente de manera dependiente de datos, aunque en caso necesario, pudo utilizarse EM/EM dirigida, tal como en el caso de señales de nivel más bajo.
- 20 Bioinformática: El sistema informático consistía en cuatro componentes principales: el sistema de gestión de información de laboratorio (Laboratory Information Management System, LIMS), el software de extracción de datos e identificación de picos, las herramientas de procesamiento de datos para el control de calidad e identificación de compuestos y una colección de herramientas de interpretación y visualización de la información para la utilización por analistas de datos. Las bases de hardware y software para estos componentes informáticos fueron la columna LAN y un servidor de la base de datos que operaba en Oracle 10.2.0.1 Enterprise Edition.
- 25 LIMS: El objetivo del sistema LIMS era permitir la automatización totalmente auditable del laboratorio mediante un sistema altamente especializado que fuese seguro y fácil de utilizar. El alcance del sistema LIMS comprende el acceso a las muestras, la preparación de las muestras y el análisis instrumental y generación de informes y análisis 30 avanzado de los datos. Todos los sistemas posteriores de software se basan en las estructuras de datos del LIMS. Se ha modificado para reforzar e interconectar los sistemas del propio laboratorio de extracción de información y visualización de los datos, así como la instrumentación y software de análisis de los datos de terceros.
- 35 Extracción de los datos y aseguramiento de la calidad: La extracción de los datos de los ficheros de datos en bruto del espectrómetro de masas rindió información que pudo cargarse en una base de datos relacional y manipularse sin recurrir a la manipulación BLOB. Una vez en la base de datos, se examina la información y se fijan límites de QC apropiados. Se identificaron los picos utilizando software de integración de picos y se almacenaron las partes componentes en una estructura de datos compleja separada diseñada específicamente.
- 40 Identificación de compuestos: Se identificaron los compuestos mediante la comparación con entradas en la biblioteca de estándares purificados o entidades desconocidas recurrentes. La identificación de las entidades químicas conocidas se basa en la comparación con entradas de biblioteca metabólica de estándares purificados. La combinación de propiedades cromatográficas y espectros de masas proporciona una indicación de una correspondencia con el compuesto específico o una entidad isobárica. Pudieron identificarse identidades adicionales 45 en virtud de su naturaleza recurrente (tanto cromatográfica como en los espectros de masas). Estos compuestos presentan el potencial de ser identificados mediante la adquisición futura de un estándar purificado correspondiente o mediante análisis estructural clásico.
- 50 Resultados. El número total de metabolitos detectado en el estudio fue de 506. Había 320 compuestos con nombre y 186 compuestos sin nombre. Los compuestos sin nombre representan una única molécula de fórmula molecular y estructura discretas pero no pudo relacionarse con un compuesto bioquímico actualmente conocido. De los 506 metabolitos identificados, se encontró que 54 eran estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$). Los metabolitos estadísticamente significativos se identifican en la Tabla 1.

55

Tabla 1

Metabolitos	Factores de cambio (Enfermo vs. Normal)
Glutamato	1,29
C-glucosilriptófano	132
beta-hidroxiisovalerato	1,18
Glutación, oxidado (GSSG)	2,32
Etitronato	1,25
N-acetilneuraminato	1,88
Lactato	1,32
cis-aconitato	1,30

Succinilcarnitina	1,50
Malato	1,30
Pentadecanoato (15:0)	1,36
Margarato (17:0)	1,57
palmitato de metilo (15 o 2)	1,49
12-HEPE	1,19
Hexanoilcarnitina	1,70
Glicerofosforilcolina (GPC)	1,64
1-estearoilglicerofosfoinositol	1,57
No-carbamoiltreoniladenosina	1,25
Citidina	1,39
Pantotenato	1,49
N-glucolilneuraminato	2,51
X - 11400	2,96
X - 12729	2,79
X - 13422	2,86
X - 13543	1,70
X - 14272	2,45
X - 16277	1,55
12-HETE	2,10
Tromboxano B2	1,80
Sarcosina (N-metilglicina)	0,73
beta-hidroxipiruvato	0,81
Serina	0,84
Treonina	0,71
Valina	0,82
Metionina	0,68
Dimetilarginina (SDMA + ADMA)	0,85
gamma-glutamilmetionina	0,57
Glucosa	0,91
2-hidroxiocetanoato	0,61
Desoxicarnitina	0,85
1-palmitoleoilglicerofosfocolina	0,49
1-oleoilglicerofosfocolina	0,62
2-oleoilglicerofosfocolina	0,42
1-linoleoilglicerofosfocolina	0,53
2-linoleoilglicerofosfocolina	0,48
1-eicosadienilglicerofosfocolina	0,60
1-araquidonoilglicerofosfocolina	0,55
1-docosapentaenilglicerofosfocolina	0,45
4-hidroximandelato	0,61
X - 03088	0,84
X - 04357	0,70
X - 11793	0,52
X - 11818	0,51
X - 12771	0,52
X - 12786	0,69
X - 13494	0,76

En la memoria, se han dado a conocer las realizaciones preferentes típicas de la invención. Aunque en la presente memoria se utilizan términos específicos, se utilizan en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no con fines limitativos. El alcance de la invención se proporciona en las reivindicaciones. Evidentemente resultan posible muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, se entiende que dentro del alcance según las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de maneras diferentes de las específicamente indicadas.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico de la enfermedad valvular crónica en un animal, que comprende:
 - 5 analizar la muestra obtenida del animal para la presencia del metabolito glutamato y opcionalmente un metabolito adicional asociado a la enfermedad valvular crónica, y
 - comparar la cantidad de cada uno de dichos metabolitos identificados en la muestra con una cantidad correspondiente de los mismos metabolitos presentes en una muestra de uno o más animales de control comparables que no sufren de la enfermedad valvular crónica, y
 - 10 utilizar dicha comparación para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en el animal en el caso de que la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observada en la muestra del animal sea superior a la cantidad presente en la muestra del animal de control.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de suero.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el diagnóstico se basa en determinar la cantidad de dos o más metabolitos asociados a la enfermedad valvular crónica.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el diagnóstico se basa en determinar la cantidad de tres o más metabolitos asociados a la enfermedad valvular crónica.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el diagnóstico se basa en determinar la cantidad de cuatro o más metabolitos asociados a la enfermedad valvular crónica.
- 25 6. Método según la reivindicación 1, en el que el metabolito adicional se selecciona del grupo que consiste en C-glucosiltriptófano, beta- hidroxisovalerato, glutatión oxidado, eritronato, N-acetilneuraminato, lactato, cis- aconitato, succinilcarnitina, malato, pentadecanoato (15:0), margarato (17:0), palmitato de metilo (15 o 2), 12-HEPE, hexanoilcarnitina, glicerofosforilcolina, 1-estearoilglicerofosfoinositol, N6- carbamoiltreoniladenosina, citidina, pantotenato, N-glicolilneuraminato, 12 -HETE, tromboxano B2, sarcosina (N- metilglicina), beta-hidroxi piruvato, serina, treonina, valina, metionina, dimetilarginina (SDMA + ADMA), gamma-glutamilmetionina glucosa, 2-hidroxi octanoato, desoxicarnitina, 1- palmitoleoilglicerofosfocolina, 1-oleoilglicerofosfocolina, 2-oleoilglicerofosfocolina, 1- linoleoilglicerofosfocolina, 2-linoleoilglicerofosfocolina, 1-eicosadienoilglicerofosfocolina, 1- araquidonoilglicerofosfocolina, 1-docosapentaenoilglicerofosfocolina, 4-hidroxi mandelato.
- 35 7. Método según la reivindicación 1, en el que el animal es un animal canino.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el animal es un perro.
- 40 9. Método para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en un animal canino, que comprende: analizar una muestra biológica obtenida del animal canino para la presencia de dos o más metabolitos asociados a la enfermedad valvular crónica, en el que uno de los metabolitos es el glutamato, y comparar la cantidad de cada uno de dichos metabolitos identificados en la muestra con una cantidad correspondiente de los mismos metabolitos presentes en una muestra de uno o más animales caninos de control comparables que no sufren de enfermedad valvular crónica, y utilizar dicha comparación para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observada en la muestra del animal canino sea inferior a la cantidad presente en la muestra del animal canino de control, en el que los metabolitos son sarcosina (N-metilglicina), beta-hidroxi piruvato, serina, treonina, valina, metionina, dimetilarginina (SDMA + ADMA), gamma-glutamilmetionina glucosa, 2- hidroxi octanoato, desoxicarnitina, 1-palmitoleoilglicerofosfocolina, 1-oleoilglicerofosfocolina, 2-oleoilglicero- fosfocolina, 1-linoleoilglicerofosfocolina, 2-linoleoilglicerofosfocolina, 1-eicosadienoilglicerofosfocolina, 1- araquidonoilglicerofosfocolina, 1-docosapentaenoilglicerofosfocolina, 4-hidroxi mandelato, y utilizar dicha comparación para diagnosticar la enfermedad valvular crónica en el animal canino en el caso de que la cantidad de cada uno de dichos metabolitos observada en la muestra del animal canino sea superior a la cantidad presente en la muestra del animal canino de control, en el que los metabolitos son glutamato, C- glicosiltriptófano, beta-hidroxi isovalerato, glutatión oxidado, eritronato, N-acetilneuraminato, lactato, cis- aconitato, succinilcarnitina, malato, pentadecanoato (15:0), margarato (17:0), palmitato de metilo (15 o 2), 12-HEPE, hexanoilcarnitina, glicerofosforilcolina, 1-estearoilglicerofosfoinositol, N6- carbamoiltreoniladenosina, citidina, pantotenato, N-glicolilneuraminato, 12 -HETE y tromboxano B2 o una combinación de los mismos.
- 60