

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 453**

51 Int. Cl.:

A61K 31/405	(2006.01)	G01N 33/68	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)	G01N 33/493	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)	G01N 33/49	(2006.01)
A61P 39/06	(2006.01)	G01N 33/483	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01)	A61K 47/50	(2007.01)
A61P 9/12	(2006.01)	A61K 47/64	(2007.01)
G01N 1/38	(2006.01)		
G01N 33/52	(2006.01)		
A61K 35/741	(2015.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2013 PCT/US2013/033918**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148709**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2013 E 13768233 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2830617**

54 Título: **Ipa como agente terapéutico, como agente protector y como biomarcador del riesgo de enfermedad**

30 Prioridad:

28.03.2012 US 201261616984 P
14.03.2013 US 201313829773

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2020

73 Titular/es:

IXCELA, INC. (100.0%)
135 South Road
Bedford, MA 01730 , US

72 Inventor/es:

MATSON, WAYNE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 769 453 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

Ipa como agente terapéutico, como agente protector y como biomarcador del riesgo de enfermedad

5 La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden ácido indol-3-propiónico (IPA) como agente terapéutico contra la aparición tardía de enfermedad cardiovascular y neurodegenerativa. La divulgación tiene utilidad particular en relación con enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Huntington (EH), enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de las neuronas motoras inferiores (EMN) incluyendo, pero sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson (EP), así como ictus y traumatismo craneal.

15 IPA es un indol producido en organismos tales como *C. sporogenes* que tienen la enzima para eliminar el OH de la posición 2 en la cadena lateral de ácido propiónico del ácido láctico de indol, un producto final del metabolismo del triptófano en especies de mamíferos. Es uno de varios metabolitos intestinales que afectan al metaboloma plasmático. Otros organismos, tales como levadura de cerveza, también muestran la capacidad de producir IPA (véase a continuación un medio para producir preparaciones de IPA purificadas usando levadura de cerveza u organismos similares). La interpretación actual es que el IPA actúa como antioxidante cuyo radical libre indoxilo positivo intermedio, a diferencia de compuestos tales como tocoferoles y carotenos, no tiene intermedios pro oxidantes y se ha demostrado *in vitro* que suprime la agregación de proteínas y se ha sugerido como un agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer. También se ha mostrado en estudios de cultivo que IPA suprime otras especies microbianas tales como *E. coli* (Pauley *et al.* Effect of Tryptophan analogs on depression of the Escheridia Coli Tryptophan Operon by Indole 3 propionic Acid: Journal of Bacteriology 219-226 (1978). Los inventores han mostrado que en plasma el IPA está fuertemente unido a las proteínas plasmáticas tanto albúmina como inmunoglobulinas con niveles plasmáticos normales de aproximadamente 200 ng/ml y niveles libres de aproximadamente 0,1 ng/ml. La capacidad de carga de plasma para IPA es de aproximadamente 10 ug/ml antes de que una carga adicional significativa muestre la linealidad del material libre con el material añadido. En estudios de carga de plasma, el IPA reemplaza otros indoles, tales como 3 hidroxiquinurenina y ácido 3 hidroxiantranílico, que se cree que tienen posibles efectos perjudiciales sobre la proteína. Los inventores han mostrado que en el ataque de radicales libres, el radical libre de iones positivos intermedios se une con la proteína como un resto de ácido quinúrico. El desplazamiento de otros indoles, la fuerte unión coordinada con la proteína y la defensa de la proteína contra el ataque de radicales libres que dejan un resto que no conduce a reticulación y desnaturalización son mecanismos que proporcionan protección y mejoran la funcionalidad de un organismo. Los inventores han mostrado que el IPA producido en el intestino entra en el plasma y cruza la BHE y se encuentra en el cerebro y el LCR. Los niveles fecales residuales son menores que los niveles en plasma e indican que la mayoría del IPA producido se transfiere al plasma. Derivados de IPA inyectados por vía intraperitoneal, tales como la amida (IPAM), se convierte rápidamente en IPA en el plasma. Los inventores también han identificado dos metabolitos de IPA que permiten controlar los niveles en muestras de excreción tales como orina que se correlacionan con los niveles en plasma y cerebro.

40 Muchas enfermedades de aparición tardía del SNC o del sistema cardiovascular tienen características de daño por radicales libres reflejados en la reducción de agentes protectores tales como tocoferoles, ascorbato, etc. y productos de daño de lípidos, proteínas de y ADN. Diferentes enfoques para controlar este objetivo en diferentes estructuras y procesos-antioxidantes tales como CoQ10 para reducir el daño de ADN y proteger la función mitocondrial, dietas lipídicas seleccionadas para reducir la oxidación lipídica, materiales tales como creatina para potenciar la eficacia energética y reducir la carga de radicales libres, ascorbato para proporcionar protección periférica general. Trastornos del SNC tales como DCL, EA y EH y en un grado más limitado EP y ELA también implican agregación de proteínas, actualmente considerada la causa proximal de muerte neuronal en enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos. No se han estudiado tan exhaustivamente agentes específicos para prevenir el daño a proteínas. Estas similitudes en la enfermedad de aparición tardía conducen al concepto de que hay un fallo en el control del sistema bioquímico que refleja la interacción y retroalimentación entre el transcriptoma del genoma, ambiente del metaboloma del proteoma y microbioma intestinal comensal. Este fallo de la retroalimentación es lo que de hecho es la enfermedad y que conduce con el tiempo a los síntomas. En consecuencia, se buscan lugares en la red donde los cambios genéticos o ambientales han creado un nivel de control no letal pero subóptimo. Estos nodos o compuestos se pueden evaluar después como productos terapéuticos o como factores de riesgo que, como el colesterol, por ejemplo, se pueden modificar para reajustar o restablecer el control. Los inventores han mostrado en modelos animales y en estudios en humanos que el genoma de los individuos determina la composición agregada del microbioma intestinal comensal y, en consecuencia, los niveles de I3PA producidos en el intestino. Los niveles de I3PA son, en cierta medida, una característica heredada y los niveles bajos que están presentes en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares constituyen una característica heredada que pone a los individuos en mayor riesgo de padecer estas enfermedades. Por tanto, aumentar estos niveles mediante complementación y/o modificación de la composición agregada del microbioma intestinal comensal es un enfoque para reducir el riesgo, así como un enfoque terapéutico para la intervención cuando dicho riesgo se ha hecho realidad en el desarrollo de síntomas de la enfermedad.

65 La red de interacciones bioquímicas en un individuo está determinada por el genoma del individuo, el efecto del genoma de los individuos sobre la microflora comensal de los individuos y la retroalimentación entre el genoma, el transcriptoma, el proteoma, metaboloma, el microbioma y el ambiente. En esta red de control hay compuestos y genes

individuales que constituyen factores de riesgo potenciales que pueden modificarse para mejorar la probabilidad de no desarrollar enfermedades de aparición tardía provocadas por un control no letal pero subóptimo. Un ejemplo bien conocido es el colesterol que está determinado tanto genética como ambientalmente.

5 Los inventores han descubierto que los niveles de IPA son indicadores específicos individuales del factor de riesgo para determinadas enfermedades. Más en particular, los inventores han identificado niveles reducidos de IPA en individuos que padecen enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Huntington (EH), EH presintomática, enfermedad de Alzheimer (EA) y deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de las neuronas motoras inferiores (ENMI), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson (EP) y en hipertensión, ictus e individuos con
10 cardiopatía isquémica, y también han mostrado que IPA está reducido en sujetos con cardiopatía isquémica que se someten a pruebas de esfuerzo mental y/o físico.

Los inventores han mostrado que los niveles de IPA no se ven afectados a corto plazo por ISRS o fármacos antihipertensivos. Los datos de estudios con muestras en serie muestran que IPA es una característica específica individual muy específica (figura 29). Los inventores han mostrado que los niveles de IPA están relacionados con la composición genómica del individuo a través del efecto del genoma del individuo sobre el genoma agregado del microbioma intestinal y que los niveles son muy constantes en un individuo en ausencia de intervención o posible desarrollo de determinadas patologías del intestino (figura 29). La especificidad individual de los niveles de IPA, la relación genómica, la prevalencia de niveles bajos en numerosos trastornos y en particular la progresión de niveles
15 secuencialmente menores en individuos normales, los individuos con MCT y e individuos con EA indican que es un factor de riesgo determinado genéticamente para el desarrollo de dichos trastornos de aparición tardía como enfermedades neurodegenerativas e hipertensión y cardiopatía isquémica. Por tanto, la razón de los niveles bajos de IPA puede ser tanto genética como ambiental, incluyendo diferentes situaciones de dieta y tensión de un individuo. Ya que es inherentemente más fácil influir en el genoma agregado del microbioma intestinal que en la composición
20 genética de un individuo, los inventores proponen una intervención terapéutica para reducir el riesgo usando IPA como marcador al centrarse en el aumento directo de los niveles de IPA o la modificación del intestino para aumentar los niveles de IPA. Ya que IPA está relacionado con la composición del microbioma intestinal, los inventores han desarrollado técnicas para mostrar que la modificación genética de los ratones crea un microbioma asociado único que indica que los niveles inherentes de IPA dependen de la modificación genética. Además, los inventores han
25 mostrado que el microbioma reflejado en la huella de los organismos en el material fecal es una característica específica individual de los sujetos humanos.

Por tanto, han descubierto que el IPA bajo, como el colesterol alto, es de manera innata un factor de riesgo hereditario para enfermedad que debe supervisarse y ajustarse mediante complementación terapéutica o modificación del
35 microbioma intestinal en la población con niveles bajos de IPA en su conjunto.

También han determinado que en determinados traumatismos tales como ictus, que reduce significativamente los niveles de IPA en LCR y plasma, o traumatismos potenciales tales como combate militar o deportes de contacto de alta intensidad, la complementación de IPA proporcionará un efecto protector contra daño oxidativo y a proteínas que se produce como secuelas.
40

Los inventores también han descubierto que la supervisión del nivel de IPA puede usarse provechosamente en el desarrollo de fármacos. Los ensayos de un agente terapéutico son caros en todas las fases, desde los estudios iniciales en animales hasta los ensayos de fase 1, 2 y 3 en seres humanos. En ensayos con animales, minimizar el número de cohortes de animales reducirá los gastos considerablemente, lo que puede lograrse mediante el uso de nuevas tecnologías con microtécnicas de análisis y mediante análisis de patrones totales de interacciones metabólicas que reducen la necesidad de sacrificar animales para estudios de búsqueda de dosis y farmacocinéticos.
45

En la fase 1, se pueden usar procesos similares de seguridad y tolerabilidad y búsqueda de dosis para desarrollar patrones bioquímicos basales individuales de diferencias en el metabolismo del agente terapéutico y sus metabolitos y patrones bioquímicos generales y relaciones de red. Dichos datos archivados de estudios de fase 1 proporcionan el valor inicial para una posible especificación de resultado o una posible contraindicación.
50

En los ensayos de fase 2, el uso de biomarcadores no invasivos se puede utilizar para una evaluación más completa del cumplimiento y la continuación de la adquisición de los datos archivados proporcionará de nuevo información acerca de la especificación y los efectos adversos e indicaciones de productos terapéuticos complementarios o procesos que revierten dichos efectos.
55

En la fase 3, la evaluación del cumplimiento con biomarcadores no invasivos permitirá una mejor evaluación del resultado terapéutico y verificará o validará cualquier biomarcador o anomalía bioquímica que esté contraindicada en el uso de un agente terapéutico.
60

Un problema persistente habitual en la evaluación de la carga corporal en ensayos con animales de un agente terapéutico y en la evaluación del cumplimiento en los ensayos en seres humanos es proporcionar un medio de supervisión no invasivo de los niveles del producto terapéutico o los efectos de una intervención. Un segundo problema potencial está en el desarrollo de un conjunto inicial de múltiples metabolitos y cambios en la red metabólica general
65

que pueden tener efectos perjudiciales específicos del individuo o grupales.

El proceso de desarrollo de marcadores de intervención terapéutica para supervisión y marcadores deletéreos potenciales implica una etapa inicial de cargar en un individuo de prueba animal o humano del compuesto de interés y posteriormente realizar pruebas de perfil metabolómico global en serie de orina, saliva y plasma y heces (o con ratones de orina, plasma, heces en serie y posteriormente cerebro, médula espinal y otros órganos). Los perfiles se analizan mediante coincidencia total de patrones no solamente para determinar la farmacocinética tradicional sino también para detectar e identificar cualquier metabolito del compuesto y cualquier cambio en la similitud propia general y los compuestos endógenos o las relaciones de los compuestos. Normalmente, se miden los perfiles metabolómicos para compuestos unidos de manera coordinada que producen respuestas de aproximadamente 1500-2000. Se han desarrollado protocolos para analizar compuestos desconocidos de importancia estadística. Después del uso del perfil metabólico global según la enseñanza anterior, se desarrollan métodos dirigidos rápidos para: (1) permitir supervisión rápida mínimamente invasiva o no invasiva o compuestos de importancia en ensayos farmacológicos y (2) permitir supervisión a nivel poblacional de compuestos relacionados con factores de riesgo de enfermedad para modificación y reducción de riesgos potenciales.

Como ejemplo, los inventores han desarrollado un sistema para evaluar los niveles de IPA en muestras tanto animales como humanas de orina puntual de 5-10 ul y/o sangre entera de punción digital de 20-50 ul. La supervisión en orina es posible debido al descubrimiento de dos metabolitos electroactivos de IPA en estudios de dosificación en ratones R6/2 (véase figura 30) de los que se aislaron y determinaron dos picos (figura 25), como se analizará a continuación. Usando tecnología de sensor coulombimétrico, se pueden determinar los coulombios totales y el número de electrones implicados en la oxidación de los materiales como 1. Esto permite la determinación directa de los moles de material excretado y la evaluación de la carga corporal del material. Los niveles de estos picos se correlacionan con los niveles de plasma en los ratones. Los mismos metabolitos aparecen en sujetos humanos y se correlacionan con el IPA en plasma. El ensayo puede realizarse en orina puntual líquida o más convenientemente en orina secada sobre papel de filtro, normalizando los valores de los metabolitos con respecto a creatinina o a las especies electroactivas integradas totales en la muestra.

El enfoque de papel de filtro puede generalizarse a cualquier metabolito de cualquier compuesto que pueda estudiarse.

La ventaja del descubrimiento de estos metabolitos en estudios con animales es que permite la supervisión de una cohorte de prueba sin ningún sacrificio de animales en las etapas iniciales para determinar la carga de dosis y las siguientes etapas para evaluar los niveles reales de fármacos durante los estudios de supervivencia y conductuales.

En ensayos en seres humanos, las mediciones urinarias y/o el uso de muestras de sangre de punción digital, ya sea solas o pasadas a matriz de papel de filtro, ofrecen un medio para supervisar tanto el cumplimiento como la adsorción de diversas formulaciones. Dichos métodos también ofrecen un protocolo conveniente para la adquisición de muestras para la evaluación de riesgo de los niveles de compuestos tales como TPA por parte de un individuo en el entorno doméstico para reducir los costes de supervisión a nivel poblacional.

Además de proporcionar un sistema para supervisar la complementación directa o el uso terapéutico de un compuesto, este protocolo también permite el seguimiento de protocolos para modificar el microbioma intestinal dirigido a aumentar los niveles de compuestos potencialmente beneficiosos tales como IPA o reducir los niveles de compuestos potencialmente perjudiciales tales como cresoles o benzoatos.

Adicionalmente, este protocolo dirigido rápido permite el desarrollo de un procedimiento para evaluar los niveles de IPA en perfiles archivados previamente y conjuntos de muestras en una serie de enfermedades neurológicas y estudios donde previamente no se había identificado estructuralmente antes del trabajo de los inventores en la concentración e identificación del pico con una concentración y protocolo de LCEC/ICMS paralelo.

El siguiente es un protocolo que han desarrollado los inventores adecuado para la evaluación de IPA mediante una muestra adquirida individualmente para permitir la determinación de los niveles de IPA; para determinar si el aumento de los niveles pondría al individuo en una categoría de menor riesgo y para aportar y supervisar estrategias para aumentar los niveles de IPA mediante complementación, modificación de la microflora intestinal o modificación dietética.

El kit contiene 4 tiras de papel de filtro de alta absorción etiquetadas como orina en ayunas AM, sangre en ayunas AM, orina no en ayunas PM, sangre no en ayunas PM en bolsas con cierre de cremallera con número de referencia clasificadas por colores individuales en un kit de envío aislado con una pequeña bolsa de hielo. Por la mañana, el individuo toma una muestra de orina a mitad de flujo en el papel de filtro etiquetado como orina en ayunas AM y una muestra de sangre de punción digital en el papel de filtro etiquetado como sangre en ayunas AM, colocando las muestras en las bolsas con cierre de cremallera adecuadas en el kit de envío. Por la tarde, el individuo toma una muestra de orina a mitad de flujo en el papel de filtro etiquetado como orina no en ayunas PM y una muestra de punción digital al papel de filtro etiquetado como sangre no en ayunas PM colocando las muestras en el kit de envío. Después, el kit de envío se envía por correo al laboratorio.

- Se determinan los niveles en orina de metabolitos de IPA y los niveles en sangre de IPA a partir de las muestras proporcionadas y se envía un informe basado en el número de referencia de la muestra a la dirección de correo. El informe identifica el quintil del nivel de IPA de los individuos y el riesgo relativo asociado con ese nivel. Si se indica, el informe sugerirá complementos y/o modificaciones adecuados para elevar los niveles de IPA. Estos pueden incluir IPA unido a proteínas y/o modificaciones sugeridas de la dieta. La eficacia de los complementos o las modificaciones se evaluará usando un segundo kit de prueba después de un periodo de 4-8 semanas.
- En determinados casos, los niveles de IPA pueden ser mayores que los niveles medios de control en más de 3 desviaciones típicas. En trabajos anteriores, los inventores han visto tales niveles en casos de trastornos intestinales tales como enfermedad celíaca, diverticulitis o síndrome de intestino permeable. El IPA alto como tal no es un diagnóstico de estos trastornos, pero es un indicador de que pueden estar presentes estos u otras anomalías del microbioma intestinal. En casos donde se encuentran tales niveles, no se recomendaría ninguna complementación, sino más bien una sugerencia de posible seguimiento por profesionales médicos.
- El modelo animal y los estudios en seres humanos de los inventores indican que el IPA se adsorbe mejor a través del intestino y, de manera óptima, las preparaciones de IPA deberían llegar al intestino antes de estar disponibles. Esto se puede lograr proporcionando el IPA en una forma unida de manera coordinada con proteína. Las formas unidas de manera coordinada no se liberan fácilmente mediante HCl a las concentraciones en el estómago.
- Considérese como ejemplo la enfermedad de Huntington (EH). (EH) es una enfermedad neurodegenerativa debilitante caracterizada por disfunción motora de inicio gradual, demencia, pérdida de peso y trastornos psíquicos. La EH se hereda de manera autosómica dominante y aparece en aproximadamente 5-10 casos por cada 100.000 individuos. Se manifiesta en todas las razas y grupos étnicos. En la actualidad, en Norteamérica, aproximadamente 30.000 personas se ven afectadas por la EH y es probable que cerca de otras 150.000 puedan desarrollar la afección. Aunque la edad de inicio varía desde la infancia hasta el principio de los ochenta, la edad promedio de inicio es al final de los treinta. La enfermedad progresa a lo largo de varios años en individuos aquejados, evitando con el tiempo que estos individuos actúen de manera independiente.
- Ocasionalmente, especialmente cuando la aparición de los síntomas se produce antes de los 20 años, los movimientos coreicos son menos prominentes; en cambio, predominan la bradicinesia y la distonía. A medida que el trastorno progresa, los movimientos involuntarios se vuelven más graves, se desarrollan disartria y disfagia y se altera el equilibrio. El trastorno cognitivo se manifiesta primero como lentitud del procesamiento mental y dificultad para organizar tareas complejas. La memoria se deteriora, pero las personas aquejadas no suelen perder la memoria de su familia, amigos y la situación inmediata. Dichas personas con frecuencia se vuelven irritables, ansiosas y deprimidas. Menos frecuentemente, se manifiestan paranoia y estados delirantes. El resultado de la EH es invariablemente letal; en un transcurso de 15-30 años, la persona aquejada queda totalmente discapacitada y es incapaz de comunicarse, lo que requiere cuidados a tiempo completo; se produce la muerte a partir de las complicaciones de la inmovilidad.
- Desafortunadamente, actualmente no se ha demostrado que ninguna terapia retarde el inicio o ralentece la progresión de la enfermedad, aunque se están realizando intentos de desarrollar tratamientos más eficaces. La amplia mayoría de las opciones de tratamiento actuales se dirigen a controlar los síntomas relacionados con la enfermedad y ayudar a maximizar una función del paciente.
- Los pacientes con EH son con mucha frecuencia muy sensibles a los efectos secundarios de los medicamentos.
- Se necesita tratamiento para pacientes deprimidos, irritables, paranoicos, excesivamente ansiosos o psicóticos. La depresión puede tratarse eficazmente con fármacos antidepresivos convencionales con la condición de que los fármacos con perfiles anticolinérgicos sustanciales pueden agravar la corea. También hay un conjunto de pruebas anecdóticas de que el ISRS sertralina puede provocar una serie de efectos secundarios indeseables específicamente en la EH. Los estudios de los inventores de sertralina en la depresión muestran una disminución, pero no reducción estadísticamente significativa de los niveles de IPA en 4 semanas de terapia con sertralina, que no se ve en estudios de niveles de IPA en sujetos que toman Citalopram o Escitalopram.
- A medida que progresa la EH, los efectos psiquiátricos, físicos y funcionales se vuelven más pronunciados, lo que conduce a la necesidad de mayores cuidados por parte de los familiares y proveedores de cuidados sanitarios.
- En 1993, el gen de EH se mapeó y clonó por primera vez. El gen codifica una proteína, que contiene 3144 aminoácidos y se denomina "huntingtina". En individuos con EH, una secuencia de repetición trinucleotídica (CAG_n) ubicada cerca del extremo 5' del gen se expande más allá del intervalo de repetición normal y esto provoca la traducción de una secuencia de poliglutamina expandida en la proteína. Los individuos normales tienen habitualmente entre 17 y 29 repeticiones de CAG. Los individuos con EH tienen más de 38 de estas repeticiones. Para los individuos que tienen más del número "normal" de repeticiones, existe una relación entre el número de repeticiones de CAG y la edad de aparición de la enfermedad, con un mayor número de repeticiones que conducen a un inicio más temprano de síntomas de la enfermedad. La correlación exacta aún se está investigando.

Resulta interesante que, en EH, solo determinados tipos de neuronas son diana de la enfermedad. Determinadas poblaciones de neuronas se degeneran, mientras que otras poblaciones menos vulnerables no se ven afectadas. El área más afectada por la neurodegeneración es el neocórtex, aunque las investigaciones han mostrado que también se produce pérdida neuronal en muchas otras regiones del cerebro. Los cambios tanto degenerativos como proliferativos en determinadas neuronas sugieren que la huntingtina mutada es la causa de programas genéticos compensatorios y degenerativos en un proceso que tiene lugar durante muchos años. La secuencia de acontecimientos comienza con la disfunción neuronal y con el tiempo conduce a la muerte.

Aún se desconoce mucho acerca de los mecanismos bioquímicos de la EH. Aún no se ha establecido y entendido completamente una ruta clara desde la mutación genética hasta la disfunción neuronal. La función de la huntingtina, una proteína predominantemente citoplasmática, se desconoce. Se expresa habitualmente y se ha descubierto que se propaga por las neuronas del cerebro. La mayoría de los individuos que tienen la enfermedad poseen alelos tanto normales como mutantes, que, en conjunto, crean cambios funcionales en los que la huntingtina mutante presenta efectos tóxicos.

Se ha sugerido que la proteólisis de huntingtina mutante y la liberación del fragmento tóxico N-terminal pueden desempeñar un papel directo en la causa de la enfermedad. En modelos humanos, animales y celulares, se ha mostrado que la presencia del fragmento N-terminal conduce a agregación de proteínas en el núcleo y el citoplasma. También se ha mostrado que interfiere con los procesos normales de las neuronas. En la ruta normal para la eliminación de agregados de proteínas, la ubiquitinación ayuda a eliminar estas estructuras no deseadas. Sin embargo, en el caso de los fragmentos N-terminales mencionados anteriormente, aunque se produce ubiquitinación, las proteínas aún permanecen. Se ha propuesto que este fenómeno puede resultar del plegamiento erróneo de la proteína y mecanismos fallidos de degradación de la proteína. Otros estudios de agregados de EH sugieren la capacidad de la huntingtina variante para secuestrar determinadas proteínas proteasómicas, chaperonas, huntingtina normal y factores de transcripción. Se han observado agregados de huntingtina en el tejido cerebral tanto de pacientes que murieron como resultado de tener EH como de aquellos en riesgo pero que murieron antes de presentar síntomas de EH.

Todavía hay mucha discusión con respecto al mecanismo exacto del daño provocado por agregados de huntingtina. La mayoría de las investigaciones sugieren que la toxicidad es creada por huntingtina mutante o sus fragmentos y sus interacciones con otras proteínas y factores de transcripción. La huntingtina mutante también puede desencadenar cascadas bioquímicas perjudiciales, que alteran el ambiente de modo que las proteínas relevantes se vuelven cada vez más susceptibles a la alteración por daño oxidativo, señales apoptóticas, agotamiento de energía y tensión excitotóxica. Todo esto podría conducir a una fisiología trastornada que da como resultado la muerte de neuronas.

Recientemente, un mayor entendimiento de estas causas de estos procesos bioquímicos ha permitido la propuesta de determinadas intervenciones terapéuticas. Algunas de estas se han estudiado mediante el uso de modelos de ratón transgénico para EH.

Existen numerosos desafíos inherentes al desarrollo de la creación de terapias para EH. En general, hay dos objetivos. El primero es poder tratar a los pacientes con EH retardando o previniendo el inicio de la enfermedad en aquellos que estén en riesgo genéticamente. El segundo objetivo es desarrollar terapias para ralentizar la progresión de la enfermedad en aquellos que ya están aquejados. La creación de ambos tipos de terapias es difícil y requiere mucho tiempo. En general, las terapias potenciales se prueban en primer lugar y se filtran a través de modelos genéticos de ratón de EH cuando los datos preclínicos sugieren que un compuesto puede actuar en un papel neuroprotector. Si el compuesto muestra con éxito eficacia en modelos de ratón, se evalúa en ensayos farmacológicos de fase 1. Desafortunadamente, la mayoría de los compuestos evaluados en este proceso son preexistentes.

Otro método que se utiliza es el método "aleatorio" en el que se prueban docenas de compuestos a la vez para ver si son capaces de aliviar la neurodegeneración en EH. Aunque es algo tosco, este enfoque ha ayudado a aumentar el número de compuestos de partida que se prueban contra EH.

Como se puede imaginar, el proceso anterior puede ser complejo y requerir mucho tiempo. Los modelos animales genéticos son representaciones costosas, lentas y no totalmente precisas desde el punto de vista genético de la condición "humana" de la EH, ya que los ratones R6/2 más habitualmente usados, normalmente viven solo 100 días. Los modelos de ratón con EH de mayor duración, tales como el CAG140, extienden significativamente el tiempo y coste de los ensayos iniciales con modelos animales. Idealmente, sería más útil descubrir biomarcadores de respuesta terapéutica a partir de modelos animales genéticamente modificados que afecten a las rutas, los mecanismos y los compuestos que son congruentes tanto en el ratón como en el ser humano, ya que ayudarían a los investigadores a determinar los efectos de una terapia particular en los animales y, por tanto, proporcionarían información mecánica sobre los posibles efectos del fármaco en seres humanos y una indicación de si el fármaco puede retardar el inicio de la neurodegeneración en el modelo humano así como en el de ratón.

En los ensayos de fase I y II surgen desafíos adicionales para el proceso. Aunque el descubrimiento de intervalos de dosis tolerables para los compuestos que se prueban en pacientes con EH es habitualmente un proceso sencillo, puede ser difícil encontrar "señales" cuantitativas que indiquen si el compuesto es eficaz. Un método, que permita la medida de estas "señales", sería por lo tanto muy importante, porque justificaría la continuación de estos estudios en

ensayos de fase III. Sin señales cuantitativas/biomarcadores tales como estos, es difícil justificar el estudio continuado de un compuesto particular, ya que los síntomas de la EH son bastante variables y su alteración no se correlaciona necesariamente con el alivio de la enfermedad en sí misma. Un ejemplo de este fenómeno se ve en el fármaco Haldol, que puede ayudar a disminuir la corea de un paciente, pero puede tener otros efectos secundarios perjudiciales. En este ejemplo, la mejora de los síntomas de la enfermedad no ralentiza realmente el proceso de la enfermedad, que en última instancia sería el resultado más positivo de un estudio farmacológico particular.

Por último, el desafío final surge en los ensayos clínicos de fase III. Las conclusiones de los estudios actuales en pacientes que presentan síntomas de la enfermedad se basan en cambios en las puntuaciones de CFT (capacidad funcional total), que requieren medir cientos de sujetos durante al menos 5 años para observar pequeños cambios (ralentización del 20 %) de la degradación. Para determinar si un tratamiento retarda realmente la aparición de los síntomas clínicamente, en pacientes con la mutación que son presintomáticos, pueden ser necesarios miles de sujetos y docenas de años de seguimiento para detectar ligeros cambios en la aparición de síntomas. Como se puede imaginar, cada una de estas pruebas requiere tiempo, financiación y gran esfuerzo por parte del investigador clínico. Por tanto, pueden probarse (y se prueban) muy pocas intervenciones. Por lo tanto, sería una gran ventaja poder descubrir tanto biomarcadores de progresión de la enfermedad como biomarcadores, que permitan determinar si la enfermedad se está ralentizando de manera más rápida, más sencilla y menos costosa.

El documento WO 2008/024914 A2 desvela 3-IPA como un agente para inhibir un efecto citotóxico de la proteína beta amiloide en una célula de un mamífero y un método para tratar una enfermedad fibrilógena en un ser humano. El 3-IPA se analiza para tratar enfermedades o afecciones en las que los radicales libres y/o la tensión oxidativa desempeñan un papel.

En el documento US 2004/029830 A1 se muestran composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades u otras afecciones en las que los radicales libres y/o la tensión oxidativa contribuyen a la patogenia. La composición comprende una mezcla de 3-IPA y quitosano. Se usa quitosano para formar una sal de 3-IPA, que presenta una mayor solubilidad en agua que el 3-IPA en sí mismo.

El documento US 6.395.768 B1 describe un método para prevenir un efecto citotóxico de la proteína beta amiloide en las células exponiendo las células a una cantidad eficaz de 3-IPA o una sal o éster del mismo.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, un ictus o un traumatismo craneal en un animal, incluyendo un ser humano, o para retardar o aliviar los efectos de dicha enfermedad o lesión en un animal que la padece, comprendiendo dicha composición ácido indol-3-propiónico unido a una proteína, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma.

En una realización preferida, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un alimento o bebida con una cantidad específica de IPA.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que contiene ácido indol-3-propiónico unido a una proteína para su uso en el tratamiento de animales susceptibles o que padecen una enfermedad neurodegenerativa, un ictus o un traumatismo craneal en un animal que necesite dicho tratamiento.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona ácido indol-3-propiónico unido de manera coordinada con una proteína para su uso como agente terapéutico para proteger a un animal que va a someterse a alto riesgo de lesión física contra daño neurológico.

En las anteriores patentes de los Estados Unidos n.º 6.194.217 y 6.210.970 del inventor, se divulgan métodos y sistemas para diagnosticar, supervisar y clasificar trastornos a partir de perfiles bioquímicos, en particular, el metaboloma, usando cromatografía líquida y detección electroquímica (LC-EC) para realizar perfiles de moléculas electroactivas en líquidos corporales tales como plasma, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), hisopados nasales, sudor u otro líquido corporal, para diagnosticar trastornos en individuos de prueba clasificando o diferenciando individuos en función de comparaciones de datos analíticos bioquímicos de inventario de moléculas pequeñas frente a bases de datos de casos conocidos o previamente diagnosticados. Aunque los estudios de LC-EC permiten diferenciar las diferencias bioquímicas entre pacientes que padecen EH u otras enfermedades neurodegenerativas o hipertensión, ictus o cardiopatía isquémica y controles, los estudios de LC-EC no permiten identificar de manera reproducible marcadores específicos o terapias potenciales para pacientes que padecen EH o enfermedades neurodegenerativas, o hipertensión, ictus o cardiopatía isquémica.

De acuerdo con la presente divulgación, los inventores emplearon una combinación de técnicas analíticas y de separación para separar e identificar perfiles de moléculas pequeñas de materiales de muestra individuales y agrupados para identificar marcadores específicos, para EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o ictus, y demostraron agentes terapéuticos para tratar a individuos que padecen EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o, más en particular, emplearon una combinación de matrices de LC-EC y LC-MS en paralelo y fuera de línea, para separar e identificar los compuestos de los perfiles de molécula pequeña de muestras individuales y agrupadas, para identificar marcadores específicos para EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o ictus y para supervisar y

demostrar los resultados de la intervención terapéutica. Debe observarse, sin embargo, que también podrían usarse provechosamente otras tecnologías analíticas y de separación, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, HPLC, TLC, análisis electroquímico, espectroscopia de masas, espectroscopia de índice de refracción (RT), espectroscopia ultravioleta (UV), análisis fluorescente, análisis radioquímico, espectroscopia de infrarrojo cercano (IR cercano), espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de dispersión de luz (LS) y otros métodos conocidos en la técnica. Usando las técnicas analíticas y de separación descritas anteriormente, los inventores han descubierto que el producto del microbioma intestinal ácido indol propiónico (IPA) se reduce drásticamente en pacientes que padecen EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o ictus, y que el tratamiento de pacientes que padecen EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o ictus con IPA y/o la modificación de la naturaleza del microbioma intestinal de un individuo que padece EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o ictus, es decir, aumentar el nivel de ácido indol-3-propiónico autóctono, puede retardar significativamente el tiempo antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad, así como la esperanza de vida, funcionalidad y calidad de vida de los individuos que padecen EH u otras enfermedades neurodegenerativas, o ictus. El aumento de los niveles de IPA en los dos cuartiles inferiores de los niveles de IPA de sujetos normales también reducirá potencialmente el riesgo de que estos individuos padezcan enfermedades neurodegenerativas o ictus.

El aumento de IPA en madres prenatales también puede prevenir la transmisión de EH o la tendencia al riesgo de otras enfermedades neurodegenerativas o ictus a la descendencia de un individuo.

Se ven características y ventajas adicionales de la presente divulgación a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, en donde:

- Las figs. 1A y 1B muestran una comparación en paralelo de dos cromatogramas de matriz de LC-EC fuera de línea que muestran una única muestra de plasma de paciente de control después de la precipitación de ACN (rodeada) y una única muestra de plasma de un paciente con EH diagnosticado después de la precipitación de ACN;
- Las figs. 2A y 2B muestran una comparación en paralelo de los mismos dos cromatogramas de matriz LC-EC fuera de línea ampliados en la región de 21-32 min;
- La fig. 3 es un mapa digital de datos exportados desde la matriz de LC-EC fuera de línea;
- La fig. 4 es un análisis determinante de mínimos cuadrados parciales que muestra la separación y el agrupamiento de las muestras con EH pre-sintomática, en riesgo de EH y con EH con puntuación de CFT 13 y controles sin EH;
- La fig. 5 es un análisis determinante de mínimos cuadrados parciales que compara muestras de control con pacientes con EH con una puntuación de CFT de 13;
- La fig. 6 es un análisis determinante de mínimos cuadrados parciales que compara muestras de control y pacientes con EH con una puntuación de CFT de 2-6;
- La fig. 7 es un análisis determinante de mínimos cuadrados parciales que compara muestras de pacientes con EH en estadio temprano con puntuaciones de CFT de 13 a puntuaciones de CFT de EH en estadio tardío de 2-6;
- Las figs. 8A y B son una comparación de las cromatografías de matriz de LC-EC de un sujeto de control y con EH, respectivamente, obtenidos de un método de gradiente de 100 min usando el sistema paralelo que ilustra la capacidad de la técnica para encontrar artefactos inesperados, tales como el uso no comunicado del analgésico Naproxeno en estudios de encuestas de sujetos de control frente a enfermos;
- La fig. 9 es un ejemplo de un pico de particular interés en plasmas con EH, 9A muestra la respuesta del pico aislado en la LC-EC paralela y 9B la respuesta de TIC correspondiente en la MS paralela;
- La fig. 10(A) es un espectro de MS/MS de los picos mostrados en la fig. 9, y
- La fig. 10(B) es una estructura propuesta para los picos candidatos;
- La fig. 11 muestra la MS de una fracción de acetonitrilo al 30 % del plasma de control;
- La fig. 12 muestra la MS de una fracción de acetonitrilo al 100 % del plasma de control y con EH;
- La fig. 13 es un mapa digital de los niveles de I3PA en ratones enfermos en comparación con los niveles de I3PA en compañeros de camada de tipo silvestre;
- La fig. 14 es un gráfico de barras que muestra los resultados del análisis de heces de ratones;
- La fig. 15 es un mecanismo de oxidación sugerido para I3PA;

- La fig. 16 es una representación de un fragmento digerido por PK;
- La fig. 17 son dos cromatogramas de matriz de LC-EC;
- 5 - La fig. 18 ilustra esquemáticamente la combinación de I3PA con ubiquitina como resultado de una reacción de "Fenton";
- La fig. 19 son cuatro espectros de masas de ubiquitina e I3PA;
- 10 - La fig. 20 son diagramas que muestran la distribución isotópica del ácido quinúrico unido de manera covalente y coordinada a la ubiquitina;
- La fig. 21 es un espectro de MS/MS de ácido quinúrico;
- 15 - La fig. 22 muestra el espectro de MS/MS del producto asignado como ácido quinúrico;
- La fig. 23 muestra la separación categórica del modelo de ratón de EH CAG140 de sus compañeros de camada de tipo silvestre en función de la huella del microbioma intestinal en las heces a los 19 días después del destete (panel izquierdo) y a los 3 meses (panel derecho). Las figuras mostradas son para una de las 5 pruebas de los modelos usando 2/3 conjuntos de entrenamiento y 1/3 conjuntos de validación. La tasa de clasificación correcta para estos modelos fue de 90 % y 83 %, respectivamente. Esto indica que la variante genómica impone una variación única en la composición agregada del microbioma intestinal a una edad muy temprana que persiste durante la maduración. IPA fue una variable importante principal que contribuyó a la separación.
- 20
- 25 - Fig. 24 Este modelo de PLS-DA muestra una separación similar en los ratones modelo de ELA G93A de sus compañeros de camada de tipo silvestre en función de la huella del microbioma intestinal y el efecto de la administración de creatina en ratones tanto de tipo silvestre como G93A al cambiar el microbioma intestinal a un estado diferente. Esto muestra que aunque el microbioma intestinal está determinado genéticamente, se puede modificar mediante intervención terapéutica. De nuevo, en este caso, I3PA fue una variable importante en la separación de los ratones modificados genéticamente y de tipo silvestre. Sin embargo, no fue cambiada significativamente por la creatina en este estudio.
- 30
- Las figs. 25A, B y C muestran cromatogramas de LCEC de muestra fecal adquirida en papel higiénico en isopropanol al 70 % y posteriormente se procesó y analizó, (el panel 1 es el esposo, el panel2 es la esposa). Las diferencias visuales notables se amplifican en la fig. 25C en la región de 75-80 min.
- 35
- La fig. 26 muestra las características básicas del método dirigido para I3PA. El panel de la izquierda muestra la reducción progresiva de I3PA en plasma de sujetos de control a sujetos con EH presintomáticos a sujetos con EH usando el protocolo de LC-EC de gradiente largo, que fue la justificación inicial para desarrollar un método dirigido; el panel central muestra la estabilidad de I3PA en plasma durante un periodo de una semana con una muestra de plasma a temperatura ambiente, lo que es crítico para métodos destinados a la exploración basada en la población y la respuesta de IPA y la linealidad del método en un método rápido de 8 min; el panel tres muestra la aplicación de una variante del método dirigido para muestras de orina que permitió la definición de dos metabolitos de IPA y, posteriormente, la capacidad de supervisar los niveles de IPA de la orina tanto en pruebas con ratones como en sujetos humanos.
- 40
- 45
- La fig. 27 muestra la linealidad del método dirigido con cromatogramas de método de gradiente largo donde I3PA se determinó mediante integración coulombimétrica de las respuestas sensoras dominantes, principales y siguientes de sensores coulombimétricos. Esto permitió el ensayo cuantitativo de I3PA en estudios históricos archivados, que se había realizado antes de la identificación estructural de I3PA y en archivos históricos de conjuntos de muestras.
- 50
- La fig. 28 muestra la separación de PLS-DA de esposo y esposa usando 8 y 6 muestras fecales tomadas durante un periodo de 1015 días, procesadas para determinar los perfiles de LC-EC como se muestra en la figura 25 y analizadas como proporciones de todos los picos resueltos. El valor atípico rodeado es una muestra extraída después de cinco días de terapia con antibióticos tras cirugía dental. Esto indica de nuevo el carácter específico del individuo del microbioma intestinal reflejado en la huella del microbioma intestinal en las heces y proporciona un medio para supervisar la composición y los cambios en el microbioma intestinal.
- 55
- La fig. 29 muestra un ejemplo de un diagrama de cajas ABNOVA de los niveles de I3PA en plasma en serie de sujetos de los que se han tomado muestras durante periodos de tiempo de 3 meses a 6 años, que demuestra que los niveles de I3PA son una característica específica del individuo y respalda de nuevo que los niveles de I3PA están en gran medida determinados genéticamente y, en consecuencia, los niveles bajos como se ve en las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares son un factor de riesgo para estas enfermedades.
- 60
- 65 - La fig. 30 muestra un resumen de los resultados de un estudio de carga del derivado de I3PA indol propionamida (IPAM). Este estudio condujo a la comprensión de que la correlación entre el plasma cerebral y la orina permite el

seguimiento de los animales en un ensayo de prueba de terapia que se puede realizar sin sacrificar a los animales y que se pueden realizar mediciones basadas en la población con micromuestras de orina o plasma. Como con otros estudios, también muestra niveles menores de IPA en los ratones modificados genéticamente frente a compañeros de camada de tipo silvestre. Los datos también indican que TPAM se convierte rápidamente en I3PA en plasma y menos rápidamente en el intestino, lo que sugiere que I3PA administrado al intestino a través de un vehículo adecuado es una mejor modalidad para terapia de complementación que IPAM.

Estudios iniciales:

10 Para identificar posibles candidatos de interés, se analizaron en primer lugar perfiles de 200 muestras de plasma de sujetos con EH en un ensayo farmacológico de creatina y 35 sujetos de control usando una matriz de LC-EC siguiendo las enseñanzas de la patente de los Estados Unidos 6.210.970. Para los fines iniciales señalados del estudio, se exportaron los datos para compuestos en rutas de tirosina, triptófano y purina que se hipotetizó que se verían afectadas. Los inventores también han exportado los datos en forma digital capturando toda la información en los perfiles. El análisis de estos datos entre sujetos con EH y controles reveló una región 50 % más baja en los sujetos con EH de alta significación $P = 10^{-8}$ en los canales 11 y 12 y 78,2 min. A partir de las características electroquímicas, los inventores sospecharon que esta región podría reflejar compuestos que contienen un resto de indol.

20 Después procesaron en muestras agrupadas grupos con adiciones y mezclas convencionales de 20 indoles variando la cromatografía para determinar la movilidad del patrón de mezcla de indol con el pico cualitativamente no identificado. En 5 condiciones de gradiente diferentes y con diferentes emparejamiento iónico/emparejamiento no iónico y fases móviles de pH, el compuesto desconocido coincidió con el tiempo de retención y la significación electroquímica del ácido indol propiónico. A continuación, los inventores procesaron más de 800 muestras de plasma de sujetos con EH y de control y modelos de ratón con EH R6/2 y CAG140 y confirmaron que el ácido indol-3-propiónico (I3PA) identificado cromatográficamente fue significativamente menor 42 % $p=10^{-6}$ tanto en seres humanos con EH como en ratón con EH. A partir de estos estudios, y debido a la congruencia del modelo de ratón y la respuesta humana, los inventores creyeron que I3PA sería un biomarcador fuerte del estado de EH y un biomarcador útil para la traducción de ensayos farmacológicos en ratones a seres humanos.

30 Después iniciaron estudios fuente de heces de ratones con EH y ratones de tipo silvestre que mostraron niveles menores de I3PA en los ratones con EH lo que confirma la fuente de la microflora intestinal, supuestamente *Clostridium sporogenes*. Los inventores analizaron pienso para ratones y alimentos humanos habituales y confirmaron que los niveles de I3PA eran demasiado bajos para dar cuenta de las concentraciones en plasma o cerebro.

35 Los inventores analizaron muestras de cerebro de modelos de ratón y cerebro humano cadavérico con EH para confirmar que el I3PA cruzó la barrera hematoencefálica y fue menor tanto en el cerebro de ratón con EH como en el cerebro humano con EH.

40 También crearon muestras agrupadas y con adiciones y realizaron procedimientos de aislamiento y concentración y modificaciones cromatográficas para permitir la confirmación estructural del pico de I3PA usando LC-EC/IC-MS paralelas.

45 Gracias al desarrollo de métodos dirigidos y la comparación de métodos dirigidos con los valores del método de encuesta extraídos y analizados por integración coulombimétrica (figura 27), los inventores también han realizado estudios de los niveles de IPA en diversas enfermedades adicionales y con diversas intervenciones farmacológicas expuestas a continuación, y registraron los resultados como se muestra a continuación.

50 Para hacer esto, volvieron a los estudios archivados y muestras de otras condiciones en estudios con la misma metodología que datan de 1992. Estos se emprendieron inicialmente para desarrollar diferentes marcadores e hipótesis. En estos estudios anteriores, lo que los inventores han confirmado ahora como I3PA se había identificado solo como un pico significativo para el que ahora se pueden obtener valores cuantitativos. Los inventores también evaluaron estudios en curso para determinar la especificidad de I3PA como marcador de EH, el efecto de los fármacos usados habitualmente para tratar síntomas de EH y los niveles de IPA en otras enfermedades. El sumario a continuación es de 17 estudios diferentes en los que los inventores usaron estadísticas de prueba de t de 2 colas convencionales para determinar la significación de los niveles de I3PA entre categorías y ABNOVA para determinar en qué medida los niveles de I3PA son una característica específica del individuo.

Enfermedad de Alzheimer

60 Estudio 1. En LCR (de la reevaluación de cromatogramas archivados de patentes de los Estados Unidos 6210970)
Control N=66 IPA medio 3,87 ng/ml
EA N=60 IPA medio 2,17 ng/ml
P=0,0014
Del trabajo actual

65 Estudio 2. En LCR

Controles N=38 IPA medio 4,05 ng/ml
 DCL N=39 IPA medio 3,41
 EA N = 40 IPA medio 2,95 ng/ml
 P EA frente a Control = 0,013
 P DCL frente a control = 0,052

5

Estudio 3. En plasma
 Controles n=30 media 189,3 ng/ml
 EA N=30 media 154,3
 P=0,046

10

Esclerosis lateral amiotrófica ELA

Estudio 4. En plasma (del nuevo ensayo de subalícuotas archivadas de (7))
 Controles N=30 media 192,3 ng/ml
 ELA y enfermedad de las neuronas motoras inferiores N=30 media 167,8 ng/ml
 P=0,032

15

Estudio 5. En LCR (del nuevo ensayo de subalícuotas archivadas de (7))
 Control N=21 media 3,25 ng/ml
 ELA N=19 media 2,24 ng/ml
 P=0,054

20

Estudio 6. En plasma (de la reevaluación de cromatogramas archivados de (2)) Control N=27 media 201,2
 ELA N=23 media 172,0
 P=0,029
 Del trabajo actual

25

Estudio 7. En LCR
 Control N=30 media 4,13 ng/ml
 ELA N=30 media 2,89 ng/ml
 P=0,018

30

Estudio 8. En plasma
 Control N=56 media 201,4
 ELA N=48 media 172,7
 P=0,0072

35

Enfermedad de Parkinson

Estudio 9. En LCR (de la reevaluación de cromatogramas archivados del estudio de deprinilo DATATOP (1)) Controles
 N=47 media 4,25 ng/ml
 EP al inicio N=59 media 3,01 ng/ml
 P=0,035
 Sujetos al inicio frente a tratados con deprinilo p=0,45
 ABNOVA para muestras en serie p=6,3*10exp-7

40

45

Estudio 10. En plasma (de la reevaluación de cromatogramas archivados de (3,4)) Controles N=20 Media 186,9
 EP sin medicación Media 172,2
 P=0,051

50

Estudio 11 En controles de plasma
 N=30 Media 196,01
 EP sin medicación Media 167,90
 P=0,032

55

Enfermedad cardiovascular (ejemplo comparativo)

Del trabajo actual
 Sujetos con cardiopatía isquémica antes y después de someterse a pruebas de esfuerzo mental

60

Estudio 12. En plasma
 N=20
 Media basal 175,3
 1 hora después de la prueba de esfuerzo mental media 161,3 ng/ml
 Medida inicial frente a todos los controles todos los estudios P=0,0016

65

Medida inicial grupal frente a después de esfuerzo $P=0,045$
 El grupo con cambio se normaliza a la medida inicial $P=0,0014$

Ictus:

5 Estudio de 40 sujetos con ictus hemorrágico y/o isquémico. Muestras de LCR, plasma yugular ipsilateral y contralateral. (De la reevaluación de cromatogramas archivados de muestras del Centro de Ictus de la Primera Universidad Médica Rusa)
 N=40

10 Estudio 13. En plasma
 Ictus hemorrágico N=18 media 102,1 ng/ml ipsilateral 112,09 ng/ml contra ictus isquémico lateral n=22 media 88,7 ng/ml ipsilateral 83,1 ng/ml contralateral valor de p de todo el plasma frente a otros controles $p=10\text{exp}-6$

15 Estudio 12. LCR
 Ictus hemorrágico N=18 media 1,02 ng/ml
 ictus isquémico n=22 media 0,91 ng/ml
 valor de p de todo el LCR frente a otros controles $p=10\text{exp}-8$

20 Los antidepresivos y antihipertensivos tienen poco efecto sobre el IPA (ejemplo comparativo)

Efectos farmacológicos

25 Estudio: Estudio de depresión de sertralina (de la reevaluación de cromatogramas en (5)) Estudio 15. En plasma
 n=57 medida inicial 1 y 4 semanas
 Medida inicial media 192,4 ng/ml
 4 semanas media 186,3 ng/ml
 Valor de p grupal antes y después $p=0,41$

30 Valor de P normalizado con respecto a la medida inicial $p=0,1$
 Prueba de ABNOVA de auto-similitud 3 muestras en serie $p=2,6*10$
 EXP-11

Estudio de depresión de escitalopram/citalopram
 Del trabajo actual
 Estudio 16. En plasma

35 N=150 medida inicial 4 y 8 semanas
 Medida inicial media 205,15
 8 semanas media 210,09
 Medida inicial del valor de p grupal frente a 8 semanas $p=0,87$
 Valor de p normalizado con respecto a la medida inicial $p=0,67$

40 Prueba de ABNOVA de auto-similitud 3 muestras en serie $p=9,1*10$
 EXP-14
 Estudio de hipertensión arterial de atenolol
 Del trabajo actual

45 Estudio 17. En plasma
 N=40 medida inicial y 8 semanas
 Medida inicial media 169,7
 8 semanas media 160,5
 Medida inicial del valor de p grupal frente a 8 semanas $p=0,81$

50 Valor de p normalizado con respecto a la medida inicial $p=0,71$
 Media grupal de sujetos hipertensos frente a todos los controles del estudio $p=0,0007$

Además los inventores confirmaron que I3PA es un marcador de enfermedad progresiva en EH.

55 Reducción de EH presintomática frente a los controles y reducción adicional después de la fenocversión y desarrollo de síntomas. Los inventores han confirmado que IPA se reduce de manera estadísticamente significativa en otras enfermedades neurodegenerativas, aunque no en la medida de la EH, y que no se ve afectado por los ISRS y los medicamentos antihipertensivos usados en EH y otros trastornos neurodegenerativos para controlar los síntomas simultáneos. También se reduce en cardiopatía isquémica, ictus e hipertensión, aunque resulta interesante que no se ve afectado por el tratamiento habitual para la hipertensión con atenolol.

60 Basándose en estos estudios, los inventores han observado:

65 (1) I3PA menor es un biomarcador de estado progresivo en EH que es característico de EH. Los niveles de IPA no se ven afectados por la depresión o por fármacos usados habitualmente para tratar la depresión o la hipertensión, efectos secundarios, síntomas de la enfermedad o comorbilidades;

(2) I3PA también es menor en otras enfermedades neurodegenerativas, pero no en la misma medida que en EH y menor en cardiopatía isquémica e hipertensión e ictus;

5 (3) I3PA también es un biomarcador de estado progresivo en modelos de ratón con EH;

(4) I3PA cruza la barrera hematoencefálica y puede desempeñar un papel como antioxidante y en la supresión de la agregación de proteínas; y

10 (5) la fuente de I3PA es la microflora intestinal con aporte dietético directo mínimo. Estos hallazgos sugieren el uso de I3PA como biomarcador de estado y progresión en EH:

(A) como biomarcador de intervención terapéutica en ensayos farmacológicos; y

15 (B) como biomarcador para evaluar/aumentar la probabilidad de que un fármaco que funciona en ratones funcione en personas.

(6) IPA es un compuesto cuyos niveles son una característica específica del individuo mostrada en la figura 29 que respalda adicionalmente la determinación genética de los niveles de IPA y la indicación de que dichos niveles constituyen un riesgo genético modificable de desarrollo de determinados trastornos neurológicos y cardiovasculares.

20 Esto sugiere que el genoma del individuo afecta/determina el genoma agregado del microbioma intestinal de los individuos. Esto significa que para muchas enfermedades con un componente genético (hipertensión, autismo, ELA con gen mutante de SOD, EH, EP ligada a la genética, AD ligada a la genética) se debería tratar el intestino y supervisar la microflora intestinal agregada, ya sea a través de perfiles metabólicos en plasma u orina, a través de medidas en heces o mediante nuevas tecnologías que usan enfoques de EM para la identificación bacteriana. El I3PA es un descubrimiento inicial que usa estos conceptos y enfoques que pueden actuar como agente terapéutico y como agente para reducir el riesgo de enfermedad en individuos con niveles bajos de I3PA provocados genéticamente por la baja producción del agregado del microbioma intestinal comensal.

25 Después de los estudios iniciales de los inventores, estos acometieron estudios detallados de la siguiente manera: El acoplamiento de tecnologías de separación y analíticas tales como matriz de LC-EC y tecnologías de MS juntas en un sistema paralelo de matriz de LC-EC-MS, proporciona una herramienta potente para identificar metabolitos en EH. En las investigaciones de los inventores descritas en este capítulo, se usaron tanto la matriz de LC-EC fuera de línea como la MS fuera de línea, así como la matriz de LC-EC-MS en paralelo, para llevar a cabo una investigación preliminar de muestras de plasma de EH frente a control para evaluar las diferencias en las firmas metabólicas entre estos dos grupos.

40 Se evaluaron 391 muestras de plasma de 150 sujetos inscritos en un "Estudio de biomarcadores de EH" en curso y 40 sujetos de control sanos. El número de muestras recogidas de un paciente cualquiera varió según el momento en que se inscribieron en el estudio. Por tanto, este número varió de una muestra a seis, según el paciente. Las muestras usadas para el análisis se seleccionaron en función de la puntuación de CFT (capacidad funcional total) asociada con el paciente en el momento de la recogida de la muestra. La puntuación de CFT es una escala empleada por los médicos para designar en qué medida la enfermedad afecta al individuo. La escala varía de 1-13, siendo 1 el más gravemente afectado y siendo 13 el menos gravemente afectado.

50 Para crear una base de datos inicial de compuestos que difieren entre EH y los controles, todas las muestras se analizaron usando LC en gradiente optimizado para la matriz de EC siguiendo las enseñanzas de la patente estadounidense 6.210.970 mencionada anteriormente del inventor. Se realizaron análisis de LC-EC en gradiente usando bombas ESA modelo 582 (ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA) y un detector CoulArray modelo 5600 de ESA de 16 canales. Los canales 1-15 usaron electrodos coulombimétricos en serie configurados en incrementos iguales de 56 mV de 0-840 mV. El canal 16 se ajustó a 870 mV. Se usaron dos columnas de 4,6 mm x 250 mm de serie C 18 de 5 μ m (ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA). El gradiente empleado fue lineal de 0 % de fase A (ácido pentanosulfónico de sodio 0,1 M con ácido acético al 5 %) a 100 % de fase B (80/10/10 MeOH/isopropanol/acetonitrilo con acetato de litio 0,06 M; ácido acético al 7 %). El gradiente lineal se empleó hasta 84 minutos, después se procesó 100 % de B hasta 110 minutos. El caudal fue de 1 ml/min.

60 Se prepararon muestras de plasma mediante un método convencional de la siguiente manera. Se precipitó plasma (125 ml) con 500 ml de ACN/ácido acético al 0,4 %, se agitó en vórtex durante 30 s y se centrifugó a 21.000 xg durante 25 min a 4 °C. El sobrenadante (500 ml) se evaporó por centrifugación y se reconstituyó a 100 ml en fase móvil A; Se inyectó una alícuota de 50 ml en el sistema. Durante la preparación de la muestra, se crearon grupos a partir de volúmenes iguales de subalícuotas de todas las muestras. Los ensayos se procesaron en secuencia de la siguiente manera: un conjunto de patrones de diagnóstico combinados (que incluyen 80 compuestos conocidos), un grupo de todas las muestras del estudio, 8 muestras individuales del estudio, los mismos patrones de diagnóstico que los anteriores y un grupo global. Esta secuencia se repitió hasta que se habían procesado todas las muestras. Las órdenes

de ejecución de todas las muestras individuales en el estudio fueron aleatorias. Estas secuencias minimizaron los posibles artefactos analíticos durante el procesamiento de datos. Se usaron grupos para evaluar la precisión de todo el conjunto de datos. Además, los grupos se usaron como referencias para la normalización con respecto a tiempo (estiramiento máximo).

5 Todos los cromatogramas en el estudio se corrigieron con respecto al fondo para eliminar la deriva de la línea de referencia inherente a los perfiles de gradiente. Al controlar las condiciones analíticas, la ubicación de cualquier pico particular en un cromatograma de 110 minutos de 16 canales se mantuvo dentro de +/- 5-30 segundos durante todo el estudio. Los archivos con corrección con respecto al fondo se normalizaron después secuencialmente con respecto al tiempo frente a un grupo único en el medio de la secuencia de estudio. En primer lugar se usó un protocolo de estiramiento de dos etapas con una multitud de picos. En primer lugar, se usó software ESA CEAS 512 para alinear 15-20 picos principales en el cromatograma e interpolar las posiciones entre ellos. Después, se seleccionaron 20-25 picos más pequeños adicionales presentes en la mayoría de las muestras del archivo derivado y estos se realinearon, manteniendo los picos principales en la misma posición. Los picos seleccionados se alinearon dentro de +/- 0,5 segundos y los picos no seleccionados dentro de +/- 1 a 5 segundos durante el ensayo completo de 110 minutos.

Los inventores exportaron los datos en forma de un mapa digital. El uso del resultado digital completo tuvo dos fines: (1) capturar toda la información analítica para futuros análisis de datos; (2) evitar posibles artefactos introducidos por algoritmos de búsqueda de picos. El número de variables en los mapas digitales dependió de la resolución establecida durante la exportación de datos. En este trabajo, la resolución se estableció en 1,5 s y el número de puntos de datos (variables, definidos como la señal en un momento dado en un canal dado) obtenidos de una muestra, usando el enfoque de matriz de LC-EC actual de los inventores, fue de 66.000. El número de variables en un mapa digital no es equivalente al número de analitos, debido a que un analito individual está representado por más de una variable. Dependiendo de la concentración de un analito y de su separación a través del cromatograma de matriz de EC, El número de variables que caracterizan un analito podría ser entre 10 y 100. En los archivos consolidados de un estudio, todas las variables se alinearon en una hoja de cálculo para análisis de datos representando cada columna una sola muestra organizada por tiempo desde el canal 1 al 16. Cada fila de una hoja de cálculo representa la respuesta de un compuesto (variable) en un momento y canal específicos para todas las muestras. Este enfoque evita artefactos en la reducción de datos y protege contra el ajuste excesivo en el análisis de datos. Antes del análisis de datos, se eliminaron las filas de los mapas digitales para las que todos los valores eran negativos o inferiores a 30 pA (el nivel de ruido de un método analítico) para todas las muestras.

Los datos obtenidos de los mapas digitales se analizaron usando análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). PLS-DA puede encontrar componentes individuales que clasifican o explican mejor la variación en un conjunto de datos. Dentro de un conjunto de datos dado, los modelos de PLS-DA se pueden probar desarrollando el modelo en un subconjunto de los casos y usando las variables para probar la especificidad y selectividad de los casos restantes. Por tanto, se usó software SI MCA-P para crear tres modelos de PLS-DA. Esos modelos incluyeron: controles frente a muestras con EH con puntuación de CFT 13; controles frente a muestras con EH con puntuaciones de CFT 2-6; y EH con CFT 13 frente a EH con CFT 2-6. También se generaron listas de variables de importancia (VIP). Estas son las variables (picos) que mejor definen la separación entre los diversos grupos de datos. Se generaron tablas de VIP en todos los PLS-DA. Cada tabla proporciona el canal de EC dominante y el tiempo de elución de la VIP particular.

Para verificar si las VIP sugeridas por el software PLS-DA eran reales, se realizó inspección visual en grupos de 16 muestras del canal 1 al 16 usando el software CEAS. Se compararon diversos grupos, incluyendo muestras de control frente a diversos agrupamientos de muestras de EH por puntuación de CFT. Se observaron VIP que parecían ser más uniformes y prominentes, como candidatos para identificación.

Se realizaron análisis de LC-MS usando bombas ESA modelo 582 (ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA) y un detector CoulArray modelo 5600 de ESA; canales 1-12, 0-840 mV en incrementos de 70 mV (ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA) acoplado en línea a un espectrómetro de masas cuadrípulo ortogonal de tiempo de vuelo (Qo-TOF) QS-tar (Sciex/Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con una fuente de iones ESI. Los inventores usaron secuencialmente modos de exploración de iones tanto positivos como negativos (m/z 100-2000, tensión de pulverización de iones 4,5-5,5 kV). Las mezclas de metabolitos se separaron en una columna de 4,6 mm x 250 mm (5- μ m Shiseido C 18) a un caudal de 0,8 ml/min. El eluyente de HPLC se dividió en una proporción de 9:1 dirigiéndose el 90 % a la matriz de EC y administrándose el 10 % a la MS.

Las muestras de plasma con EH y de control no fraccionadas se diluyeron entre 1:10 veces en la fase móvil A. La dilución se basó en las cantidades relativas de los compuestos de interés y el requisito de 1) realizar múltiples ejecuciones diferentes con diferentes parámetros de LC y MS 2) para conservar material para estudios posteriores de MS. Las muestras se ensayaron usando un método de gradiente. El gradiente empleado fue lineal desde 0 % de fase A (acetato de amonio 0,2 M, MeOH al 5 %) hasta 80 % de fase B (acetato de amonio 0,2 M, MeOH al 80 %). El gradiente lineal se empleó hasta 100 min, después se procesó 100 % de B hasta 110 min. El caudal fue de 0,8 ml/min.

Se usó un método MS de adquisición dependiente de información (IDA) para supervisar las señales de iones más intensas en el intervalo m/z 100-1000 y para fragmentar cada uno de estos componentes con la energía de colisión

establecida en 50 eV y el cuadrupolo configurado en baja resolución. Usando este método, se supervisaron los tiempos de retención de compuestos de interés se controlaron a medida que pasaban por el espectrómetro de masas. Además, los inventores compararon estos tiempos de retención con los de los picos detectados por el análisis simultáneo de matriz de EC y para obtener valores iniciales para masas parentales de los compuestos y para obtener la fragmentación de MS/MS relevante.

El método paralelo de matriz de LC-EC-MS realizado en el espectrómetro de masas Qo-TOF ayudó a los inventores a determinar las masas de los metabolitos de interés, que se habían seleccionado para la identificación de MS usando el método de matriz de LC-EC fuera de línea. El fin de obtener estos datos preliminares de MS fue permitir a los inventores centrarse en estas masas particulares al obtener masas exactas usando un espectrómetro de masas de mayor resolución.

Se realizaron análisis cualitativos iniciales mediante observación visual de los cromatogramas obtenidos del sistema paralelo de matriz de LC-EC-MS. Los cromatogramas se superpusieron usando el software CoulArray y se compararon en los 12 canales. En primer lugar, los cromatogramas se compararon agrupando muestras de puntuaciones de CFT similares y después mediante comparación cruzada en una serie de puntuaciones de CFT frente a muestras de control. Diez picos se consideraron "de interés" en función de los siguientes criterios: a) los picos estaban presentes solo en muestras de EH; b) los picos estaban presentes solo en muestras de control; c) los picos cambiaron en intensidad a medida que las puntuaciones de CFT cambiaron a lo largo del transcurso de la progresión de la enfermedad; d) los picos tenían una intensidad lo suficientemente alta como para sugerir que los componentes serían identificables por EM. Después de seleccionar los picos de posible interés, se usaron datos de IDA para determinar las masas de estos picos.

Se guardó una pequeña alícuota de cada una de las muestras usadas para análisis preliminar en el sistema paralelo de matriz de LC-EC-MS para MS de alta resolución y MS/MS mediante infusión usando un instrumento Solarix Qh-FT-ICR/12-T (Bruker Corp., Bremen, Alemania).

Debido a que los inventores han observado las diferencias más prominentes entre el control y la EH en las muestras con las puntuaciones de CFT más bajas, decidieron centrarse en determinar las estructuras de los picos en este grupo de muestras adaptando protocolos que habíamos comunicado anteriormente. Obtuvieron tres muestras de control y 7 muestras de EH cuyas puntuaciones de CFT variaron de 2 a 6. Estas muestras se prepararon mediante extracción en acetonitrilo acidificado. Una vez que los plasmas con EH y de control se agruparon, se secaron y se concentraron, cada uno de los grupos se reconstituyó en 200 ml de agua desionizada. Las dos muestras de plasma agrupadas se fraccionaron después usando extracción en fase sólida (500 mg de Diazem C-18 SPE, Diazem Corp. Midland, MI). Las columnas se equilibraron con 2 ml de agua desionizada, 2 ml de acetonitrilo y 2 ml de ácido acético al 1 % en agua desionizada. Cada sobrenadante reconstituido concentrado de las dos preparaciones de plasma (200 ml) se cargó en una columna de SPE recién equilibrada. Para cada columna, se realizó una única recogida de 300 ml para recuperar la fracción vacía y después se recogió 1 ml de cada uno de los siguientes eluyentes: ACN al 10 %, al 20 %, al 30 %, al 40 % y al 100 %. Las fracciones se evaporaron por centrifugación y se reconstituyeron en 20 ml de metanol/agua 50/50 con ácido fórmico al 0,5 %.

El análisis de los datos de IDA del sistema paralelo de matriz de LC-EC-MS proporcionó una lista de las masas de 10 biomarcadores candidatos. Estos datos preliminares de MS permitieron a los inventores centrarse en estas masas particulares obteniendo al mismo tiempo masas exactas usando el espectrómetro de masas Solarix de alta resolución.

Se obtuvieron datos de alta resolución de MS y MS/MS usando un espectrómetro de masas híbrido Qh/FT-ICR 12-T (Solarix, Bruker Daltonics) equipado con una fuente de nanopulverización que funcionaba en modo positivo. Se realizaron experimentos de espectrometría de masas en tándem usando el modo de activación CID. Se diluyeron muestras de las fracciones de ACN del 20 %, 30 % y 40 % 1:10 en metanol/agua 50/50 y se analizaron. Se realizó fragmentación de CID en el hexapolo. Se realizó detección de iones en el Solarix a una resolución de 100.000. La precisión de la asignación de masas fue mejor de 5 ppm.

Se obtuvieron datos de alta resolución de MS y MS/MS mediante infusión usando un LTQOrbitrap "Discovery" (Thermo-Fisher, San José, CA) equipado con un robot NanoMateTriVersa (Advion, Ithaca, NY). Se analizaron muestras diluidas de las fracciones de ACN de 30 % y 100 % usando nanoelectropulverización en el modo de iones positivos. Debido a la escasez de muestra, no se realizaron experimentos de fragmentación. Sin embargo, fue posible obtener valores de masas exactos para algunos compuestos de interés. La detección de iones moleculares intactos en el Orbitrap se obtuvo a una resolución de 30.000. La precisión fue mejor de 5 ppm.

Resultados

Se identificaron biomarcadores potenciales de EH. Fueron específicamente de interés los compuestos que a) estaban presentes solo en muestras de EH; b) estaban presentes solo en muestras de control; c) habían cambiado en intensidad a medida que las puntuaciones de CFT disminuyeron a lo largo del transcurso de la progresión de la enfermedad; y d) estaban presentes en cantidad suficiente como para ser identificables usando MS.

Todas las muestras en el estudio se analizaron según los protocolos examinados anteriormente. Las 391 muestras de plasma de 150 sujetos inscritos en el "Estudio de biomarcadores" y 40 plasmas de sujetos de control sanos se prepararon mediante extracción con ACN acidificado. Las muestras se agitaron mediante vórtex, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante del sedimento de proteína precipitada. El sedimento de proteínas se congeló a -80 °C y el sobrenadante se evaporó por centrifugación hasta su sequedad y se reconstituyó en tampones adecuados para experimentación de matrices de LC-EC fuera de línea. La fig. 1 muestra una comparación en paralelo de dos cromatogramas de matriz de LC-EC fuera de línea que muestran una muestra de plasma de un solo paciente de control después de la precipitación de ACN (A) y una sola muestra de plasma de un paciente diagnosticado con EH, un solo paciente después de la precipitación de ACN (B) sin terapia farmacológica. Los picos que son únicos o significativamente diferentes en tamaño están marcados con flechas rojas. La figura se generó directamente a partir de los datos, usando el software CoulArray. Las diferencias distintivas entre los dos están marcadas con flechas.

La fig. 2 muestra una comparación en paralelo de los mismos dos cromatogramas de matriz de LC-EC fuera de línea que la fig. 1, sin embargo, se amplía en la región de 21-32 min de modo que las diferencias entre los dos cromatogramas puedan verse más claramente. Los picos que son únicos o significativamente diferentes en tamaño están marcados con flechas rojas. La figura se generó directamente a partir de los datos, usando software CoulArray. Después los inventores intentaron determinar las estructuras de los compuestos, que diferían entre las muestras de plasma con enfermedad y de control.

Todos los datos obtenidos usando la matriz de LC-EC fuera de línea se exportaron como un "mapa digital" para su análisis. En la fig. 3 se muestra un ejemplo de un mapa digital que muestra las variables 45.151 - 45.171. Los mapas digitales se importaron a Microsoft Excel y se analizaron usando programas estadísticos como se analiza a continuación.

Usando software SIMCA-P, los inventores crearon figuras de análisis determinante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) que muestran la separación de diversos grupos. La fig. 4 es un PLS-DA que muestra la separación y el agrupamiento de la EH presintomática, EH en riesgo, muestras de EH con puntuación de CFT 13 y controles sin EH. Hay una separación visible entre los diversos grupos lo que indica que variables específicas pueden estar implicadas en la separación categórica. La fig. 5 es un PLS-DA que compara muestras de control (rojo) con pacientes con EH con una puntuación de CFT 13 (negro). En el lado izquierdo de la figura están los picos (o determinantes) que son más importantes para separar los dos grupos. Se enumeran 5 "VIP" en la fig. 5. Después de la inspección visual de los resultados de aproximadamente 60 muestras, el VIP más uniforme (el que se observó en al menos 80 % de las muestras examinadas) es el que apareció en el canal 9 y eluyó a los 88,75 min.

La fig. 6 es un PLS-DA que compara muestras de control (rojo) y todos los pacientes con EH con puntuaciones de CFT 2-6 (negro). Una vez más, es visible buena separación. También se muestra en esta figura una lista de VIP. Esos VIP resaltados también parecen estar presentes en al menos 80 % de las muestras examinadas, lo que minimiza el riesgo de que sean picos o artefactos relacionados con metabolitos del fármaco.

La fig. 7 es un PLS-DA que compara muestras de pacientes con EH con puntuación de CFT 13 y muestras de EH (rojo) con puntuaciones de CFT 2-6 (negro). De nuevo, se proporciona la lista VIP y los compuestos resaltados parecen estar presentes en al menos 80 % de las muestras, lo que, una vez más, minimiza el riesgo de que sean picos o artefactos relacionados con metabolitos del fármaco. Una vez que se obtuvo la lista de compuestos biomarcadores candidatos, fue necesario traducir al sistema paralelo de matriz de LC-EC-MS.

Como antes, se usó un sistema paralelo de separación y detección de matriz de LC-EC-MS (rojo) para analizar todas las muestras (negro). Para adquisición de datos, se usó un sistema similar que consistía en una bomba de HPLC binaria conectada a una columna C-18 de diámetro normal seguida de un divisor de flujo pasivo 9:1 que dividía el eluyente entre la matriz de EC y los detectores de MS.

El caudal de MS se mantuvo a 80 ml/min para minimizar los posibles efectos de supresión de iones tanto de las muestras biológicas como de los tampones de la matriz de EC con alto contenido de sal y facilitar la transferencia eficiente de iones. Además, la división del flujo fue importante para conservar el acuerdo de los tiempos de retención entre la matriz de EC y los cromatogramas de MS para permitir una comparación segura entre los resultados de los dos instrumentos y la identificación de biomarcadores potenciales de EH. Los tiempos de retardo se ajustaron de manera que se presentaría un compuesto al detector de EC y al detector de MS simultáneamente en un periodo de 1-2 segundos. Los componentes de interés observados por los dos detectores podrían caracterizarse posteriormente de manera adicional mediante la combinación de mediciones de MS de alta resolución y espectrometría de masas en tándem CID (MS/MS).

En la fig. 8 se muestra una comparación de cromatogramas de matriz de LC-EC obtenidos del método de gradiente de 100 min usando el sistema paralelo. El trazo superior (A) es el cromatograma de una muestra de control y el trazo inferior (B) es el cromatograma de una muestra de EH. Las flechas apuntan a algunas de las diferencias más frecuentes entre las dos muestras.

Ya que los cambios más drásticos aparecieron entre las muestras de control y las muestras de EH con las menores

puntuaciones de CFT, los inventores decidieron centrarse en estas durante el análisis paralelo de matriz LCEC-MS. Usando el software CoulArray, se superpusieron los desarrollos de muestras de control y EH para inspección visual. En la fig. 9 se muestra un ejemplo de un pico de particular interés para el que fue posible la determinación de m/z. En el panel A se muestra el pico de la matriz de LCEC correspondiente a un VIP propuesto. En el panel B se encuentra el pico correspondiente del método de IDA de la MS QStar. Se determinó que el pico mostrado en la fig. 9 tenía [M + H]⁺ m/z 190,09 del método de IDA Qstar en modo positivo.

MS y MS/MS de alta resolución posteriores del pico con [M + H]⁺ m/z 190,0858 usando el LTQ-Orbitrap produjeron el patrón de fragmentación mostrado en la fig. 10A. Los fragmentos asociados con la pérdida de H₂O y C₂H₃O₂ se indican en la figura con valores m/z de 172,0753 y 130,0646, respectivamente. A partir del patrón de fragmentación, se pudo asignar la estructura del compuesto como ácido indol-3-propiónico (I3PA). Esta estructura se muestra en la fig. 10B. La masa observada de I3PA fue 189,0780. La masa calculada para I3PA fue 189,0790. El error fue de 5 ppm.

En la tabla I se proporcionan tiempos de elución y valores [M + H]⁺ m/z para cada pico de interés tomado del método de IDA Qstar. Se cree que estas masas corresponden a biomarcadores potenciales.

Se pudieron ver picos en el intervalo de m/z 100-400 en el Orbitrap. La fig. 11 muestra la MS de la fracción de acetonitrilo al 30 % del plasma de control. Algunos de los picos más frecuentes están rodeados con un círculo.

La fig. 12 muestra la MS de la fracción de acetonitrilo al 100 % de plasma de control (trazo superior) y EH (trazo inferior). La cantidad de muestra fue suficiente para obtener datos de MS tanto para control como para EH a partir de la fracción de acetonitrilo al 100 %. Se rodean con un círculo diferencias notables entre los dos.

Los inventores pudieron identificar un VIP como ácido indol-3-propiónico (I3PA). La reinyección posterior del patrón de I3PA a una concentración de 10-5 g/ml usando el método de matriz de LC-EC fuera de línea, confirmó que la estructura del VIP era I3PA (como se muestra en la fig. 13). La fig. 13 valida que I3PA es un diferenciador entre EH y controles. Se muestran los niveles relativos de I3PA en plasmas de EH humana, control, modelo de EH de ratón y de tipo silvestre.

De manera análoga, en la fig. 14, se han representado gráficamente los niveles de I3PA en heces de ratón R6/2 y CAG 140 N=9 (todos P < 10⁻²). Los resultados muestran que las heces de ratón con EH tienen significativamente menos I3PA que las heces de sus compañeros de camada de tipo silvestre. Se realizaron estudios adicionales sobre I3PA exclusivamente y se describirán a continuación.

Confirmación de I3PA

El ácido indol-3-propiónico (I3PA) tiene un peso molecular de 189,2. Tiene una estructura de anillo aromático heterocíclico con alta estabilidad de resonancia. Es producido por dos tipos de bacterias *Clostridium sporogenes* y *Clostridium cylindrosporum*, ambas de las cuales se encuentran en el intestino delgado. Aunque se desconoce la función completa de I3PA, el I3PA se ha descrito como un antioxidante potencial en estudios de la proteína 3-amiloide de Alzheimer; en estos estudios, I3PA mostró fuertes niveles de neuroprotección en dos ejemplos de tensión oxidativa. Estudios adicionales en ratones y hámsters han demostrado que I3PA protege las neuronas del daño neuronal inducido por isquemia al reducir el daño al ADN y la peroxidación lipídica. Dada esta información, fue de gran interés para los inventores estudiar tanto I3PA como sus intermedios reactivos. Ya que los informes publicados han mostrado una correlación entre el daño oxidativo y la EH, fue de interés determinar si los niveles de I3PA eran uniformemente menores en pacientes con EH. Los inventores también estaban interesados en explorar por qué los niveles de I3PA eran menores en muestras de pacientes con EH.

Se obtuvieron plasmas del modelo de ratón CAG 140 (19 días después del nacimiento) usando el siguiente método: Se recogieron muestras de sangre del modelo de ratón CAG 140 mediante punción cardíaca. Las muestras de sangre se colocaron directamente en un tubo Eppendorf. Antes de que la sangre comenzara a coagular, se retiraron 50 µl del tubo a un tubo etiquetado por separado. Ambas muestras se mantuvieron en posición vertical en hielo seco hasta que se completaron todas las recogidas. Todos los tubos se centrifugaron a 8000 x g durante 20 min para separar los glóbulos rojos. Se pipeteó plasma desde la parte superior de las muestras y se almacenó a -80 °C. Después se analizó todo el plasma de ratón usando el método de matriz de LC-EC fuera de línea como antes.

Tras finalizar el análisis de plasma, todos los cromatogramas obtenidos de los experimentos anteriores se exportaron como mapas digitales como se ha descrito anteriormente. Los valores de I3PA se promediaron en los grupos de EH y control y se usaron pruebas de t de dos colas para comparar los niveles de I3PA observados en los cromatogramas de plasmas de pacientes con EH en relación con cada conjunto de controles. De manera análoga, en el caso de los plasmas obtenidos del modelo de ratón CAG 140 (a los 19 días después del nacimiento), los niveles de I3PA en los ratones enfermos se compararon con los niveles de I3PA en los compañeros de camada de tipo silvestre después de promediar todos los valores en cada grupo. Los resultados se muestran en la fig. 13. Los tres pares de barras corresponden a los tres agrupamientos. El primer par son los valores promedio de I3PA (ng/ml) en pacientes con EH y de control en el estudio de CREST (aumento de dosis de creatina) (A). El segundo par son los valores promedio de I3PA (ng/ml) en pacientes con EH y de control en el "Estudio de biomarcadores" (B). El tercer par son los valores

promedio de I3PA (ng/ml) en CAG 140 EH y TS recogidos 19 días después del nacimiento (C). En esta figura también se muestran todos los valores de p que describen el nivel de significación de I3PA entre los grupos de enfermedad y normales. Las diferencias en los niveles de I3PA son muy significativas. En el estudio de CREST, el valor de p es $<10^{-10}$. En el estudio de biomarcadores, el valor de p es $<10^{-5}$. En el estudio del modelo de ratón, el valor de p es $<10^{-4}$.

5 Estos resultados muestran que los niveles de I3PA son menores en modelos tanto de plasma de EH humano como de plasma de EH de ratón en comparación con sus homólogos sin enfermedad.

10 Los inventores observaron que las diferencias en los niveles de I3PA son estadísticamente significativas entre el plasma enfermo y de control en modelos tanto humanos como de ratón. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, los inventores proponen varias hipótesis, lo que podría explicar los niveles menores de I3PA en las muestras de enfermedades.

15 Si los pacientes humanos/ratones con EH tienen niveles en plasma menores de I3PA, sugiere la posibilidad de que las bacterias intestinales de estos sujetos no produzcan tanto I3PA como en sujetos sin enfermedad. Por tanto, fue de interés determinar si este era el caso.

Protocolo de preparación y extracción para heces de ratón:

20 Se recogieron heces directamente de ratones y se colocaron inmediatamente en hielo seco después de la recogida. Las heces se secaron por rotoevaporación y se pesaron. Las heces secas se extrajeron usando acetonitrilo acidificado. Se mezclaron 50 mg de heces con 1,2 ml de acetonitrilo. Las muestras se sonicaron durante 30 min y se centrifugaron a 8000 x g. Se eliminó un ml de sobrenadante y se evaporó hasta su sequedad.

25 Las muestras del procedimiento anterior se reconstituyeron en tampón como se ha analizado anteriormente. Se usó el mismo método de matriz de LC-EC para análisis. Todos los datos se exportaron como mapas digitales como se ha analizado anteriormente. Los valores para los niveles de I3PA se compararon y representaron gráficamente.

30 Los resultados del análisis de heces de ratón se muestran en la fig. 14. En esta figura, hay cuatro pares de gráficos de barras. El primer par (A) muestra una comparación de la cantidad de I3PA en heces de ratón (ng/g de peso seco) recogidas de ratones con EH CAG 140 de 19 días de edad y sus compañeros de camada TS. El segundo par (B) muestra una comparación de la cantidad de I3PA en heces de ratón (ng/g de peso seco) recogidas de ratones con EH CAG 140 de 120 días de edad y sus compañeros de camada TS. El tercer par (C) muestra una comparación de la cantidad de I3PA en heces de ratón (ng/g de peso seco) recogidas de ratones con EH R6/2 de 19 días de edad y sus compañeros de camada TS. El cuarto par (D) muestra una comparación de la cantidad de I3PA en heces de ratón (ng/g de peso seco) recogidas de ratones con EH R6/2 de 90 días de edad y sus compañeros de camada TS. Cada grupo tenía N=9 muestras.

40 En los cuatro casos, los valores de p fueron $<10^{-2}$. Por tanto, se observaron niveles menores de I3PA en las heces de los ratones con EH. Los niveles reducidos podrían atribuirse a a) menor producción de I3PA por bacterias; o b) menos bacterias. Aunque sin desear quedar ligado a teoría alguna, se ha sugerido que el I3PA experimenta un mecanismo de oxidación que termina en la formación de ácido quinúrico. Esta ruta se muestra en la fig. 15.

45 Los inventores también pudieron supervisar la desaparición de I3PA en el transcurso de 2 h usando una reacción de Fenton con las siguientes condiciones: H_2O_2 100 mM, sulfato de hierro 10 mM, I3PA 100 mM. La mezcla de reacción se mantuvo a 4 °C en oscuridad. Cada 30 min, una pequeña alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 1:10 y se inyectó en el sistema de matriz de LC-EC fuera de línea. Aunque el ácido quinúrico no es EC activo, los inventores pudieron mostrar la desaparición de I3PA.

50 Si I3PA está sometido a oxidación de radicales libres en pacientes con EH (que sigue la lógica de que los pacientes con EH son susceptibles a altos niveles de daño oxidativo), esto sugeriría que el intermedio mostrado en la fig. 15 o el ácido quinúrico en sí mismo podría convertirse en una especie reactiva, capaz de formar aductos con proteínas. En consecuencia, los inventores estaban interesados en determinar si estaba presente ácido quinúrico en una forma libre en el plasma. Por tanto, se obtuvieron cinco plasmas de pacientes con EH no tratados, seleccionados aleatoriamente, y se extrajeron antes de que el sedimento de proteínas se guardara para su uso posterior. El sobrenadante del plasma se analizó para determinar el ácido quinúrico libre usando un fluorímetro LC-305 (lineal, Alltech Associates, Deerfield, 1L, Estados Unidos) configurado a longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 450 nm respectivamente. La pérdida de fluorescencia de indol se supervisó a longitudes de onda de excitación y emisión de 285 y 345 nm. No se detectó ácido quinúrico libre (no unido) en plasma (LOD a una concentración del 2 % de I3PA). Esto sugirió que si se hubiera formado ácido quinúrico, probablemente estaría unido a proteína.

60 Por tanto, se ve que los niveles de I3PA son menores a niveles estadísticamente muy significativos en muestras de plasma tanto de EH humano como de modelo de ratón de EH. Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores creen que los niveles menores de I3PA pueden resultar de una menor producción de I3PA por las bacterias en el intestino delgado. Pudieron mostrar que esto sucede en dos ejemplos diferentes de modelos de ratón (R6/2 y CAG 140) en dos puntos temporales de recogida diferentes (19 días y 120 días en CAG 140 y 19 días y 90 días en R6/2). Sin embargo, no está claro si la reducción de la producción de I3PA está provocada por tasas de producción

menores de I3PA por bacterias o la presencia de menos bacterias. Otra posibilidad para los niveles reducidos de I3PA en plasma podría proceder de la conversión de I3PA en otros productos mediante un mecanismo de oxidación. El daño oxidativo se sugiere como una posible causa de trastornos neurodegenerativos tales como EH. Por tanto, es posible que I3PA se convierta en otros productos como resultado de niveles elevados de oxidación. Ya que un producto primario de la oxidación de I3PA es ácido quinúrico, los inventores buscaron la presencia de ácido quinúrico en el plasma del paciente. Usando un fluorímetro configurado a longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 450 nm, se buscó ácido quinúrico. Sin embargo, no se detectó ninguno.

No obstante, aunque no se encontró ácido quinúrico libre (no unido) en el plasma de varios pacientes con EH seleccionados al azar, se cree que el ácido quinúrico u otro u otros intermedios reactivos de I3PA pueden unirse con la proteína. Para determinar si esto era posible, se diseñaron reacciones de Fenton con I3PA y patrón de seroalbúmina humana (HSA) (*in vitro*). Se prepararon mezclas de reacción de la siguiente manera: se combinaron H₂O₂ 100 mM, sulfato de hierro 10 mM e I3PA 100 mM con 1 ml de HSA (preparado a una concentración de 10 mg/ml). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.

Se seleccionaron al azar dos muestras de plasma de control y dos de EH del "Estudio de biomarcadores". Los plasmas se prepararon según el mismo protocolo analizado anteriormente. Sin embargo, para experimentos de metabolómica, se retiró por pipeta el sobrenadante y se congeló a -80 °C y los inventores se centraron en el análisis de los sedimentos de proteína. Los sedimentos de EH y las muestras de control se lavaron con 500 ml de H₂O dos veces para eliminar el acetonitrilo acidificado. Se añadió agua (250 ml) a la mezcla de HSA-I3PA. También se añadió a la mezcla combinada una solución de proteinasa K (5 ml que se había filtrado previamente con un filtro de preparación Centracon™ 10K para eliminar contaminantes (a una concentración inicial de 10 mg/ml). Las muestras se colocaron después en un baño de agua a 57 °C durante una noche.

Se añadió una alícuota de la solución PK (1 ml) a todas las muestras de proteínas que se habían sometido a la reacción de Fenton con I3PA. Las muestras se agitaron por vórtex y se colocaron en un baño de agua a 57 °C durante una noche.

Todas las muestras, que había estado en el baño de agua a 57 °C, se retiraron y se volvieron a extraer con el mismo protocolo analizado anteriormente. Se precipitaron 125 ml con 500 ml de ACN/ácido acético al 0,4 %, se agitaron en vórtex durante 30 s y se centrifugaron a 21.000 xg durante 25 min a 4 °C. El sobrenadante (500 ml) se evaporó por centrifugación y se reconstituyó a 100 ml en fase móvil A; se inyectó una alícuota de 50 ml en el sistema de matriz de LC-EC. Se realizaron análisis de matriz de LC-EC usando bombas ESA modelo 582 (ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA) y un detector CoulArray modelo 5600 de ESA de 16 canales. Los canales 1-15 usaron electrodos coulombimétricos en serie configurados en incrementos iguales de 56 mV de 0 a 840 mV. El canal 16 se ajustó a 870 mV. Se usaron dos columnas de 4,6 mm x 250 mm de serie C18 de 5 mm (ESA Biosciences Inc., Chelmsford, MA). El gradiente empleado fue lineal de 0 % de fase A (ácido pentanosulfónico de sodio 0,1 M con ácido acético al 5 %) a 100 % de fase B (80/10/10 metanol/isopropanol/acetonitrilo con acetato de litio 0,06 M; ácido acético al 7 %). El gradiente lineal se empleó hasta 84 min, después se procesó 100 % de B hasta 110 min. El caudal fue de 1 ml/min.

Resultados:

Una comparación de los datos obtenidos de las digestiones PK de productos de oxidación de I3PA generados *in vitro* unidos a HSA y las digestiones PK de sedimentos de proteínas de EH y control indicaron similitudes. La fig. 16 muestra una ilustración que representa diversas digestiones PK. La digestión PK de HSA generado *in vitro* que reaccionó con I3PA en una reacción de Fenton se muestra en (A). (B) muestra los productos de digestión PK de sedimentos de proteína de EH. (C) muestra los productos de digestión PK de HSA sin reaccionar. Se observaron similitudes en (A) y (B) y no se vieron en (C) lo que sugiere que un producto de oxidación de I3PA puede haberse unido con la HSA.

Se muestran en la fig. 17 pruebas adicionales que sugieren una similitud entre las digestiones PK del [HSA + I3PA + reacción de Fenton] creado *in vitro* y digestiones PK de sedimentos de proteína de EH. Aquí se ven dos cromatogramas de matriz de LC-EC en el intervalo de 34-41 min. El trazo azul en el panel superior representa el sedimento de proteína de EH digerido con PK. El trazo verde en el panel superior representa un sedimento de proteína de control digerido con PK. El trazo rojo en el panel inferior representa los productos de [HSA + I3PA + reacción de Fenton] digeridos con PK. El trazo negro en el panel inferior representa HSA digerida con PK. Se sugiere que los picos rodeados con un círculo tienen la misma estructura en la EH, el control y el material generado *in vitro*. Los niveles del compuesto rodeado con un círculo son significativamente mayores en las digestiones de sedimentos de proteínas de EH que en los controles. Los inventores proponen que estos picos se correlacionan con un compuesto relacionado con I3PA unido covalentemente con un aminoácido o fragmento peptídico que contiene tirosina o triptófano, debido a que estos son los únicos dos aminoácidos que son electroquímicamente activos a los potenciales aplicados.

La integración coulombimétrica del pico proporciona aproximadamente 2 pmol de los 250 ml de plasma, que se estima que está entre 600-1200 pg o 2,4-4,8 ng/ml. La posición del pico en el cromatograma sugiere que está unido con una única tirosina o triptófano, o con un dipéptido o tripéptido porque su elución es temprana en el cromatograma en relación con péptidos mayores tales como las endorfinas. Este experimento sugiere que un mecanismo que explica los hallazgos de I3PA significativamente menor en plasma con EH se debe a la reacción de intermedios de radicales

libres oxidativos de I3PA y la posterior unión de estos intermedios con la proteína plasmática.

Los picos similares hallados a niveles mayores en los sedimentos de proteína digeridos en EH sugieren que tanto la menor producción como la oxidación aumentada de I3PA podrían ser razones para que se observen niveles menores en plasma de I3PA libre en EH.

Los inventores investigaron después si se podría generar un producto de oxidación unido covalentemente de I3PA con una proteína. Además, se determinó la estructura del producto de oxidación de I3PA y el sitio de unión del producto de oxidación en una proteína. Se usaron dos modelos diferentes. Estos fueron ubiquitina y angiotensina I. Usando técnicas de MS, se esperaba identificar la estructura del producto de oxidación y el sitio de unión.

Unión de radicales libres del producto de oxidación de I3PA con ubiquitina

Preparación y método:

Se realizó una reacción de Fenton usando las mismas concentraciones de peróxido de hidrógeno, sulfato de hierro e I3PA que se han analizado anteriormente. Se añadió a la mezcla un microlitro de una solución de ubiquitina preparada a una concentración de 10 mg/ml. También, se preparó un tubo separado que contenía solo la reacción de Fenton sin ubiquitina y se marcó como control negativo. La reacción se mantuvo en oscuridad a 4 °C durante 16 h.

Se realizó análisis de MS de alta resolución de las mezclas de reacción usando un espectrómetro de masas híbrido Qh/FT-TCR 12-T (SolariX, Bruker Daltonics) que estaba equipado con una fuente de nanopulverización operada en modo positivo. Las muestras se diluyeron 1:10 en metanol/agua 50/50, ácido fórmico 0,5 % y se analizaron en el SolariX. Se obtuvo detección de iones en el SolariX a una resolución de aproximadamente 110.000.

Resultados:

El análisis de los datos obtenidos en el SolariX indicó la probabilidad de una interacción no covalente entre un producto de oxidación de I3PA y ubiquitina. Se proporciona una ilustración en la fig. 18 que demuestra la unión de I3PA con ubiquitina como resultado de la reacción de Fenton.

En la fig. 19 se muestran cuatro espectros de masas de la región m/z 794-804. Hay varios picos visibles en el espectro inferior. Se muestra un producto de oxidación de I3PA unido a ubiquitina en (D). Se produce unión cuando se produce una reacción de Fenton en presencia de I3PA y ubiquitina. En todos los otros casos, no se detecta ningún material ligado. El pico rodeado con un círculo correspondiente a $[M + 11H]^n + m/z 799,25584$ se encuentra solo en la muestra que contiene I3PA, la reacción de Fenton completa y ubiquitina. Los cuatro espectros restantes corresponden a: ubiquitina sola (A), ubiquitina e I3PA sin la reacción de Fenton (B) y ubiquitina más I3PA con reacción de Fenton sin sulfato de hierro (C) no muestran la presencia de este pico.

En función de una comparación de los patrones isotópicos de los picos en la fig. 19 con las distribuciones isotópicas teóricas de los aductos tanto covalentes como no covalentes de ácido quinúrico para ubiquitina, se cree que los grupos de picos rodeados con círculo corresponden a dos tipos de unión diferentes: El primero, rodeado con un círculo con una línea continua y etiquetado como Coy corresponde a $[M + H]^+ m/z 8779,7598$. Este pico corresponde a ácido quinúrico unido covalentemente. El segundo, rodeado con un círculo con la línea punteada y etiquetado como no Coy corresponde a $[M + H]^+ m/z 8781,7492$. Este pico corresponde a ácido quinúrico residual unido de manera coordinada. La fig. 20 muestra la región m/z 799,0 - 800,4 ampliada con "picos" que indican los patrones isotópicos de las formas tanto covalentes como no covalentes de ácido quinúrico. El patrón isotópico para el material unido covalentemente se perfila en negro. El patrón isotópico para el material unido de manera coordinada conjunta se perfila en negro. Se observó solapamiento debido a la pequeña diferencia de masas (2 Da) entre los dos.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la formación de ácido quinúrico unido de forma coordinada conjunta refleja la conversión directa del radical libre intermedio en ácido quinúrico durante la reacción de Fenton antes de que encuentre un sitio de unión a proteínas. Debido a que las dos formas tienen una masa tan parecida, los grupos isotópicos se solapan. Un cálculo de un valor teórico para ubiquitina ($[M + H]^+ m/z 8560,6287$) más un ácido quinúrico unido covalentemente ($C_{11}H_{11}NO_4$, masa exacta 221,0688) predice $[M + H]^+ m/z 8779,7577$ para dicho aducto. El mismo cálculo con ubiquitina y un ácido quinúrico unido de manera no covalente predice $[M + H]^+ m/z 8781,6975$ para dicho aducto. El $[M + H]^+ m/z$ del primer pico se indicó como 8779,7598. El $[M + H]^+$ del segundo pico se observó a m/z 8781,7492. Esto correspondería a un error calculado de -0,24 ppm para el material unido covalentemente y -5,8 ppm para el ácido quinúrico unido de manera no covalente. En este espectro, la medición calculada para el pico observado asignado a ubiquitina corresponde a un error de medición de -5,3 ppm. Estos resultados se confirmaron cuando la muestra se infundió a través de nanopulverización en el LTQ-Orbitrap. El $[M + H]^+$ del primer pico que los inventores sugieren que corresponde al ácido quinúrico unido covalentemente con ubiquitina se observó a m/z 8779,6766, un error de medición de 9 ppm. El segundo pico que los inventores sugieren que corresponde al ácido quinúrico unido de manera no covalente con ubiquitina se observó a m/z 8781,6989, un error de medición de -0,16 ppm. Por lo tanto, es probable que los picos rodeados con un círculo correspondan tanto al ácido quinúrico unido tanto covalentemente como de manera no covalente con ubiquitina (ya que solo hay un cambio de 2 Da entre los dos).

Los dos picos adicionales $[M + 1 \text{ H}] + 1$ m/z 800,70945 y 801,98019 son probablemente formas oxidadas del resto de ácido quinúrico/ubiquitina unido de manera no covalente.

En estudios complementarios los inventores midieron las constantes de unión parentales para I3PA con plasma humano completo, HSA, BSA y ubiquitina usando adiciones en serie de I3PA para determinar el número de equivalentes molares de sitios de unión y equivalentes molares de I3PA libre. Las constantes de unión (pK) para plasma humano completo, HSA y BSA son uno del orden de 103 o más que para la ubiquitina sola. Esto sugeriría que los datos de los inventores para ubiquitina en los que vieron ácido quinúrico unido covalentemente y de manera coordinada conjunta, fueron realistas. El aumento de la concentración de materiales en la reacción de Fenton dio como resultado la creación excesiva de ácido quinúrico unido de manera coordinada conjunta, a medida que el radical libre intermedio I3PA se convertía en ácido quinúrico antes de encontrar un sitio de unión a proteína. Por tanto, los intentos de aumentar el rendimiento del ácido quinúrico unido de manera covalente fueron bloqueados por la generación excesiva de material unido de manera no covalente. Después los inventores decidieron intentar esta reacción de Fenton con I3PA usando angiotensina I como el péptido diana.

Preparación y método:

Se obtuvo angiotensina 1 de The American Peptide Co en Sunnyvale, CA, Estados Unidos. Se prepararon seis tubos con las siguientes mezclas de reacción de Fenton: los tubos 1 y 4 contenían H_2O_2 100 mM, sulfato de hierro 10 mM e I3PA 100 mM; los tubos 2 y 5 contenían H_2O_2 100 mM, sulfato de hierro 100 mM e I3PA 100 mM. Los tubos 3 y 6 contenían H_2O_2 100 mM, sulfato de hierro 200 mM e I3PA 100 mM. Los tubos 4, 5 y 6 también contenían 1 ml de angiotensina I preparada a una concentración de 10 mg/ml. Se preparó un tubo separado que contenía solo la reacción de Fenton sin angiotensina 1 y se marcó como control negativo. Los tubos que contenían las mezclas de reacción se cubrieron con una envoltura de aluminio para que ninguno de los reactivos se deteriorara a la luz ambiental. Todas las mezclas de reacción se mantuvieron en hielo. Los tubos se dejaron reaccionar durante 30 h.

MS SolariX de angiotensina I más mezcla de reacción de Fenton.

Se realizó análisis de MS de alta resolución de las mezclas de reacción usando un espectrómetro de masas híbrido Qh/FT-ICR 12-T (SolariX, Bruker Daltonics) que estaba equipado con una fuente de nanopulverización operada en modo positivo. Las muestras se diluyeron 1:2 en metanol/agua 50/50, ácido fórmico al 0,5 % (para el modo de iones positivos) o metanol/agua 50/50, trietilamina (TEA) 0,05 % (VWR Scientific, PA, Estados Unidos) (para el modo de iones negativos) y se analizaron; en el SolariX en modos positivo y negativo. Se obtuvo detección de iones en el SolariX a una resolución de aproximadamente 110.000. Se realizó fragmentación de MS/MS usando CID a 0-10 eV.

El análisis del tubo de reacción que contenía los productos de reacción de Fenton y 13 PA sin angiotensina 1 determinó que el producto de reacción primario tenía $[M - \text{H}]^-$ m/z 220,0621. Este producto solo se vio en modo negativo en la MS. La fragmentación de este compuesto indicó que la estructura probable correspondía al anión del ácido quinúrico $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_4]^-$. En la fig. 21 se muestra el espectro de MS/MS del ion correspondiente a $[M - \text{H}]^-$ m/z 220,0621. El fragmento a m/z 202,0503 corresponde a la pérdida de H_2O . El fragmento a m/z 176,0710 corresponde a la pérdida de CO_2 . El fragmento a m/z 158,0605 corresponde a la pérdida tanto de CO_2 como de H_2O . El fragmento a m/z 148,0398 corresponde a la pérdida de $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$. El valor calculado para el $[M - \text{H}]^-$ de ácido quinúrico es m/z 220,0610. El valor observado fue m/z 220,0609. El error fue de 0,45 ppm. Por tanto, es probable que esta estructura corresponda al ácido quinúrico.

El análisis de los tubos de reacción que contenían los productos de la reacción de Fenton, I3PA y angiotensina I determinó que la fracción 4 contenía la mayor cantidad de "productos únicos". Se realizó MS/MS del pico $[M + \text{H}]^+$ m/z 1515,7413, que los inventores teorizaron que correspondía al producto de oxidación unido covalentemente de I3PA (ácido quinúrico) para angiotensina I. :

La tabla IV proporciona fragmentos de iones b e y de angiotensina I, incluyendo valores observados, valores teóricos y error de ppm. También se muestran todos los fragmentos observados que contienen ácido quinúrico unido covalentemente, incluyendo asimismo valores observados y teóricos, así como el error de ppm. La fig. 22 muestra el espectro de MS/MS del producto que se ha asignado como ácido quinúrico (KA) unido covalentemente con angiotensina T (en un cuadro azul) representada por el pico con $[M + 3\text{H}]^{3+}$ m/z 505,9175. Se marcan iones tanto b como y. Los valores m/z de los fragmentos b e y que contienen ácido quinúrico unido covalentemente están en cuadros rojos.

El primer miembro de la serie unido covalentemente fue $[M + \text{H}]^+$ m/z 753,3192. Este pico correspondía a $[\text{b}_4 + \text{ácido quinúrico}]$. También estuvo presente $[M + \text{H}]^+$ m/z 866,4036 que correspondía a $[\text{b}_5 + \text{ácido quinúrico}]$. $[M + \text{H}]^+$ m/z 1003,4624 correspondía a $[\text{b}_6 + \text{ácido quinúrico}]$. $[M + 2\text{H}]^{2+}$ m/z 624,2948 que correspondía a $[\text{b}_8 + \text{ácido quinúrico}]$. $[M + 2\text{H}]^{2+}$ m/z 692,8247 que correspondía a $[\text{ácido quinúrico} + \text{b}_9]$. También se observaron $[M + 3\text{H}]^{3+}$ m/z 415,5549 que correspondía a $[\text{y}_8 + \text{ácido quinúrico}]$; y $[M + 3\text{H}]^{3+}$ m/z 467,5738 que correspondía a $[\text{y}_9 + \text{ácido quinúrico}]$.

Debido a que se observó que esta serie de iones fragmentarios comenzaba en $[\text{b}_4 + \text{ácido quinúrico}]$, se cree que el ácido quinúrico se une en Tyr4. Era de esperar que se hubiera producido unión de ácido quinúrico en la tirosina, debido a que el anillo aromático en la tirosina es un punto común ataque por radicales libres de especies reactivas de nitrógeno

y oxígeno.

Examinando los datos plasmáticos de tres estudios separados, el "Estudio de biomarcadores", el estudio CREST y un estudio que usa el modelo de ratón CAG140, los inventores determinaron que los niveles de I3PA en plasma en muestras con enfermedad fueron significativamente menores que en los controles sin enfermedad. El descubrimiento de la reducción notable de los niveles de I3PA en plasma condujo a una investigación de las posibles razones de este fenómeno. Se propusieron dos hipótesis. En primer lugar, debido a que I3PA es producido por bacterias en el intestino delgado, fue interesante determinar si los niveles de I3PA en materia fecal de pacientes enfermos eran menores que los hallados en pacientes no enfermos. Aunque no tenían acceso a muestras humanas, los inventores pudieron usar heces de ratón R6/2 y CAG 140, que se habían recogido en dos puntos temporales diferentes. En los cuatro casos, los ratones enfermos mostraron niveles significativamente menores de I3PA en su materia fecal en comparación con los controles de tipo silvestre no enfermos. Estos resultados sugirieron que las bacterias producían menos I3PA en ratones enfermos o que había menos bacterias. Por tanto, la presencia del genotipo de enfermedad dio como resultado claramente niveles menores de producción y secreción de I3PA.

Una segunda hipótesis que describe por qué los niveles de I3PA eran menores en el plasma de pacientes enfermos procedía de la teoría de que el daño oxidativo, muy prevalente en trastornos neurodegenerativos tales como EH, provocó que el I3PA se convirtiera en un producto de oxidación, reduciendo los niveles de I3PA y quizás creando un producto de oxidación unido a proteína de I3PA. Se consideró un producto potencial de oxidación de una reacción *in vitro* que "imitaba" el daño oxidativo en el cuerpo. Después se buscó determinar si estaba presente cualquier ácido quinúrico en el plasma de EH. Aunque el ácido quinúrico no es una estructura electroquímicamente activa, usando un fluorímetro, los inventores investigaron si estaba presente ácido quinúrico en plasma de EH. No se detectó ninguno. Una segunda posibilidad fue que el ácido quinúrico se hubiera unido en una proteína plasmática. Para determinar si este tipo de reacción podría producirse *in vivo*, se simuló una reacción *in vitro* para imitar la oxidación de radicales libres de I3PA en presencia de angiotensina 1 y ubiquitina. Usando MS, los inventores pudieron determinar que el ácido quinúrico se unía tanto covalentemente como de manera coordinada conjunta con ubiquitina, así como covalentemente con angiotensina I. Identificaron que el sitio de unión covalente de ácido quinúrico en angiotensina I era Tyr4.

Por último, compararon las digestiones PK de sedimentos de proteína de EH y de control con productos de oxidación unidos covalentemente generados *in vitro* de I3PA a USA. Los inventores prepararon soluciones de reacción de Fenton que contenían I3PA y USA. Estas se digirieron con PK y se compararon con digestiones PK de sedimentos de proteína de EH y de control usando el método de matriz de LCEC fuera de línea. Se detectaron varias similitudes, lo que sugiere la posibilidad de que un producto de oxidación de I3PA (posiblemente ácido quinúrico) se una realmente con los sedimentos de proteína de EH, posiblemente en algún lugar de la HSA.

Se pueden realizar diversos cambios en la divulgación anterior sin alejarse del espíritu y alcance de la misma. De hecho, la investigación del inventor sobre el análisis de ANOVA y ABNOVA de los 612 sujetos para los que tenían muestras en serie con la hipótesis nula de que la varianza de los datos se debía a la varianza con individuos proporcionó un valor de p de menos de 10×10^{-16} , lo que indica que en ausencia de intervención los niveles de IPA son una característica específica del individuo.

La información indica que los niveles bajos de IPA están asociados con cuatro enfermedades neurológicas importantes y con insuficiencia cardíaca isquémica y acontecimientos relacionados con la tensión en sujetos con insuficiencia cardíaca.

Por otra parte, como se analiza a continuación, los niveles bajos de IPA son una característica individual determinada en parte por el efecto del genoma de un individuo sobre el genoma agregado del microbioma intestinal y, por tanto, son un factor de riesgo genéticamente determinado en el desarrollo de la enfermedad. Este conocimiento implica que la exploración de IPA en toda la población usando técnicas basadas en los métodos rápidos descritos y proporcionando un medio para aumentar los niveles de IPA a través de la complementación directa o modificación del microbioma intestinal mediante el uso de agentes tales como Froximum o la manipulación dietética proporcionará una reducción en toda la población en enfermedades degenerativas o de inicio tardío. En particular, en los que la tensión oxidativa, la disfunción mitocondrial relacionada y el daño y la agregación de proteínas son una lesión de efecto acumulado con el tiempo.

También se ha desarrollado una metodología para supervisión directa de la composición agregada del microbioma intestinal usando material fecal.

En pruebas con ratones, la adquisición de muestra es relativamente sencilla y solo implica la recogida de sedimentos fecales y su procesamiento con el peso seco como normalizador de valores para obtener un patrón metabólico que refleje la "huella" agregada de la microflora intestinal.

La interpretación de las diferencias se simplifica debido a la uniformidad de la dieta.

La medición de dichos patrones en ratones de tipo silvestre y modificados genéticamente, como se muestra a

- continuación, indica que incluso a una edad muy temprana, la huella de la microflora intestinal está fuertemente influida por el genoma del propio animal. De hecho, los inventores han determinado que la huella del microbioma separa de manera única los ratones de tipo silvestre de sus compañeros de camada genéticamente positivos en el momento del destete mucho antes de que aparezca cualquier síntoma o cualquier medida de histopatología. En la figura 23 se muestra un ejemplo para modelos de ratón de EH CAG 140 jóvenes y viejos. Dos de las variables de importancia con los mayores valores para diferenciar estos ratones genéticamente positivos y de tipo silvestre de las heces son IPA y la relación de IPA con respecto a ácido indol láctico, con menor IPA y mayor IPA/ácido indol láctico en los ratones genéticamente positivos.
- 5
- 10 Por tanto, el genoma que finalmente determine el inicio de la enfermedad también determina la composición agregada del microbioma intestinal en un individuo.
- Un segundo ejemplo que incorpora el uso de la modificación de la microflora intestinal se muestra en la fig. 24. La administración del compuesto Froximum (un remedio popular compuesto por ceniza volcánica) cambia el perfil metabólico del cerebro, la médula espinal y la sangre del ratón G93a. Sin embargo, este compuesto por su naturaleza como ceniza inorgánica no puede cruzar del intestino al plasma o del plasma al cerebro. El efecto está en el microbioma intestinal agregado, que después se refleja en cambios beneficiosos en otros órganos. Como se muestra en la fig. 24, la separación del modelo de ELA tratado y no tratado G93A de los cambios en la huella del microbioma es suficiente para diferenciar de manera única los ratones tratados y no tratados, en este caso acercando el modelo de ratón de ELA al estado de los compañeros de camada de tipo silvestre. De nuevo, IPA fue una fuerte variable de importancia en esta separación y menor en el ratón genéticamente positivo y elevado en los compañeros de camada tanto genéticamente positivos tratados como de tipo silvestre. La huella del micro bioma del G93a. CAG 140 y sus respectivos compañeros de camada de tipo silvestre también fueron significativamente diferentes entre sí.
- 15
- 20
- 25 Esto indica que: en primer lugar, un compuesto terapéutico para trastornos del SNC no necesariamente tiene que cruzar la barrera hematoencefálica para tener un efecto profundo en la red de interacciones genómicas proteómicas metabólicas y del microbioma intestinal que son beneficiosas para la salud o perjudiciales para la salud; en segundo lugar, que un compuesto que puede cruzar la barrera hematoencefálica también puede tener un efecto secundario sobre el microbioma intestinal que puede ser beneficioso o perjudicial.
- 30
- La primera implicación es que las estrategias para prevenir o retardar la aparición de síntomas de enfermedades del SNC con un componente o predisposición genéticos tales como Huntington, Alzheimer, Parkinson o ELA deben incluir enfoques para la modificación de la composición agregada del microbioma intestinal y que estos enfoques deben llevarse a cabo en una etapa muy temprana antes del inicio de cualquier sistema potencial. Esencialmente, la composición agregada del microbioma intestinal como el genoma de los individuos en sí mismo es un factor de riesgo en la enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, este genoma agregado individual del microbioma intestinal puede modificarse más fácilmente a un estado más beneficioso que el del propio individuo.
- 35
- La segunda implicación es que en cualquier ensayo de un producto terapéutico potencial, debe supervisarse la huella del microbioma intestinal. Los cambios introducidos por un agente terapéutico podrían ser beneficiosos o perjudiciales y dichos cambios pueden compararse con una base de datos para determinar compuestos en cualquier categoría. Los cambios significativos en el microbioma intestinal de los individuos, que es estable sin una intervención significativa, también se pueden supervisar.
- 40
- 45 Para implementar este enfoque, los inventores han desarrollado un protocolo que podría aplicarse tanto a la supervisión sin necesidad de una visita clínica en una prueba farmacológica como a la exploración basada en la población si está indicado.
- En seres humanos, la supervisión de la huella del microbioma intestinal es más compleja debido a problemas relacionados con la adquisición e interpretación de muestras debido a la variación en la dieta. El primer problema se ha abordado sencillamente tomando un trozo de papel higiénico usado después de defecar y colocándolo en un tubo de 50 ml que contiene 70 % de isopropanol (alcohol para fricciones, un material de uso común) que se puede almacenar refrigerado y posteriormente enviar a un laboratorio.
- 50
- 55 El análisis directo del sobrenadante o los concentrados de sobrenadante del tubo produce patrones como se muestra en (figs. 25A, B y C) a partir de muestras basales en el breve estudio de prueba de principio de la estabilidad en el tiempo del microbioma intestinal individual en un esposo y una esposa descritos a continuación. Las innovaciones técnicas están en la normalización de los datos y en el desarrollo de un enfoque estadístico para eliminar las variaciones en la dieta.
- 60
- Se realiza normalización inicial en alícuotas concentradas mediante evaporación centrífuga en tubos tarados y diluyendo con tampón de ejecución a concentraciones equivalentes en g/ml.
- 65
- Se realiza normalización secundaria para análisis de datos y comparación de perfiles analizando de manera cuantitativa todos los picos resueltos contra una muestra agrupada y tomando la proporción de cada pico con respecto a todos los demás, es decir, en este ejemplo con 785 picos resueltos, el número de relaciones y valores para el análisis

es de 308.505.

Se espera que las variaciones en la dieta tengan relaciones contradictorias, mientras que se espera que los compuestos que son precursores directos y productos del metabolismo microbiano sean relativamente uniformes, suponiendo que no haya cambios significativos en el microbioma agregado.

Al clasificar individuos de muestras en serie usando todas las relaciones en PCA o modelos de PLS-DA supervisados, se esperaría que las relaciones de compuestos que reflejan la actividad agregada del microbioma intestinal sean las variables dominantes de importancia que diferencian a un individuo de otro y las variables más significativas que definen un cambio de similitud temporal individual que refleja un cambio en el microbioma intestinal.

Un ejemplo de este enfoque se muestra en la fig. 24. Se adquirió material fecal en papel higiénico de un esposo y una esposa que compartieron dietas y medicamentos similares durante un periodo de 15 días colocando papel higiénico usado en un tubo de 50 ml que contenía isopropanol al 70 %. Se recogió una muestra del esposo después de 5 días de tratamiento antibiótico posterior a la reconstrucción dental el día 20 (valor atípico en azul). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el ensayo. Se desarrollaron patrones y se obtuvieron relaciones descritas anteriormente. Los datos se analizaron después mediante modelado de PLS-DA. Las variables con los valores más altos de la Variable de importancia (mayor de 2,5) fueron todas relaciones compuestas. Los modelos de omisión de uno mostraron una uniformidad de variables de importancia para la separación, las principales relaciones de compuestos conocidos fueron IPA/ácido indol láctico, ГPA/cresol, cresol/tirosina, triptófano/ácido indolacético y triptófano/IPA.

Esto indica que incluso en el mismo entorno, el microbioma intestinal agregado de dos individuos es diferente. Lo que respalda la influencia de la composición genética del individuo en la estructura del microbioma. Es un debate abierto si la huella metabólica del microbioma será un mejor discriminador de individuos que el mapeo genético agregado del microbioma.

La fig. 26 ilustra que el primer criterio para seleccionar compuestos para métodos dirigidos es que es un biomarcador progresivo, según lo mostrado por la tendencia de C a PMHD a EH en el panel izquierdo para IPA. Un criterio práctico es la estabilidad. En el segundo panel, la estabilidad de IPA en plasma muestra solo 5 % de degradación después de 7 días a temperatura ambiente. El desarrollo del método implica entonces la integración de los protocolos más sencillos de preparación e instrumentos para la velocidad y el mínimo tamaño de muestra e interferencias. Un protocolo preparatorio que usa una adición sencilla 3:1 de metanol a plasma centrifugando e inyectando sobrenadante se hizo coincidir con una fase móvil, columna y ajustes de detector que permiten sensibilidad a 2 ng/ml, linealidad en todo el intervalo y análisis sin interferencias determinadas en la actualidad. El método también se adaptó a cerebro, heces y orina para ensayos en animales para demostrar la congruencia del biomarcador en seres humanos y modelos de ratón de EH como una condición deseable para usar modelos de ratón en ensayos terapéuticos. El tercer panel ilustra la aplicación del método a la orina de ratones en un estudio de carga de dosis de LP AM que muestra dos metabolitos en animales dosificados (verde) y los mismos dos metabolitos en ratones no dosificados (azul) y en orina humana (rojo). La orina animal dosificada proporcionó material suficiente para el aislamiento y la determinación de MS como probables compuestos metabolitos de tipo glucurónido de fase II con m/z de 480,14 y 482,15, respectivamente.

La fig. 27A proporciona una comparación de subalcuotas de plasma usando el método de IPA dirigido frente a valores obtenidos integrando los picos principales y siguientes dominantes en los cromatogramas del método de encuesta de gradiente largo. El par duplicado de 11 % dtr entre los métodos es trivial con respecto a la variabilidad biológica de 100-125 % dtr. Este estudio permitió la derivación de valores precisos a partir de cromatogramas archivados de los últimos 21 años en los que el IPA estuvo presente como una señal que no se había identificado estructuralmente o incluido en el patrón de calibración mixto usado para todos los ensayos en ese momento.

En referencia de nuevo a la fig. 23, el panel de la izquierda muestra una de una serie de pruebas (omisión de dos) del modelo de PLS-DA para evaluar el grado en que la huella del microbioma intestinal reflejada en los patrones de heces normalizados con respecto al peso seco de LCECA unido de manera coordinada permite la clasificación de ratones jóvenes de 19 días compañeros de camada TS y GP CAG140. Los conjuntos de entrenamiento de 8 y los conjuntos de validación de 2 se evalúan secuencialmente para todas las muestras. En el ejemplo mostrado, tanto GP como un TS se clasificaron correctamente. En el panel izquierdo se muestra un modelo similar para ratones TS y GP CAG 140 viejos de 90 días, donde ambos se clasificaron correctamente. Generalmente, para las categorías jóvenes y viejas, el CCR es de 0,83 y 0,81 respectivamente. Eso sugiere que actualmente se puede clasificar el estado genético de un ratón mediante su huella de microbioma aproximadamente el 80 % del tiempo, incluso antes de cualquier síntoma.

La fig. 24 ilustra patrones fecales de la huella del microbioma intestinal que muestra separación categórica completa para el modelo de ratón de ELA G93A (ELA en rojo) y compañeros de camada de tipo silvestre (TS en negro). Los ELA TS y TRT-TS y G93 A TRT tratados con Froximum en azul y verde se mueven a un espacio diferente en el que son más congruentes entre sí. Se observan separaciones similares, aunque categóricamente más débiles, en los perfiles metabólicos del cerebro y la médula espinal cadavéricos.

La fig. 25A ilustra un patrón de huella del microbioma intestinal del extracto de isopropanol de cantidades aproximadamente iguales de material fecal en papel higiénico a baja amplificación de 10 ua a escala completa para

dos individuos (1 y 2).

La fig. 25B muestra un patrón de huella del microbioma intestinal del extracto de isopropanol de cantidades aproximadamente iguales de material fecal en papel higiénico a media amplificación de 1 ua a escala completa para dos individuos (1 y 2).

La fig. 25A muestra un patrón de huella del microbioma intestinal del extracto de isopropanol de cantidades aproximadamente iguales de material fecal en papel higiénico a baja amplificación de 500 ua a escala completa para dos individuos (1 y 2) que muestra regiones de diferencias significativas.

La fig. 28 muestra un modelo de componente PLS-DA 3 de firmas de huella de microbioma intestinal obtenidas de muestras fecales de papel higiénico colocadas en 35 ml de isopropanol al 70 % en tubos de 50 ml y procesadas para perfiles de LCECA. 6 muestras durante un periodo de 15 días de la esposa (rojo) y 7 muestras durante un periodo de 15 días del esposo (negro) y una tomada a los 20 días después del uso de un antibiótico después de la cirugía dental mostrada en azul.

La fig. 29 muestra un diagrama de cajas ABNOVA de individuos con niveles de IPA determinados en muestras en serie durante tiempos de 6 meses a 5 años. El valor de P para la hipótesis nula (que la dispersión en los valores de IPA está dentro de los individuos y no se debe a diferencias específicas individuales) es de $2,1 \times 10^{-16}$, que es una indicación muy significativa de que I3PA es una característica específica del individuo a lo largo del tiempo.

La fig. 30 muestra los resultados de un estudio de carga del derivado de I3PA indol propionamida (IPAM) en el modelo de ratón de EH R6/2 del que los inventores obtuvieron y desarrollaron métodos para supervisar los niveles de IPA en plasma y cerebro a partir de metabolitos urinarios de IPA.

Una cohorte de ratones con EH R6/2 se dosificó diariamente durante 3 semanas por vía intraperitoneal con 200 ug del derivado de IPA amida indol propionamida (IPAM) y se comparó con

R6/2 sin dosificar y sus compañeros de camada de tipo silvestre. Se recogieron heces y orina en el momento del sacrificio y sangre y cerebro después del sacrificio. Los datos indican:

1. Que los niveles en cerebro y plasma se correlacionan con los niveles urinarios y, por tanto, los animales pueden seguirse en un ensayo farmacológico sin sacrificio.

2. Ese IPAM se convierte rápidamente en la sangre a IPA pero menos rápidamente en el intestino, lo que da como resultado niveles en el cerebro que se correlacionan con los niveles de IPA en plasma, lo que sugiere que la administración directa de IPA sería una mejor alternativa que el uso del derivado.

3. Los niveles en R6/2 de IPA en cerebro y plasma son menores que en ratones de tipo silvestre. En este estudio, aunque los niveles en heces fueron menores, la reducción no fue significativa.

Los inventores ofrecen un método para la preparación de terapias de indol purificado. Los indoles como clase están sujetos a degradación y contaminación, tal como el problema encontrado con las preparaciones de triptófano que estaban relacionadas con el desarrollo de la eosinofilia basal. Las fuentes comerciales nominalmente puras de indoles cuando se evalúan usando técnicas de LCECA ultrasensibles muestran trazas de otros compuestos desde los niveles de ug/mg a (pg/mg) (parte por mil millones a subparte por billón). Estos son potencialmente perjudiciales. El triptófano de uso farmacéutico y complementario se ha llevado ahora a niveles de alta pureza que pueden verificarse mediante LCECA. Para aprovechar esto, los inventores han desarrollado un protocolo para crear altas concentraciones de IPA usando levadura de cerveza que también produce IPA con relativamente buena eficacia actuando en un sustrato de glucosa y triptófano. La levadura de cerveza como tal es un complemento común y está presente como un extracto en la alimentación normal de ratones de investigación. La producción de IPA en esta matriz proporciona un IPA muy purificado en una matriz verificable y largamente aceptada. Como ejemplo, una preparación de 1 g de levadura de cerveza, 500 mg de glucosa y 50 mg de triptófano que se deja incubar hasta su finalización a temperatura ambiente (90-120 min) en 35 ml de agua destilada produce aproximadamente 3 mg de IPA. Pasar el sobrenadante a través de un filtro de 10 K de PM indica que el 75-80 % del IPA se une de manera coordinada con proteína de levadura de cerveza. El material unido es extraíble en disolventes orgánicos, pero no se libera significativamente en HCl a las concentraciones halladas en el estómago. El IPA unido a proteínas como un medio de dosificación en ensayos en animales o seres humanos permite que el IPA llegue al intestino antes de ser liberado de la proteína y, en consecuencia, proporciona niveles aumentados en plasma y potencia cambios en el microbioma intestinal agregado. El proceso puede inherentemente cambiarse de escala a cualquier nivel deseado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, ictus o traumatismo craneal en un animal, o para retardar o aliviar los efectos de dicha enfermedad o lesión en un animal que la padece, **caracterizada por que** dicha composición comprende ácido indol-3-propiónico unido de forma coordinada con una proteína, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma.
- 10 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, **caracterizada por** uno o más de los siguientes elementos:
- 15 (a) en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un alimento o bebida; y
(b) en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de las neuronas motoras inferiores, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson; y
(c) en donde la composición se encapsula para alcanzar el intestino antes de estar disponible.
- 20 3. Una composición que contiene ácido indol-3-propiónico unido de manera coordinada con una proteína para su uso en el tratamiento de un animal susceptible o que padece una enfermedad neurodegenerativa, un ictus o un traumatismo craneal en un animal que necesite dicho tratamiento.
- 25 4. La composición para su uso según la reivindicación 3, **caracterizada por** uno o más de los siguientes elementos:
- 30 (a) en donde dicho ácido indol-3-propiónico unido de manera coordinada con una proteína está en un vehículo farmacéuticamente aceptable;
(b) en donde dicho ácido indol-3-propiónico unido de manera coordinada con una proteína está en un alimento o una bebida;
(c) en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, enfermedad de las neuronas motoras inferiores, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson; y
(d) en donde la composición se encapsula para alcanzar el intestino antes de estar disponible.
- 35 5. Ácido indol-3-propiónico unido de manera coordinada con una proteína, para su uso como agente terapéutico para proteger a un animal a punto de ser sometido a un alto riesgo de lesión física contra daño neurológico.
6. El ácido indol-3-propiónico para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho riesgo comprende deportes de contacto o batalla.

Fig. 1A

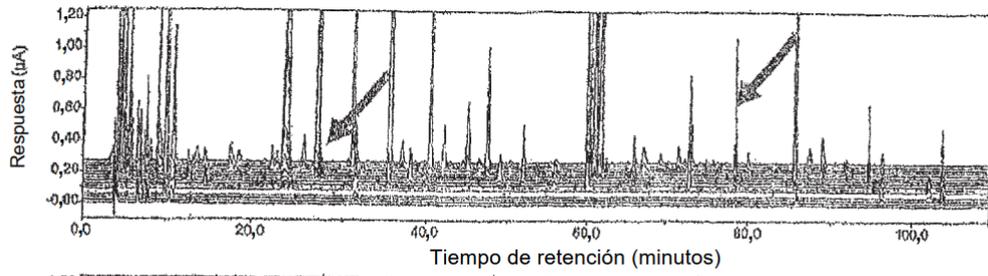


Fig. 1B

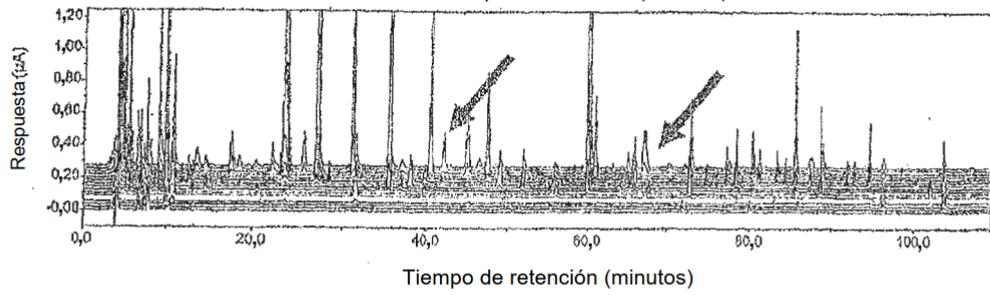


Fig. 2A

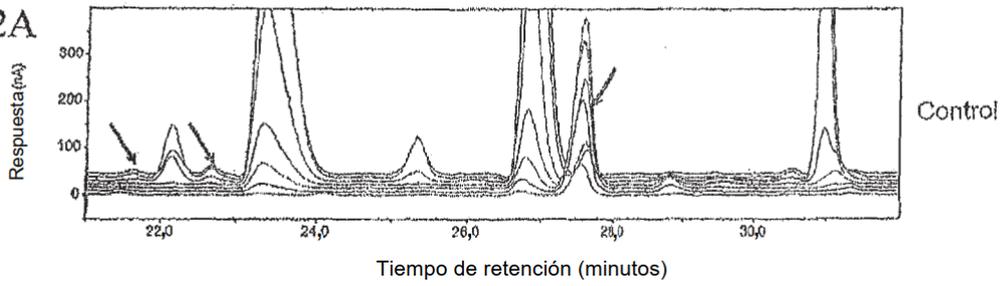


Fig. 2B

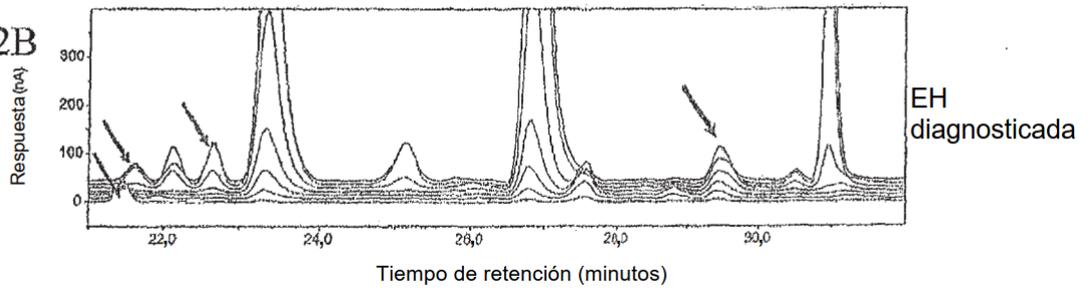


Fig. 3

		CX108147	CX104	CX84	CX105	CX100	CC28	CC25	CC83	CC27	CC21	PROMEDIO	
	OH-RY	10/21/04	11/30/04	2/3/06	1/26/06	2/7/05	3/6/07	12/7/06	7/3/05	6/20/07	1/23/06	Oral	Controles
46181	11-78,000	2	52507	169	31	331	2934	509	-284	1265	3288	3933	2024
46182	11-78,025	108	24953	480	272	731	15474	4051	2250	6103	11729	4647	4995
46183	11-78,05	702	11134	1261	1107	2051	31457	14237	12165	22359	36733	7072	12821
46184	11-78,075	1700	4477	2878	2060	4706	134680	39243	10500	65417	30077	12637	29239
46185	11-78,1	3187	2420	6122	6991	9422	291967	51590	99369	156790	169840	24495	61377
46186	11-78,125	6370	3194	19782	10380	19802	590433	174150	183180	309810	263387	42611	131042
46187	11-78,15	8240	6122	16132	19839	26403	309790	278680	345837	507767	396508	65462	172845
46188	11-78,175	16917	15715	20761	20834	29022	3046100	376038	495330	694005	510567	89970	229341
46189	11-78,2	12912	22091	23130	28140	30189	1159067	454138	695767	866920	566567	19668	261810
46190	11-78,225	12967	22998	22809	22856	29822	1116767	431667	620167	816933	5591043	98466	253231
46191	11-78,25	11190	20747	19662	19574	29085	254780	976613	542600	739483	408683	35272	224071
46192	11-78,275	6922	16309	15675	15238	25493	730167	289013	423900	589233	323097	66036	173099
46193	11-78,3	6500	11931	11203	10942	14637	507587	202473	301227	421300	279760	45511	121259
46194	11-78,325	4406	6611	7409	7430	8662	326720	132587	183490	276417	182970	30683	78722
46195	11-78,35	2848	5120	4811	4931	5999	199567	43167	123377	170627	112257	19572	48478
46196	11-78,375	1623	2740	2739	3321	3665	119110	48667	74068	101727	65130	12338	29066
46197	11-78,4	1226	1281	1696	2397	2094	71537	19530	46073	64497	28669	7977	17484
46198	11-78,425	918	608	810	1017	1181	44543	6281	26778	37143	23367	5274	30847
46199	11-78,45	760	191	383	1071	594	28508	13841	18971	24328	149391	3657	7239
46200	11-78,475	867	2	97	1505	206	20350	10002	19018	16830	10094	7668	5215
46201	11-78,5	563	-26	-21	1338	303	19572	8063	7835	12512	7169	2053	4043

Fig. 4

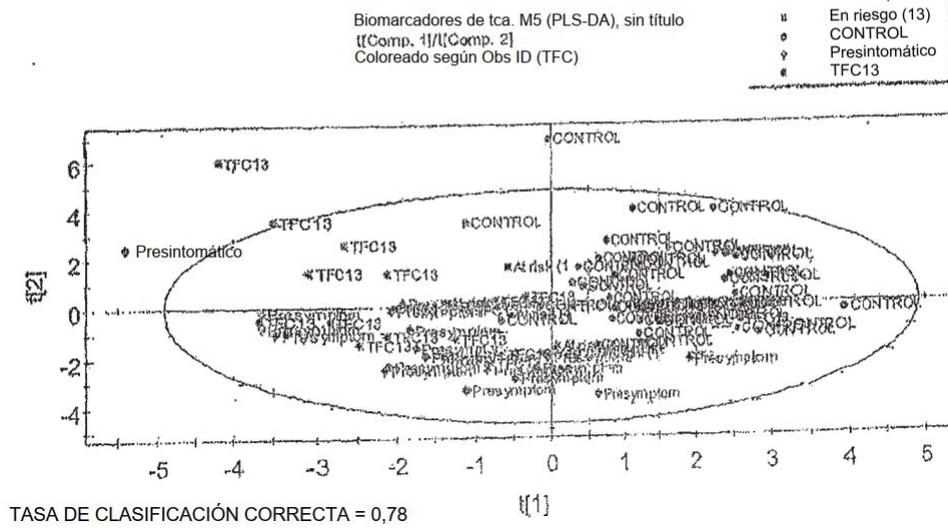


Fig. 5

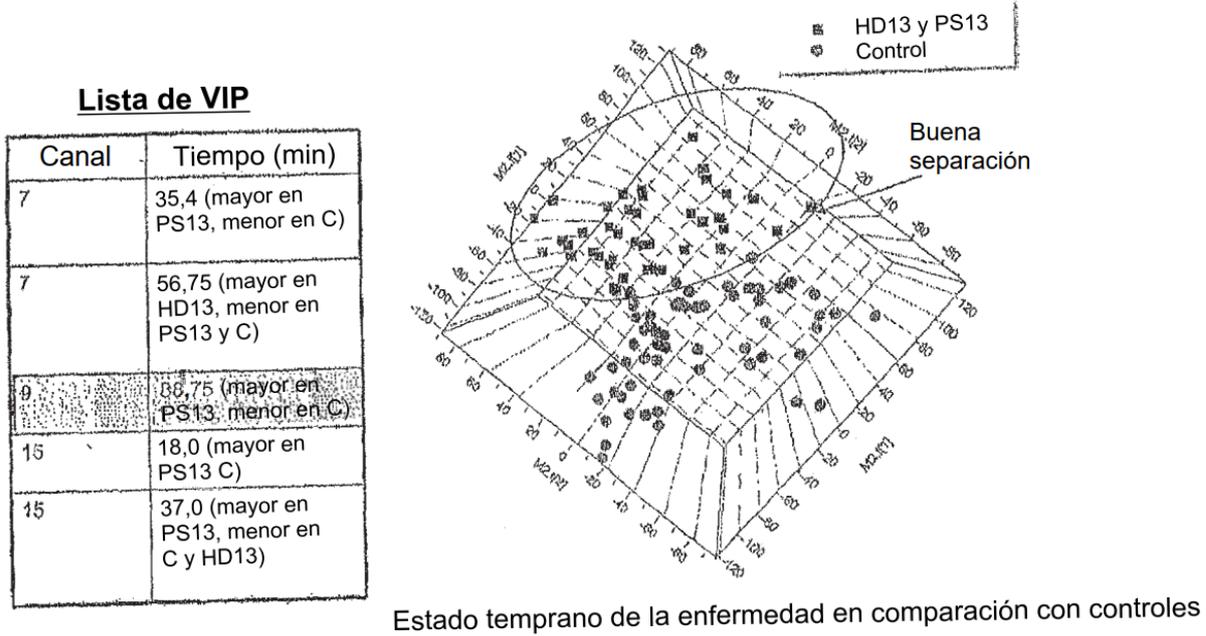


Fig. 6

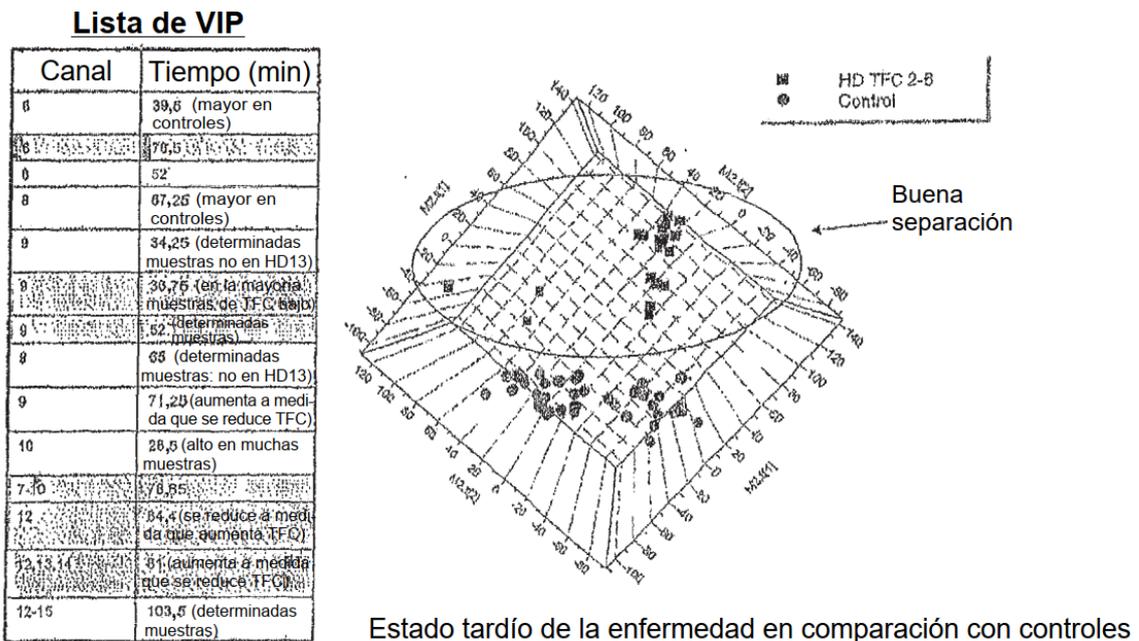
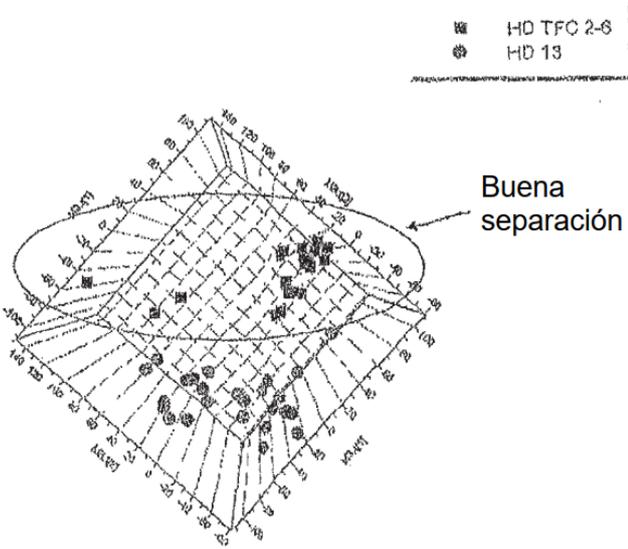


Fig.7

Lista de VIP

Canal	Tiempo (min)
3	21,5 (mayor en PS13)
8	80 (aumenta a medida que se reduce TFC)
8	82,76 (*)
8	6,5
8	38,25
8	38,5
8	55,71
8	36,5 (*)
8	52 (*)
8	64,75 (mayor en TFC5)
11	79 (no en HD 13 y C)
11	80
12	65,25 (mayor en TFC 2-5)
12	81 (menor en PS13)
12	79 (mayor en TFC menor)
15	22,8 (*)



Estado temprano de la enfermedad en comparación con estado tardío de la enfermedad

Fig. 8A

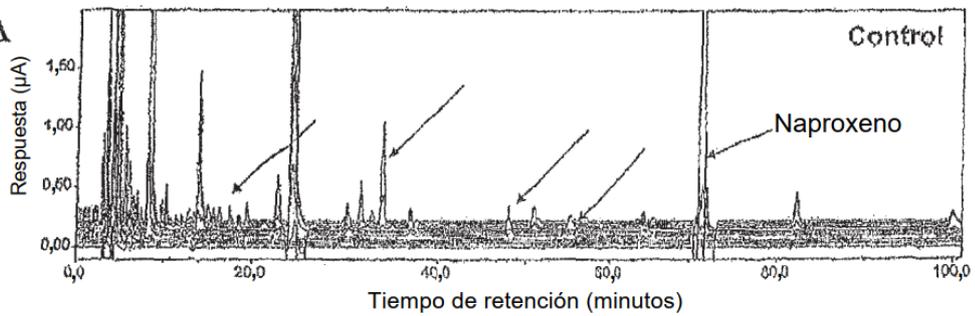


Fig. 8B

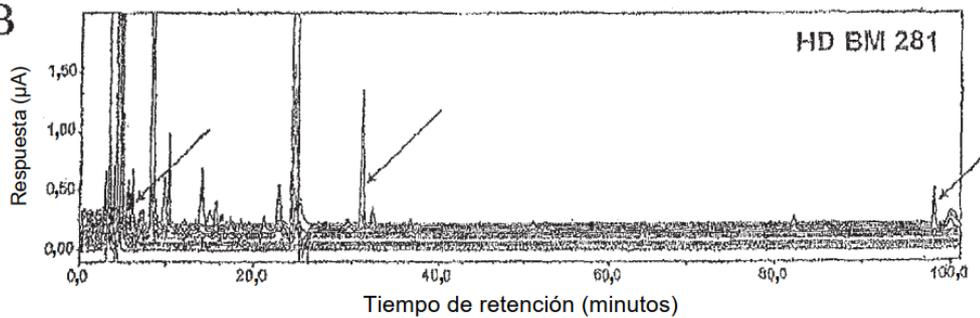


Fig. 9A

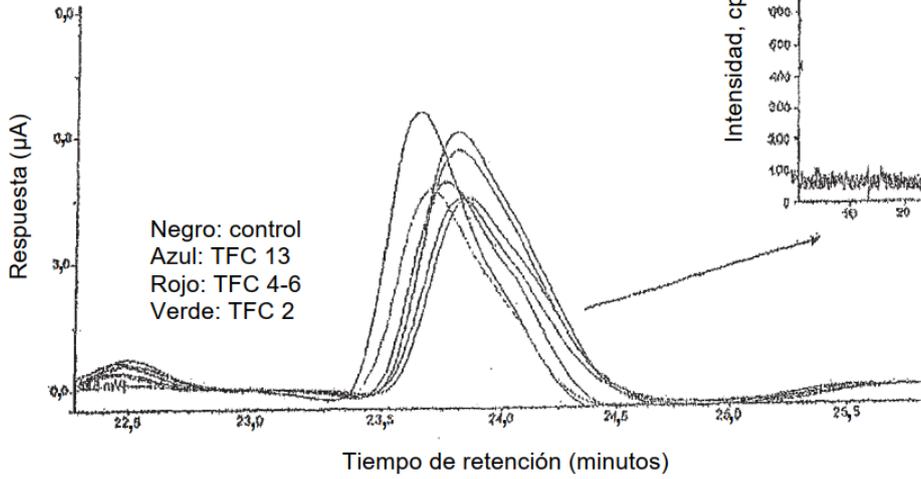


Fig. 9B

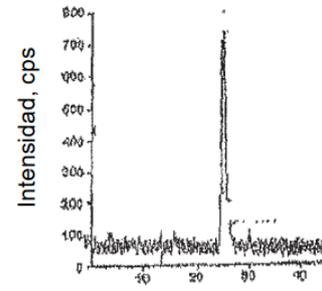


Fig. 10A

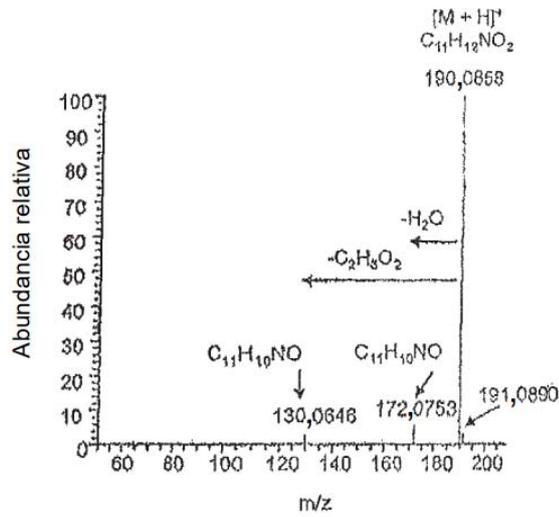


Fig. 10B



Fig.11

Fracción de ACN al 30% de control

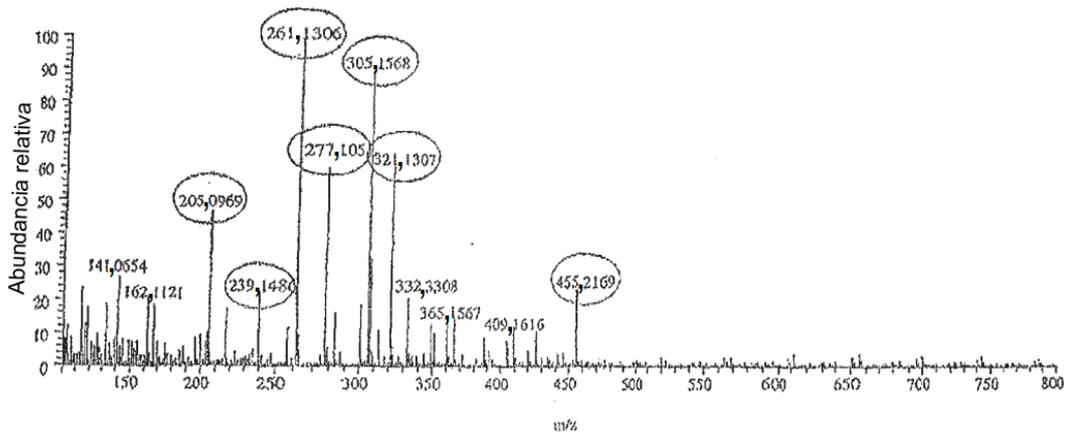


Fig.12

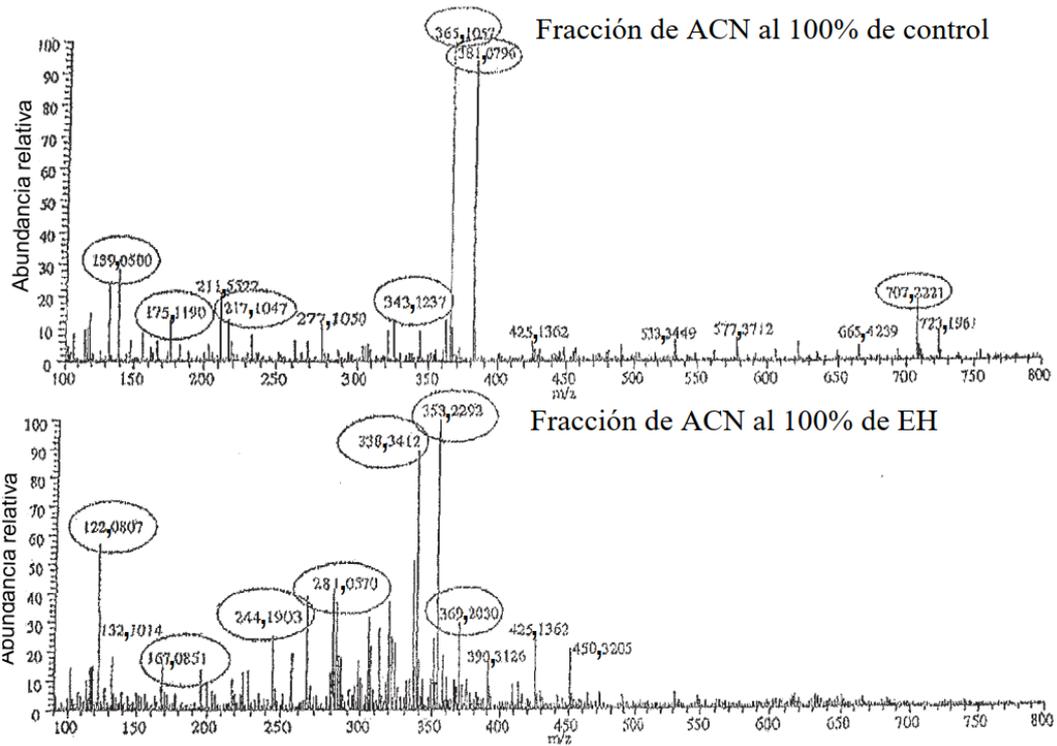


Fig.13

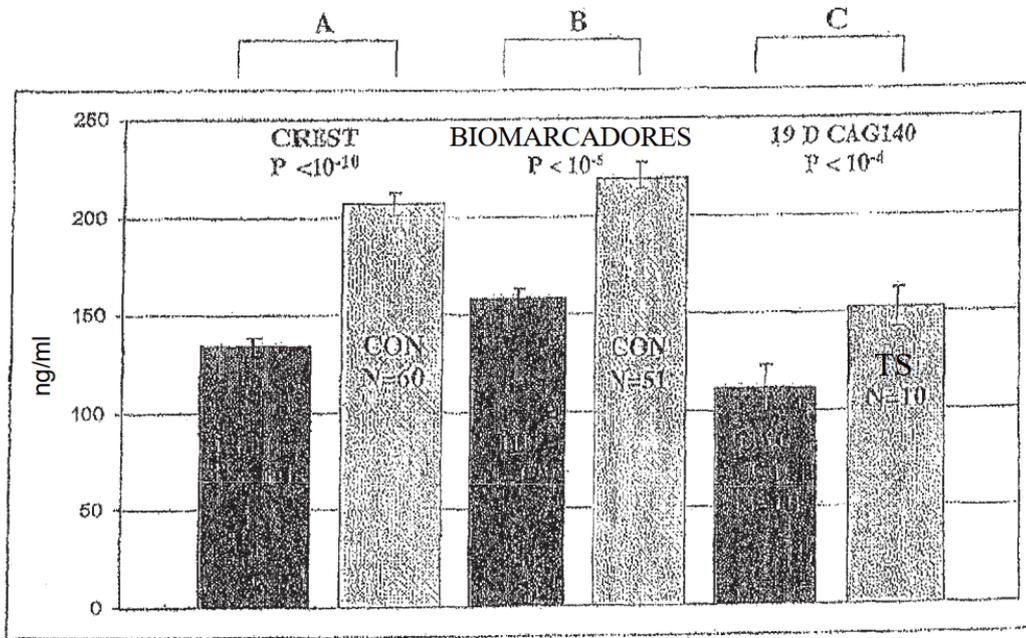


Fig.14

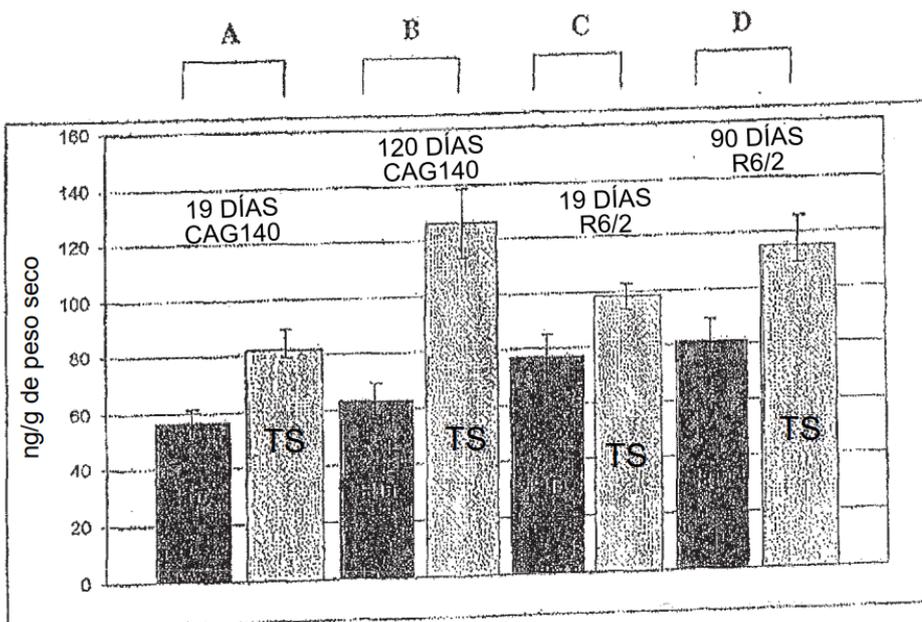


Fig.15

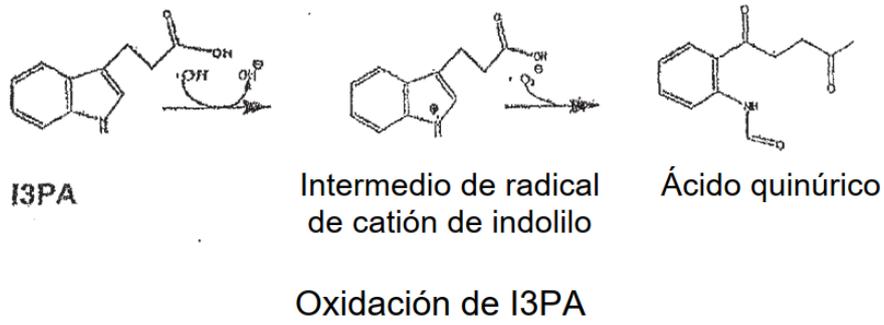
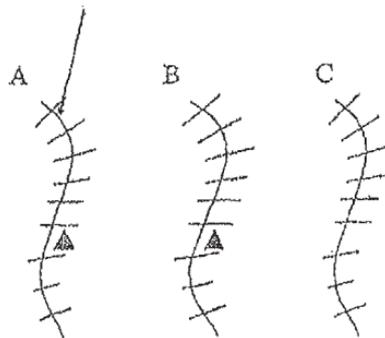


Fig.16

Representación de un fragmento digerido por PK



▲ = Producto de oxidación de I3F

Fig.17

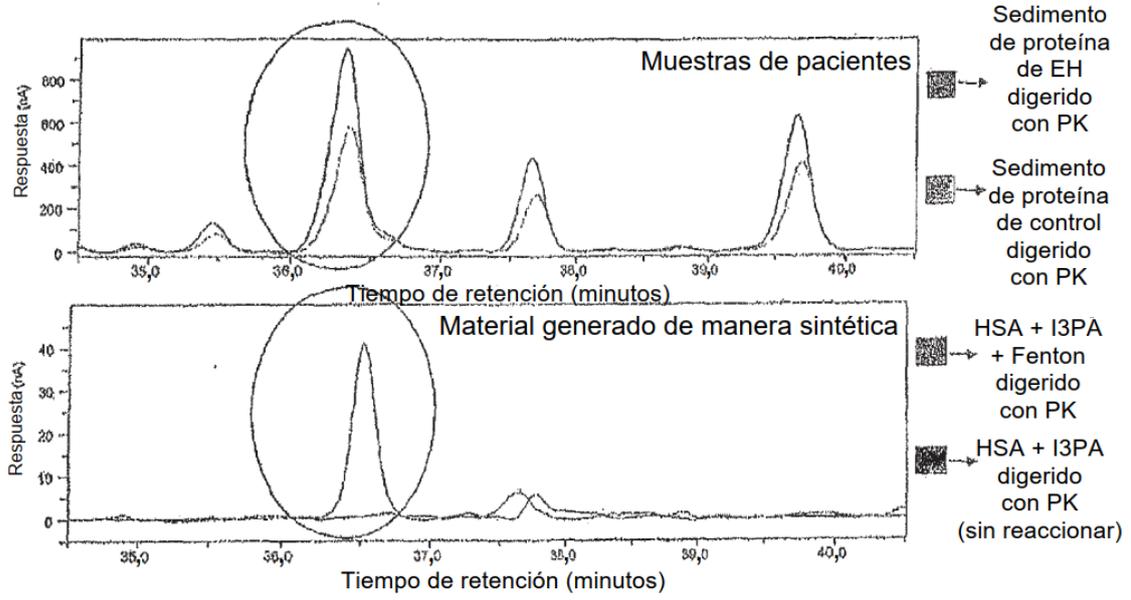


Fig.18

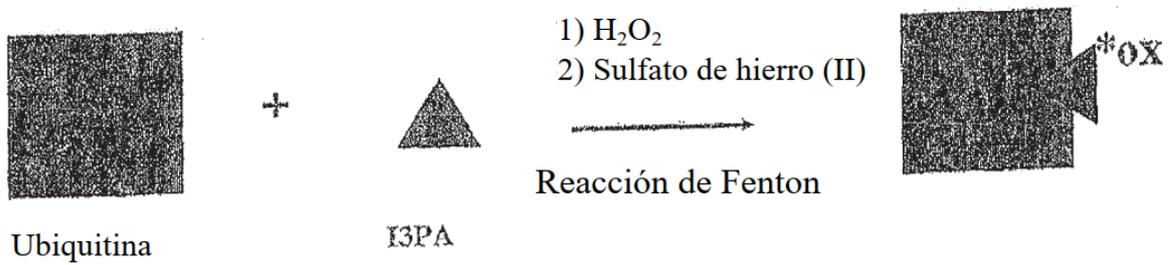


Fig.19

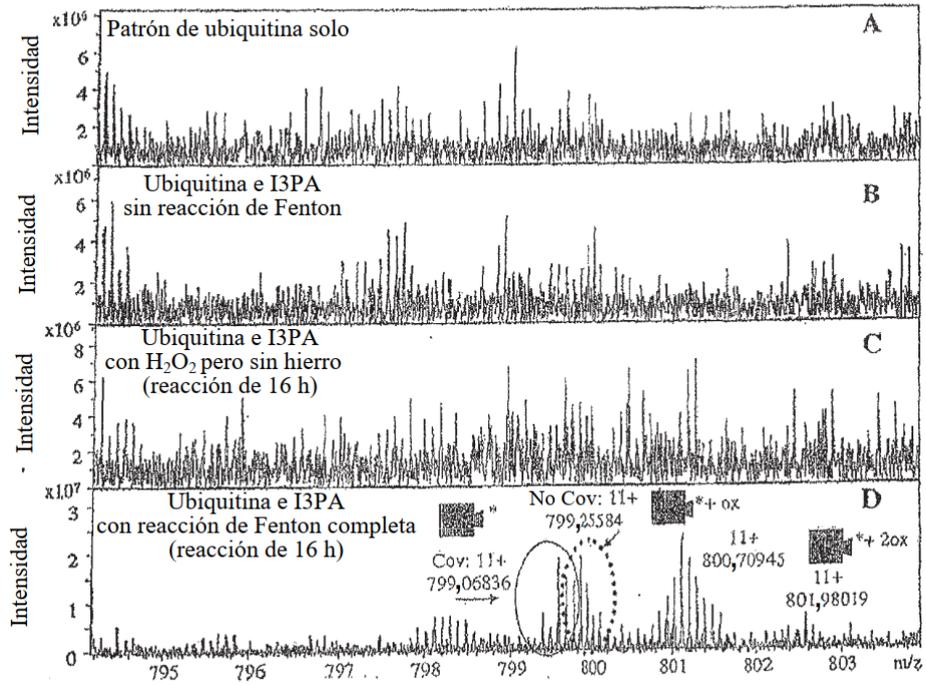


Fig.20

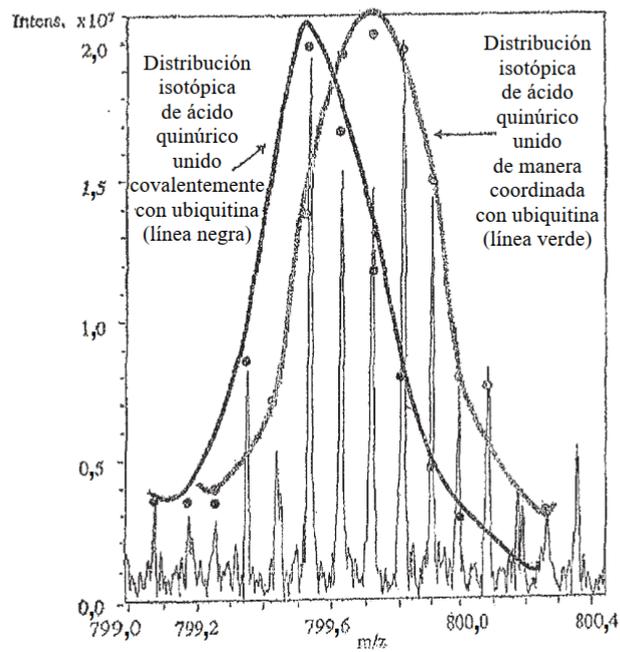


Fig.21

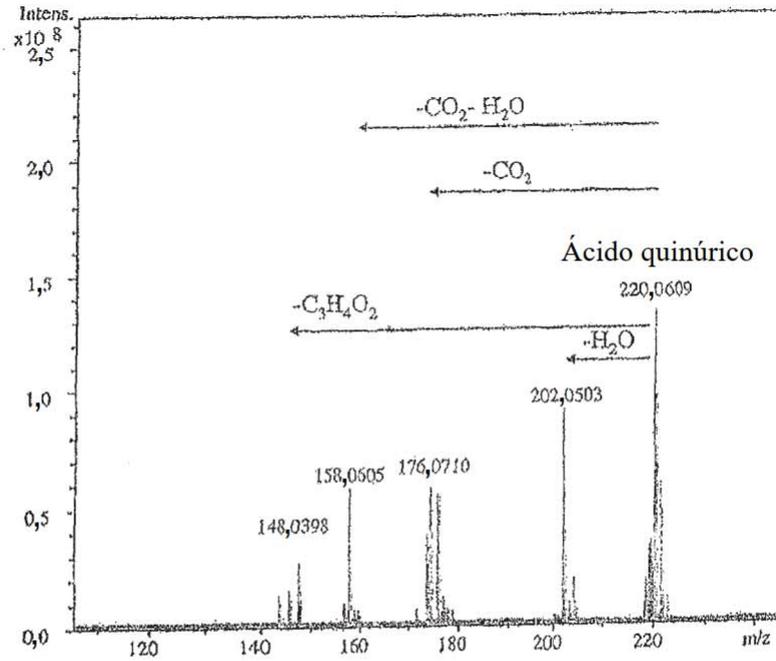
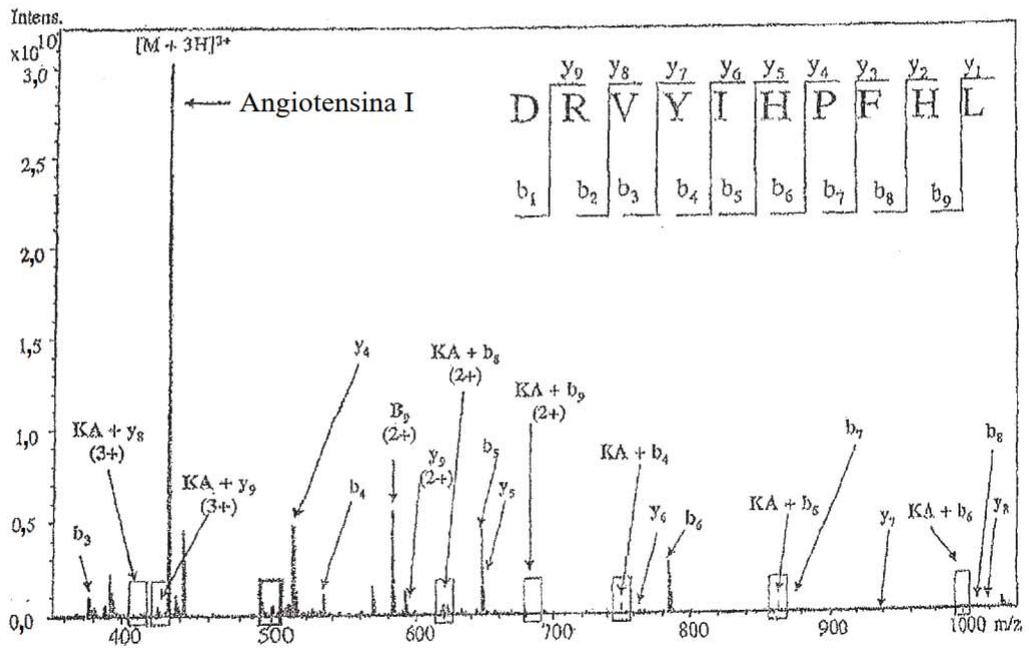


Fig.22



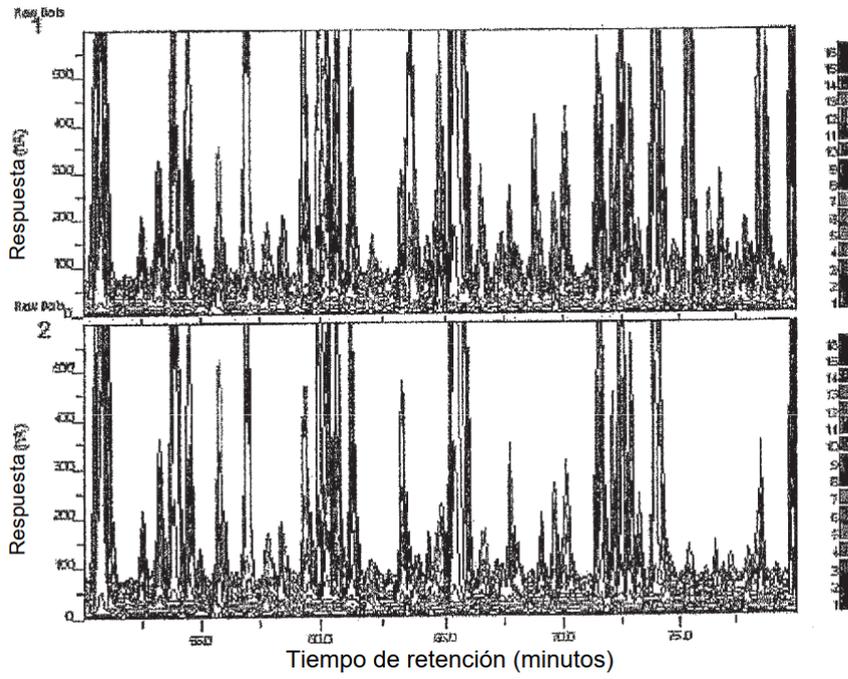


Fig. 25C



Fig. 26

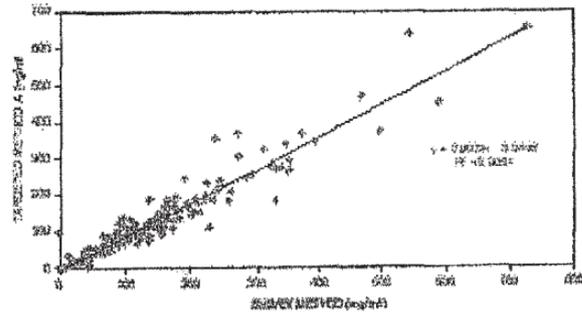


Fig. 27

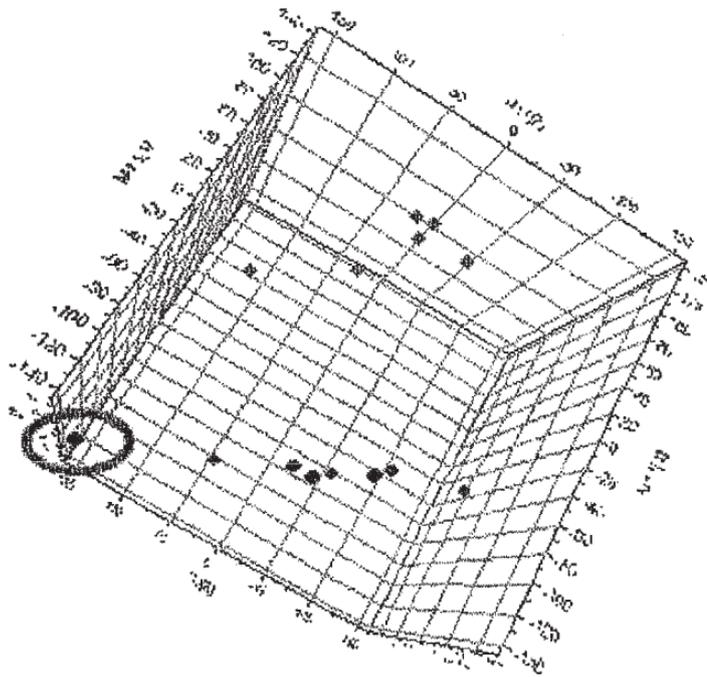


Fig. 28

FIG. 30

		CEREBRO		PLASMA		HECES		ORINA
		IPA	IPAM	IPA	IPAM	IPA	IPAM	pico 1 y 2
IPAM dosificado R6/2		pg/mg	pg/mg	ng/ml	ng/ml	pg/mg	pg/mg	suma uQ
								nM/ml
	MIPAM10	36,34	1,71	1738,84	9,27	26734,25	21916,58	16,18
	MIPAM3	51,01	2,16	1001,09	14,54	36782,75	6660,25	16,78
	MIPAM4	41,40	1,28	1765,43				
	MIPAM5	48,40	1,22	1894,76	6,44	8375,38	23332,13	14,61
	MIPAM6	46,92	1,27	2023,56	10,50	14465,50	14953,58	34,17
	MIPAM7	45,76	3,99	1630,28	11,03	6494,00	802,07	11,65
	MIPAM9	30,98	5,60	960,30	7,72	6574,63	1335,50	21,70
R6/2 ratón								
	MV1	2,15	0,33	71,26	0,13			1,70
	MV10	2,18	0,12	80,47	2,68	1077,00	19,83	1,70
	MV2	2,21	0,05	98,12	0,13	1825,50	7,30	1,36
	MV3	1,74	0,05	136,65	3,17	2011,32	7,65	1,26
	MV4	2,69	0,05	119,79	3,00	1243,81	2,96	1,31
	MV6	1,79	0,68	42,90	1,85	762,08	9,48	1,83
	MV7	2,37	1,04	32,69	2,71	785,28	1,57	1,93
	MV9	1,20	0,10	31,61	0,19	1179,33	0,00	0,52
TIPO SILVESTRE								
	MWT1	2,82	0,32	100,56	0,98	1157,18	3,07	3,40
	MWT2	3,08	0,05	171,53	0,13	2151,56	7,46	4,39
	MWT5	1,99	0,05	168,53	2,65	775,75	5,22	4,04
	MWT7	4,17	0,05	185,59	1,93	1754,88	0,15	2,57
	MWT8	5,50	0,81	285,73	2,42	1641,11	0,19	3,51
	MWT9	4,48	0,91	185,73	0,84	805,29	10,35	2,39
Tipo silvestre promedio		3,674	0,364	182,946	1,490	1380,959	4,406	3,38
R6/2 promedio		2,026	0,298	77,462	1,962	1269,190	6,970	1,42
p de prueba de t		0,022	0,848	0,007	0,638	0,460	0,274	7,36413E-05
PEARSON r								
orina frente a cerebro total		0,860						
orina frente a cerebro sin dosificar		0,500						
orina frente a plasma total		0,863						
orina frente a plasma sin dosificar		0,627						