



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 303 954**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 9/66 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04775479 .1**

(86) Fecha de presentación : **24.09.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1668372**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

(54) Título: **Huellas peptídicas de elastina y métodos de análisis para MMP12 relacionadas con COPD.**

(30) Prioridad: **25.09.2003 SE 0302559**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2008

(73) Titular/es: **AstraZeneca AB.**
151 85 Södertälje, SE

(72) Inventor/es: **Broberg, Per;**
Fehniger, Thomas;
Marko-Varga, György y
Uebel, Stephan

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 303 954 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

Huellas peptídicas de elastina y métodos de análisis para MMP12 relacionadas con COPD.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos para producir y usar huellas proteínicas o peptídicas, y a biomarcadores proteínicos o peptídicos. Estos métodos y biomarcadores se pueden usar en la identificación, evaluación, estudio o monitorización de afecciones o enfermedades, por ejemplo para ayudar al descubrimiento, desarrollo o uso de fármacos para tratar esas afecciones o enfermedades.

Antecedentes de la invención

Diversos marcadores biológicos, conocidos como biomarcadores, se han identificado y estudiado a través de la aplicación de la bioquímica y de la biología molecular a situaciones médicas y toxicológicas. Un biomarcador se ha descrito como “una característica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”. Un biomarcador es cualquier indicador identificable y medible asociado con una afección o enfermedad particular en la que existe una correlación entre la presencia o nivel del biomarcador y algún aspecto de la afección o enfermedad (incluyendo la presencia de, el nivel o nivel cambiante de, el tipo de, la etapa de, la susceptibilidad a la afección o la enfermedad, o la sensibilidad a un fármaco usado para tratar la afección o enfermedad). La correlación puede ser cualitativa, cuantitativa, o tanto cualitativa como cuantitativa. Típicamente, un biomarcador es un compuesto, un fragmento de un compuesto, o un grupo de compuestos. Tales compuestos pueden ser cualesquiera compuestos encontrados en o producidos por un organismo, incluyendo proteínas (y péptidos), ácidos nucleicos y otros compuestos.

Los biomarcadores tienen un poder pronóstico, y se pueden usar para pronosticar o detectar la presencia, el nivel, el tipo o la etapa de las afecciones o enfermedades particulares (incluyendo la presencia o nivel de microorganismos o toxinas particulares), la susceptibilidad (incluyendo la susceptibilidad genética) a afecciones o enfermedades particulares, o la respuesta a tratamientos particulares (incluyendo tratamientos con fármacos). Se piensa que los biomarcadores desempeñarán un papel cada vez más importante en el futuro del descubrimiento y desarrollo de fármacos, mejorando la eficacia de los programas de investigación y desarrollo. Los biomarcadores se pueden usar como agentes de diagnóstico, como monitores de la progresión de la enfermedad, como monitores del tratamiento, y como pronósticos del desenlace clínico. Por ejemplo, diversos proyectos de investigación con biomarcadores están intentando identificar marcadores de cánceres específicos y de enfermedades cardiovasculares e inmunológicas específicas.

Se han desarrollado tecnologías proteómicas (incluyendo peptidómicas) para analizar proteínas (incluyendo péptidos). Estas tecnologías se aplican en un modo de alto rendimiento, generando una cantidad enorme de datos que se analiza usando sistemas por ordenador. Las proteínas procedentes de una muestra biológica se aíslan y se separan a una resolución elevada, por ejemplo mediante separaciones cromatográficas. El conjunto de proteínas se caracteriza entonces usando técnicas cualitativas y cuantitativas, tales como la espectrometría de masas. El resultado es una huella (un conjunto constante, reproducible, de proteínas o péptidos) proteínica (o peptídica). Las proteínas/péptidos seleccionados, o grupos de proteínas/péptidos, se pueden analizar posteriormente para generar perfiles proteómicos/peptídicos. La proteómica se ve ahora como el análisis a gran escala de la función de genes, y se está convirtiendo en un campo importante en la genómica funcional.

La separación de proteínas se logra habitualmente usando técnicas a base de gel. Actualmente, la 2D-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) es el principal método analítico para estudiar la expresión celular de las proteínas. Las plataformas instrumentales permiten operaciones casi completamente automatizadas del análisis en gel bidimensional. Los métodos en gel bidimensional tienen una buena sensibilidad y resolución para una gran fracción de proteínas expresadas, típicamente aquellas dentro de un intervalo de masas de 10-120 kDa. Sin embargo, los métodos tienen limitaciones significativas en la identificación de proteínas de baja abundancia/bajo peso molecular, algunas de las cuales están presentes a concentraciones tan bajas como unas pocas moléculas por célula. Los problemas de pérdida de muestra y/o recuperación insuficiente han confundido el aislamiento de proteínas de baja abundancia/bajo peso molecular mediante 2D-PAGE. Además, la presencia de estas proteínas se puede enmascarar mediante las manchas de proteínas de mayor abundancia. Otras clases de proteínas que son problemáticas para 2D-PAGE incluyen proteínas ácidas, básicas, hidrófobas y de alto peso molecular.

La HPLC (cromatografía de líquidos de altas prestaciones) multidimensional se ha usado como una buena alternativa para separar proteínas o péptidos no adecuados para 2D-PAGE. La mezcla proteínica o peptídica se hace pasar a través de una sucesión de fases estacionarias cromatográficas o dimensiones que dan un mayor poder de resolución. La HPLC es también más flexible que los métodos de separación mediante gel bidimensional, puesto que las fases estacionaria y móvil se pueden seleccionar según su idoneidad a la hora de resolver clases específicas de proteínas o péptidos de interés, y según la compatibilidad entre sí y con métodos de detección e identificación espectrométricos de masas aguas abajo. Se conocen configuraciones en línea de estos tipos de plataformas de separación de múltiples mecanismos.

La espectrometría de masas (MS) es también un elemento esencial del campo de la proteómica. De hecho, la MS es una herramienta principal usada para estudiar y caracterizar en este campo proteínas purificadas. El enlace de interfaz

en la proteómica y MS, que presenta cientos o miles de proteínas, se realiza mediante tecnología en gel, en la que se puede alcanzar una elevada resolución en un solo gel. Los investigadores están aprovechando con éxito el poder de la MS para suplantar los geles bidimensionales que dieron originalmente su ímpetu a la proteómica.

La aplicación y desarrollo de la espectrometría de masas (MS) para identificar proteínas o péptidos separados vía técnicas de separación en fase líquida y/o técnicas de separación a base de gel han conducido a un avance tecnológico significativo en el análisis de la expresión de proteínas y péptidos. Hay dos métodos principales para la caracterización espectrométrica másica de proteínas y péptidos: la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización mediante electropulverización (ESI). Usando diversos enfoques, las fuentes iónicas de MALDI y ESI se pueden combinar con el tiempo de vuelo (TOF) u otros tipos de analizadores espectrométricos de masas, para determinar las masas o las secuencias de los péptidos.

En MALDI, los péptidos se cocrystalizan con la matriz, y se pulsan con láseres. Este tratamiento vaporiza e ioniza los péptidos. Los pesos moleculares (masas) de los péptidos cargados se determinan entonces en un analizador de TOF. En este dispositivo, un campo eléctrico acelera las moléculas cargadas hacia un detector, y las diferencias en la duración del tiempo que toma a los péptidos ionizados alcanzar el detector (su tiempo de vuelo) revelan los pesos moleculares de los péptidos; los péptidos más pequeños alcanzan el detector más rápidamente. Este método genera perfiles másicos de las mezclas peptídicas - esto es, perfiles de los pesos moleculares y cantidades de péptidos en la mezcla. Estos perfiles se pueden usar entonces para identificar proteínas conocidas, a partir de bases de datos de secuencias proteínicas.

En ESI y en una técnica denominada cromatografía de líquidos (LC)/MS/MS, se aplica un voltaje a una aguja muy fina que contiene una mezcla peptídica. La aguja pulveriza entonces gotitas en un analizador espectrométrico de masas, en el que las gotitas se evaporan y se liberan iones peptídicos. En LC/MS/MS, los investigadores usan dispositivos de LC microcapilares para separar inicialmente péptidos.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica valiosa debido a que mide una propiedad intrínseca de una biomolécula, su masa, con una sensibilidad muy elevada. Por lo tanto, la MS se puede usar para medir un amplio intervalo de tipos de moléculas (proteínas, péptidos, o cualesquiera otras biomoléculas) y un amplio intervalo de tipos de muestras/materiales biológicos. Se sabe que la preparación correcta de las muestras es crucial para la generación de la señal de MS y para la resolución y sensibilidad de los espectros. Por lo tanto, la preparación de las muestras es un área crucial para la factibilidad y sensibilidad globales del análisis.

Las proteínas se producen de forma natural dentro de las células, como componentes de estructuras celulares y como componentes de fluidos biológicos naturales tales como sangre, orina, saliva, lágrimas, linfa y sudor. La proteómica es una herramienta esencial para estudiar sistemas y procesos biológicos, debido a que las proteínas proporcionan una fuente rica de información valiosa. Por ejemplo, esta información permite la comparación de biomarcadores que pueden diferir cualitativa y/o cuantitativamente entre grupos de población sanos y enfermos. Las tecnologías proteómicas permiten la identificación de especies proteínicas individuales en mezclas complejas de proteínas.

La proteómica se está usando en el descubrimiento y desarrollo de fármacos, por ejemplo para detectar proteínas alteradas significativamente en pacientes con afecciones o enfermedades particulares. Algunas de estas proteínas asociadas con enfermedades se pueden identificar como nuevas dianas farmacéuticas, y algunas pueden ser útiles como biomarcadores de la progresión de la enfermedad. Tales biomarcadores se pueden usar para mejorar el desarrollo clínico de un nuevo fármaco, o para desarrollar nuevos diagnósticos para la enfermedad particular.

La detección de las proteínas asociadas con enfermedades se puede lograr mediante el siguiente método. Se toman muestras de proteínas tanto de sujetos enfermos como de sujetos sanos. Estas muestras pueden ser células, tejidos, o fluidos biológicos que se procesan para extraer y enriquecer los constituyentes proteínicos y/o peptídicos. Típicamente, el proceso implica el reparto en una fase de disolución, pero también puede incluir el establecimiento de los componentes proteínicos y/o peptídicos unidos a matrices sólidas. Después de la separación de alto rendimiento y análisis (proteómica) se producen huellas de expresión proteínica para los sujetos enfermos o sanos, mediante medidas cualitativas y cuantitativas. Estas huellas se pueden usar como identificadores únicos para distinguir individuos y/o establecer y/o hacer un seguimiento de ciertos procesos naturales o de una enfermedad. Estas huellas prototípicas se establecen para cada muestra/sujeto individual, y se registran como valores numéricos en una base de datos de un ordenador. Las huellas se analizan entonces usando herramientas bioinformáticas, para identificar y seleccionar las proteínas o péptidos que están presentes en las formas prototípicas cuya expresión puede o no estar presente diferencialmente en las muestras derivadas de aquellas de sujetos sanos y enfermos. Estas proteínas/péptidos se caracterizan entonces además, y se producen perfiles detallados que identifican las masas características y propiedades físicas de las proteínas o péptidos. Puede determinarse que una proteína/péptido singular o grupos de proteínas/péptidos están asociados significativamente con ciertos procesos naturales o mórbidos.

Se conocen diversas proteínas asociadas con enfermedades, y algunas de estas son enzimas cuya actividad aumenta o disminuye en alguna etapa en el desarrollo de una afección o enfermedad particular. Tales enzimas pueden ser dianas farmacéuticas adecuadas, conduciendo a una investigación de compuestos farmacéuticamente activos (fármacos) que se podrían usar para inhibir o estimular la enzima, y de este modo prevenir o tratar la afección o enfermedad. Otras proteínas asociadas con una enfermedad pueden ser productos de degradación de enzimas particulares, o proteínas que se obtienen de forma más abundante en presencia de la enfermedad.

Los ejemplos de proteínas asociadas con una enfermedad incluyen las metaloproteinasas, una superfamilia de proteinasas (enzimas) que se cree que es importante en una plétora de procesos mórbidos fisiológicos. La modulación de la actividad de una o más metaloproteinasas puede ser perfectamente beneficioso en estas enfermedades o afecciones. Se conoce un gran número de inhibidores de metaloproteinasas (véase, por ejemplo, los repastos de inhibidores de MMP mediante Beckett R.P. y Whittaker M., 1998, Exp. Opin. Ther. Patents, 8(3):259-282 y mediante Whittaker M. *et al.*, 1999, Chemical Reviews 99(9):2735-2776). Basándose en consideraciones estructurales y funcionales, las enzimas metaloproteinasas se han clasificado en familias y subfamilias, como se describe en N.M. Hooper (1994) FEBS Letters 354:1-6. Los ejemplos de metaloproteinasas incluyen las metaloproteinasas de la matriz (MMP) tales como las colagenasas (MMP1, MMP8, MMP13), las gelatinasas (MMP2, MMP9), las estromelisininas (MW3, MMP10, MMP11), matrilisina (MMP7), metaloelastasa (MMP12), enamelisina (MMP19) y las MT-MMP (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17).

Los ejemplos de proteínas asociadas con una enfermedad incluyen aquellas enzimas que se han visto implicadas en el inicio y/o progresión de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), según se explica más abajo.

Se espera que la COPD, que está causada principalmente por fumar, sea la tercera causa principal de muerte a nivel mundial en el año 2020. La COPD se caracteriza por un flujo espiratorio máximo reducido y un vaciado forzado lento de los pulmones. Estas limitaciones del flujo de aire se deben principalmente a bronquitis crónica, que implica hipertrofia de las glándulas mucosas, y a enfisema, producida por la destrucción de las paredes alveolares. Este último conduce a una ampliación de los espacios de aire distales a los bronquiolos terminales, con el consiguiente colapso de las vías respiratorias pequeñas, a limitaciones del flujo de aire, a la destrucción de partes del lecho capilar, y a la pérdida de la retracción elástica del pulmón. Esta pérdida de la retracción elástica y la ampliación de los espacios de aire en los pulmones, de pacientes con COPD, conducen a valores reducidos del volumen espiratorio máximo (FEV), y a un aumento de los valores de la capacidad vital forzada (FVC). La gravedad de la enfermedad se determina como el grado de alteración de la función pulmonar, que se mide con un espirómetro. La presencia de un FEV₁ postbroncodilatador < 80% del valor predicho, en combinación con un FEV₁/FVC < 70%, confirma la presencia de una limitación del flujo de aire que no es totalmente reversible. La exposición crónica al humo del cigarro provoca una respuesta inflamatoria en el pulmón, conduciendo a cambios en la superficie epitelial de las vías respiratorias y a la activación y a un mayor número de varias células inflamatorias.

Se ha propuesto desde hace mucho tiempo que la inflamación y un desequilibrio de proteasa-antiproteasa actúan como efectores aguas abajo de la destrucción pulmonar tras el tabaquismo crónico. Los estudios histológicos han demostrado mayores números de macrófagos y linfocitos T en las vías respiratorias de fumadores, y también un incremento de neutrófilos en las vías respiratorias de fumadores y de pacientes con COPD, lo que está relacionado con la gravedad de la obstrucción de las vías respiratorias. Los macrófagos alveolares son fagocitos de vida larga, y son las células de defensa más abundantes en el pulmón tanto en estados normales como durante la inflamación crónica. Al enviar factores quimiotácticos, reclutan entonces neutrófilos y linfocitos activando la expresión de moléculas en las células endoteliales microvasculares pulmonares en el sitio de infección. Las células inflamatorias que invaden el pulmón de los fumadores producen localmente mediadores, tales como citoquinas, serina- y metaloproteasas, y oxidantes. Estos mediadores, que probablemente desempeñan un papel importante en el desarrollo de COPD, pueden actuar para activar posteriormente la respuesta inflamatoria, y también para degradar los componentes de la matriz extracelular.

Normalmente, los inhibidores de proteinasas plasmáticas, especialmente α_1 -antitripsina (α_1 -AT), evitan que las enzimas proteolíticas digieran proteínas estructurales del pulmón. Según la hipótesis de proteinasa-antiproteinasa, el enfisema resulta de un incremento de la liberación de proteinasa en los pulmones, una reducción en la defensa antiproteínica, o una combinación. La elastina es el componente principal de las fibras elásticas que constituyen una parte principal de la matriz extracelular del pulmón. Los estudios muestran que los individuos que son homocigotos para la deficiencia de α_1 -AT tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar enfisema pulmonar, especialmente si también fuman.

Un ejemplo de una enzima asociada con una enfermedad relacionada con COPD es la metaloproteinasa de la matriz MMP12, también conocida como elastasa de macrófagos o metaloelastasa. Uno de los sustratos naturales de la MMP12 es la elastina, la proteína elástica, insoluble, de elevada resistencia a la tracción, encontrada en los espacios intercelulares de los tejidos conjuntivos de grandes arterias, de la tráquea, de los bronquios y de los ligamentos. La MMP12 se clonó inicialmente en el ratón por Shapiro *et al* [1992, Journal of Biological Chemistry 267:4664], y después en el hombre por el mismo grupo (Shapiro *et al*, "Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages", 1993, Journal of Biological Chemistry 268(32): 23824-23829). La secuencia proteínica de una MMP12 humana está almacenada en la base de datos SwissProt disponible en <http://us.expasy.org/spot/> (swissprot: locus MM12_HUMAN, acceso P39900). La MMP-12 se expresa preferentemente en macrófagos activados, y se ha demostrado que es segregada a partir de macrófagos alveolares de fumadores [Shapiro *et al*, 1993, Journal of Biological Chemistry, 268: 23824-23829] así como en las células espumosas en lesiones ateroscleróticas [Matsumoto *et al.*, 1998, Am J Pathol 153: 109]. Un modelo de ratón de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) se basa en la exposición de los ratones al humo de cigarrillos durante seis meses, dos cigarrillos al día durante seis días de una semana. Los ratones de tipo natural desarrollaron enfisema pulmonar después de este tratamiento. Cuando se ensayaron ratones a los que se les suprimió o inactivó MMP12 en este modelo, no desarrollaron enfisema significativo, indicando fuertemente que MMP-12 es la enzima clave en la patogénesis de COPD. Se cree que MMP12 degrada el tejido pulmonar, degradando la elastina dentro del tejido. El papel de las MMP,

tales como MMP12, en COPD (enfisema y bronquitis) se discute en Anderson y Shinagawa, 1999, Current opinión in Anti-inflammatory and Immunomodulatory Investigational Drugs 1(1): 29-38. Se descubrió recientemente que fumar aumenta la infiltración de macrófagos y la expresión de MMP-12 derivada de macrófagos en placas de la arteria carótida humana Kangavari [Matetzky S, Fishbein MC *et al.*, Circulation 102: (18), 36-39 Supl. S, 31 de octubre de 2000].

El uso actual de la proteómica o peptidómica en el descubrimiento y desarrollo de fármacos (particularmente para la enfermedad COPD) está limitado por diversos factores, que incluyen, por ejemplo:

- a) la falta de perfiles de péptidos asociados a la enfermedad que se puedan ligar a dianas farmacéuticas *específicas* (debido a que los métodos actuales de huellas analizan diferencias proteínicas totales, y no se centran en una proteína/diana farmacéutica particular;
- b) la falta de biomarcadores para identificar personas que sufran COPD en una etapa temprana de la enfermedad;
- c) la falta de biomarcadores para evaluar fármacos potenciales que sean compuestos inhibidores de MMP12, particularmente en estudios clínicos (es decir, para la validación de que la diana de MMP12 se ve afectada por el inhibidor).

El documento WO 91/18290 describe el uso de anticuerpos frente a marcadores peptídicos, para identificar la presencia de daño pulmonar en pacientes asintomáticos.

El documento WO 89/01625 se refiere a la identificación inmunológica de secuencias carboxi terminales de elastina en plasma humano, usando anticuerpos monoespecíficos.

Joos *et al.* (Human Molecular Genetics, 2002, Vol. 11, nº 5) y Wallace *et al.* (Am. J. Pharmacogenetics 2002:2 (3):167-175) investigan el papel de polimorfismos habituales dentro de varios promotores génicos de MMP en la lesión pulmonar inducida por tabaquismo.

Ahora se ha desarrollado una nueva metodología para producir y usar huellas proteínicas/peptídicas, permitiendo identificar e investigar proteínas/péptidos asociados a una enfermedad, los cuales se pueden ligar a dianas farmacéuticas específicas (tales como MMP12), o a combinaciones de dianas farmacéuticas específicas.

Breve descripción de las tablas y figuras

La Tabla 1 muestra las identidades, en unidades de masa atómica según MS, de 97 péptidos que resultan de la digestión de elastina por MMP12 y de la separación mediante cromatografía en columna.

La Tabla 2 muestra las identidades, en unidades de masa atómica según MS, de 185 péptidos que resultan de la digestión de elastina por MMP12 y de la separación mediante cromatografía en columna.

La Figura 1 muestra el espectro de masas generado a partir de una fracción de separación en fase líquida dada, en la que: la Figura 1A muestra la huella peptídica en una fracción de orina humana procedente de una persona que sufre COPD; la Figura 1B muestra la huella peptídica en un sujeto sano; la Figura 1C muestra la huella peptídica en una mezcla de MMP-12 + elastina, 2,5 h de incubación.

La Figura 2 es otro ejemplo que muestra el espectro de masas generado a partir de una fracción de separación en fase líquida dada, en la que: la Figura 2A muestra la huella peptídica en una fracción de orina humana procedente de una persona que padece COPD; la Figura 2B muestra la huella peptídica en un sujeto sano; la Figura 2C muestra la huella peptídica en una mezcla de MMP-12 + elastina, 2,5 h de incubación.

Descripción de la invención

Se proporciona aquí una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2. Se proporciona además una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende al menos noventa de los péptidos identificados en la Tabla 2. También se proporciona una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende al menos ciento cincuenta de los péptidos identificados en la Tabla 2. Una huella peptídica preferida comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 1. Otra huella peptídica preferida comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 2.

Cualquiera y todas las combinaciones de los péptidos identificados mediante masa en la Tabla 2 o la Tabla 1 se pueden usar en aplicaciones que miden o monitorizan la presencia y/o ausencia de la proteína elastina en cualquier marco de diagnóstico de un estado clínico. Tales estados clínicos incluyen inflamación sistémica, inflamación vascular, inflamación pulmonar, inflamación hepática, inflamación cardíaca, u otras enfermedades que se pueden relacionar con el uso a largo plazo de cigarrillos o con la exposición al humo del cigarrillo. En particular, tales estados clínicos incluyen COPD. Cualquiera y todas las combinaciones de los péptidos identificados mediante masa en la Tabla 2 o la Tabla 1 se pueden usar en cualquier forma modificada, incluyendo modificaciones químicas de restos constituyentes, reticulación a restos, marcaje con restos, incluyendo radionúclidos, fluorocromos, o reactivos similares. Cualquiera y todas las combinaciones de los péptidos identificados por masa en la Tabla 2 o en la Tabla 1 se pueden usar en kits de ensayos de diagnóstico que miden o monitorizan la presencia o ausencia de la proteína elastina.

Un segundo aspecto de la invención es un método para determinar si, o confirmar que, la enzima MMP12 está asociada con la enfermedad Y, el cual comprende:

- (a) analizar una muestra sana obtenida, para producir una huella peptídica sana;
- (b) analizar una muestra de biofluido enferma obtenida o una muestra de tejido enfermo, en la que la muestra enferma muestra signos del comienzo o progresión de la enfermedad Y, para producir una huella peptídica enferma;
- (c) comparar la huella peptídica sana con la huella peptídica enferma, e identificar el conjunto de péptidos encontrados en la huella peptídica enferma;
- (d) comparar el conjunto enfermo de péptidos identificado en la etapa (c) con una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2, y determinar si hay entre ellas similitudes o diferencias estadísticamente significativas, basándose en la comparación cualitativa y cuantitativa usando fórmulas estadísticas que ensayan los casos probables;
- (e) si se determinan en la etapa (d) asociaciones significativas entre los parámetros cuantitativo y cualitativo de la medida, concluir que la enzima MMP12 está asociada con la enfermedad Y en la muestra analizada;
- (f) si no se determinan en la etapa (d) asociaciones significativas entre los parámetros cuantitativo y cualitativo de la medida, concluir que la enzima MMP12 no está asociada con la enfermedad Y en la muestra analizada.

Preferiblemente, la enfermedad Y es COPD. La huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12 comprende preferiblemente al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2, o al menos noventa de los péptidos identificados en la Tabla 2, o al menos ciento cincuenta de los péptidos identificados en la Tabla 2. Lo más preferible, la huella peptídica comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 1, o todos los péptidos identificados en la Tabla 2.

Se puede usar un método según el tercer aspecto de la invención para determinar la presencia de COPD, que comprende:

- (a) analizar una muestra de biofluido obtenida o una muestra de tejido, para obtener su huella peptídica;
- (b) comparar la huella peptídica de la muestra identificada en la etapa (a) con una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2, y determinar si hay entre ellas similitudes estadísticamente significativas;
- (c) si se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que existe COPD;
- (d) si no se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que no hay COPD, o que se está tratando con éxito.

La huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12 comprende preferiblemente al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2, o al menos noventa de los péptidos identificados en la Tabla 2, o al menos ciento cincuenta de los péptidos identificados en la Tabla 2. Lo más preferible, la huella peptídica comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 1, o todos los péptidos identificados en la Tabla 2.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un kit de ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de COPD, que comprende medios para comparar la huella peptídica de una muestra de biofluido, o la huella peptídica de una muestra de tejido, con una huella de un sustrato que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella del sustrato comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la tabla 2.

Otro método es un método para analizar el efecto de un fármaco Z sobre la enzima MMP12, que comprende:

- (a) analizar una muestra de biofluido obtenida, o una muestra de tejido, procedente de un ser humano o de un animal no humano que padece COPD, habiendo sido cada ser humano o animal no humano pretratados ya con el fármaco Z, para obtener su huella peptídica;
- (b) comparar la huella peptídica de la muestra identificada en la etapa (a) con una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2, y determinar si hay entre ellas similitudes estadísticamente significativas;
- (c) si se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que el fármaco Z no está inhibiendo la enzima MMP12;
- (d) si no se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que el fármaco Z está inhibiendo la enzima MMP12.

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un kit de ensayo de diagnóstico para analizar el efecto de un fármaco Z sobre la enzima X, que comprende medios para comparar la huella peptídica de una muestra de biofluido, o la huella peptídica de una muestra de tejido, con la huella peptídica de los productos de degradación en una mezcla de enzima X con su sustrato natural, en el que la muestra se ha obtenido a partir de un ser humano o de un animal no humano que se ha tratado o que está siendo tratado con el fármaco Z.

En los kits de ensayo de diagnóstico preferidos, según el sexto aspecto de la invención: la enzima X es una cualquiera de MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP12 y MMP14; el sustrato natural es elastina; la enfermedad Y es COPD. En un ensayo de diagnóstico particularmente preferido, según el sexto aspecto de la invención, la enzima X es MMP12 (lo más preferible, MMP12 humana), el sustrato natural es elastina (lo más preferible, elastina humana), la enfermedad Y es COPD, y la huella peptídica de los productos de degradación comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2. En particular, la huella peptídica de los productos de degradación comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2. Más particularmente, la huella peptídica de los productos de degradación comprende al menos noventa de los péptidos identificados en la Tabla 2. Lo más particular, la huella peptídica de los productos de degradación comprende al menos ciento cincuenta de los péptidos identificados en la Tabla 2. Una huella peptídica preferida de los productos de degradación comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 1. Otra huella peptídica preferida de los productos de degradación comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 2.

Un kit de ensayo de diagnóstico preferido, para analizar el efecto de un fármaco Z sobre la enzima MMP12, comprende medios para comparar la huella peptídica de una muestra de biofluido, o la huella peptídica de una muestra de tejido con una huella de un sustrato que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella del sustrato comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2, y en el que la muestra se ha obtenido a partir de un ser humano o de un animal no humano que se ha tratado o que está siendo tratado con el fármaco Z. En particular, la huella del sustrato comprende al menos noventa de los péptidos identificados en la Tabla 2. Lo más particular, la huella del sustrato comprende al menos ciento cincuenta de los péptidos identificados en la Tabla 2. Una huella del sustrato preferida comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 1. Otra huella del sustrato preferida comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 2.

A partir de los métodos según la invención, es posible generar un modelo de enfermedad (un indicador pronóstico del desarrollo de la enfermedad) que engloba la presencia/ausencia, la abundancia relativa, y las características cualitativas/cuantitativas de péptidos/proteínas singletones o de agrupamientos de péptidos/proteínas dentro de cada huella. Analizando las muestras de biofluidos o de tejidos durante un período de tiempo dinámico en relación con huellas proteínicas/peptídicas específicas, se puede establecer una correlación de asociación entre marcos específicos de enfermedad clínica y ciertas huellas peptídicas específicas.

En los métodos según la invención, es preferible usar la siguiente metodología para generar las huellas proteínicas/peptídicas. Esta metodología proporciona y da como resultado medidas con una resolución y sensibilidad óptimas.

La metodología preferida es una tecnología de plataforma de separación en fase líquida multidimensional automatizada. Toda la plataforma funciona automáticamente en un sistema de funcionamiento cerrado, en el que los mecanismos de separación multidimensionales se realizan en fases de separación líquidas en columnas cromatográficas. Las interconexiones de estas etapas de separación se realizan en línea con etapas de transferencia entre las columnas dentro de la estación de trabajo. La interfaz entre los mecanismos de separación se proporciona mediante condiciones cromatográficas que permiten que los analitos sean transferidos desde una dimensión a la siguiente sin pérdidas. Esto se logra mediante la transferencia líquido-líquido entre las dimensiones. Más abajo se da una descripción operacional de la metodología.

Las muestras de biofluidos se introducen en la plataforma que produce el perfil de péptidos en fase líquida, y se mantienen a 4°C de forma termoestacionaria, para asegurar la estabilidad de las muestras a lo largo del tiempo. La muestra se inyecta entonces en la primera separación dimensional desde el autoinyector (columna 1). El mecanismo en

ES 2 303 954 T3

esta etapa se basa en la separación por tamaños (el material de empaquetamiento de separación, de origen polimérico o de sílice, tiene poros muy definidos). En la primera dimensión, se impedirá que las proteínas y biopolímeros de mayor tamaño entren en los poros de las perlas del material de separación. Los analitos de interés, tales como los analitos peptídicos, se difunden en los poros y se unen a la funcionalidad dentro de los poros. Esta funcionalidad puede ser superficies electrostáticamente cargadas o superficies hidrófobas sobre las que se unen los péptidos. De este modo, se produce el enriquecimiento selectivo de los péptidos, a medida que simultáneamente las proteínas y biopolímeros de mayor tamaño son excluidos y eluidos para su desecho. El material de la columna se lava entonces unas pocas veces con eluyentes variables, a fin de excluir componentes que interfieran procedentes de la muestra que se ha unido a la superficie externa así como a filtros y a superficies expuestas del sistema cromatográfico. De este modo, la fracción peptídica enriquecida, que se encuentra en los poros del material de la columna, se aísla con una pureza elevada.

Después de las etapas de lavado, se introduce en la siguiente dimensión un eluyente fuerte, columna 2. En la segunda dimensión, la elución procedente de la columna 1 se transfiere a la columna 2 en línea, y se adsorbe sobre la parte superior del soporte de la columna 2. La columna 2 es un lecho con funcionalidad cargada, en el que la separación se realiza mediante mecanismos electrostáticos. Se usa una elución en gradiente, y los péptidos correspondientes se separan en fracciones eluidas. Estas fracciones se separan a continuación en la tercera dimensión mediante hidrofobia, con lo que se elimina la sal procedente de las fracciones peptídicas, y se concentra usando una etapa de lavado de medio acuoso, seguido de la elución sobre una superficie de placa diana, a partir de la cual se determinan las secuencias de la masa del péptido.

La cuarta dimensión del sistema utiliza espectrometría de masas, en la que se analiza la masa, intensidad (cantidad) de todos y cada uno de los componentes peptídicos de todas las fracciones de la muestra.

Los datos generados a partir del espectrómetro de masas es multifactorial y representativo de los muestreos individuales exactos en marcos de tiempo específicos de las etapas del procedimiento. Las propiedades físicas características de los péptidos y proteínas, que incluyen el tamaño, masa, carga, y constante de hidrofobia, dan como resultado perfiles de firma individual para cada péptido o proteína. El instrumento del espectrofotómetro de masas detecta y registra estas características como archivos con tres encabezamiento: Fracción, Masa/Z e Intensidad.

Los valores másicos se registran típicamente hasta la 4ª cifra decimal; sin embargo, en la práctica, para la presentación, estos se redondean hasta el valor digital más próximo. El proceso para establecer una significancia estadística a las asociaciones de péptidos con huellas dadas, o entre huellas individuales o grupos de huellas, se basa en constantes de una matriz de datos que se construye a partir de los valores de fracción, masa/z e intensidad de cada péptido. La matriz de datos se obtiene mediante las combinaciones de fracciones y masas presentes en cada muestra de sujeto, y en la que las intensidades se resumen para cada una de tales combinaciones de masa y fracción. La matriz de datos se convierte entonces en:

	Sujeto 1	Sujeto 2	
Fracción 1 x masa 1	$I_{1,1}$	$I_{1,2}$	
Fracción 2 x masa 2			

en la que $I_{1,1}$, etc., son las intensidades resumidas. Los sujetos se normalizan igualando la suma total de intensidades por sujeto.

Un código Java calcula una estadística de t regularizada, que minimiza las cantidades de falsos positivos y falsos negativos, siguiendo la teoría en Broberg (2003, *Genome Biology*, 4(6):R41). En la práctica, se empieza con un tamaño de la lista de máximos, o un número de tamaños prácticos de la lista de máximos, y la tarea es encontrar un tamaño óptimo en el intervalo dado y poblar esa lista con tantos positivos verdaderos como sea posible. La estadística del ensayo usada tiene la forma iniciada por Tusher *et al* (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 5116-5121).

$$d = \frac{\text{diff}}{S_0 + S}$$

en la que diff es un estimado del efecto, por ejemplo una diferencia media de grupo, S es un error estándar, y S_0 es una constante regularizante. En el caso de dos muestras, al poner $S_0=0$ producirá el ensayo de la t de varianza igual. Usando estimaciones de las cantidades de falsos positivos y falsos negativos, un procedimiento de optimización minimiza el criterio $C = \sqrt{(\text{FP}^2 + \text{FN}^2)}$ a lo largo de una red de posibles valores para S_0 (dado por percentiles en la distribución de S) y la longitud de la lista de máximos.

El resultado incluye medias de grupo, valores de p para la comparación, la tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos que surgiría de incluir la actual Fracción x Masa, y todos con valores p más pequeños. El corte se escoge para minimizar las tasas de falsos positivos y falsos negativos.

Los datos de espectros de masa resultantes, masa de péptidos, fracción peptídica e identidad de péptidos se generan mediante comparaciones estadísticas entre, por ejemplo, sujetos que padecen COPD y sujetos sanos. La unidad de masa digital se agrupa en cajones con $\pm 0,5$ unidades másicas a cada lado de la masa detectada, y se combina con una fracción peptídica dada. Después, las intensidades de los cajones se resumen para producir una identidad extrapolada para todos y cada uno de los fragmentos. Los números de cajones totales usados en el análisis estadístico estuvieron típicamente entre 10.000-20.000. Los fragmentos másicos se comparan entonces mediante agrupamientos en sujetos, tales como por ejemplo sujetos que padecen COPD o sujetos sanos. El análisis estadístico se basa en 40-50 fracciones recogidas de cada sujeto. El ciclo de tiempo que generan las 40-50 fracciones peptídicas es menor que 5 horas.

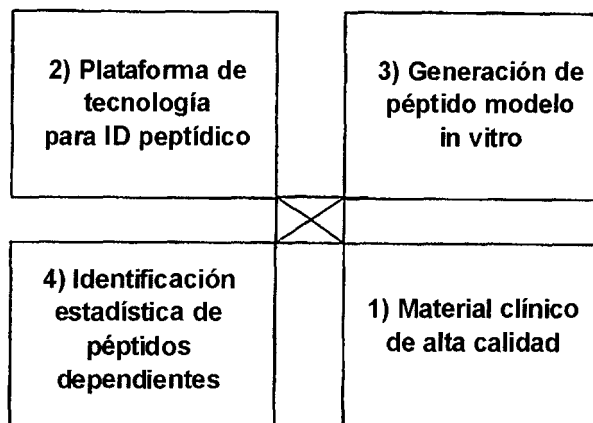
Los fragmentos másicos de los péptidos descritos en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 2, más abajo, no se pudieron identificar en ninguno de los 20 sujetos sanos prototípicos ensayados usando esta metodología.

Las etapas integradas del proceso para la identificación de biomarcadores es esencial, conteniendo las siguientes cuatro piedras angulares que definen el proceso: 1/ material clínico biomédico de alta calidad, 2/ plataforma de tecnología para la determinación cualitativa y cuantitativa de péptidos, 3/ ensayo *in vitro*, en el que se realiza el análisis cualitativo y cuantitativo de, por ejemplo, péptido/productos peptídicos que resultan de la reacción con la enzima MMP-12, con la elastina humana como sustrato, 4/ un método estadístico para relacionar múltiples conjuntos de identidades de pico con huellas prototípicas y con la expresión diferencial de estos péptidos y huellas peptídicas dentro y entre grupos de sujetos designados. Esta es la forma preferida de analizar los datos que permite analizar los péptidos biomarcadores que probablemente están asociados con la orina del paciente que sufre COPD (Esquema D).

Cada una de las cuatro piedras angulares del proceso son interdependientes y son necesarias a fin de determinar los péptidos biomarcadores mediante cuantificación diferencial entre sujetos sanos y sujetos con COPD, relacionándolos, por ejemplo, con péptidos procedentes de elastina derivados de la función/actividad de la enzima MMP-12. El método preferido también se puede usar para determinar y detectar los productos de ruptura de la elastina natural que resultan de la escisión de la elastina con enzimas específicas elastolíticas naturales o diseñadas, incluyendo MMP2, MMP 3, MMP7, MMP9, y MMP14.

Esquema D

Interdependencia de las piedras angulares del proceso



La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo

Los fragmentos peptídicos de elastina, que son el resultado de la digestión enzimática de la elastina humana mediante MMP 12 humana, se identificaron en primer lugar en condiciones de laboratorio usando un sistema *in vitro* modélico para generar péptidos y huellas peptídicas de longitud unidad de la proteólisis de elastina mediante esta enzima MMP 12. Estos péptidos se recogieron entonces y se fraccionaron en una serie de columnas cromatográficas a fin de aislar los péptidos para la identificación. Los péptidos se identificaron entonces como entidades de unidades de masa atómica usando espectros de espectrometría de masas MALDI-TOF. Para cada fracción de péptidos separados mediante columna, se registraron la masa de cada entidad y la intensidad másica de cada entidad, y se almacenaron en bases de datos. Se usó un programa estadístico mediante ordenador para canalizar el perfil de las identidades de unidades de masa atómica procedentes de todas las fracciones analizadas mediante MS. Se asignó una identidad de masa atómica de consenso para un conjunto de péptidos de elastina prominentes asociados con la degradación enzimática mediante MMP12. En la Tabla 1 se proporciona un primer conjunto no inclusivo de 97 péptidos derivados

de elastina, también conocido como una huella peptídica. En la Tabla 2 se proporciona un segundo conjunto no inclusivo de 185 péptidos derivados de elastina, también conocido como una huella peptídica. El conjunto de 185 péptidos mostrado en la Tabla 2 incluye el conjunto de 97 péptidos mostrado en la Tabla 1.

- 5 Las Tablas 1 y 2 proporcionan las identidades de péptidos prominentes que se pueden usar como puntos de referencia para descubrir y/o identificar péptidos con propiedades físico-químicas similares o casi similares en otras mezclas complejas de proteínas. Las Tablas proporcionan las identidades de péptidos prominentes que se pueden usar como puntos de referencia para descubrir y/o identificar péptidos de característica similar que están presentes en muestras clínicas humanas. Esto proporciona además las identidades de péptidos prominentes que se pueden usar como puntos de referencia para descubrir y/o identificar la identidad de secuencia exacta de los aminoácidos de estas mismas entidades peptídicas. Esto proporciona las identidades de péptidos prominentes que se pueden usar como puntos de referencia para descubrir y/o identificar la presencia, ausencia y abundancia relativa de péptidos individuales o cualesquiera agrupamientos de estos péptidos en muestras clínicas procedentes de sujetos sanos o de sujetos con estados clínicos que están asociados con la ruptura de elastina humana, y los agrupamientos subsiguientes de sujetos basándose en estas huellas o cualquier combinación de los péptidos presentes en estas muestras.

Procedimiento experimental

- 20 Se usó el siguiente método. Se ha desarrollado un ensayo *in vitro* de MMP-12 a fin de obtener anotaciones peptídicas que se asignan directamente a la actividad de MMP-12. Estas anotaciones representan masas de péptidos que son específicos para degradar la elastina humana mediante una actividad proteolítica con MMP-12 humana, y se usan para establecer firmas de huellas peptídicas que se pueden medir y emparejar con perfiles peptídicos de firma presentes en muestras de biofluidos tomadas tanto de sujetos sanos como de sujetos con estados clínicos tales como COPD. Otras enzimas proteolíticas específicas de elastina, tales como MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, y MMP14, producirán productos peptídicos separados y distintos a partir del sustrato de elastina. El ensayo se realiza según lo siguiente; se usa elastina pulmonar humana como el sustrato en la reacción del ensayo *in vitro* con MMP-12 humana. La elastina humana insoluble se lava usando 100 mM de tampón TRIS-HCl pH 7,5 que contiene 0,1 M de NaCl y 10 mM de CaCl₂, y después se centrifuga entre etapas de lavado repetidas. Después, se resuspenden 1,2 mg de elastina en el tampón de ensayo de 100 mM de TRIS-HCl pH 7,5 que contiene 0,1 M de NaCl y 10 mM de CaCl₂ y 60 µg de MMP-12 humana. La incubación se realizó a 37°C durante 7 horas, tiempo en el cual la elastina se degradó por la enzima MMP12. El proceso de proteólisis se detuvo mediante adición de yodoacetamida.

- Tras la digestión, las muestras se analizaron directamente o se mantuvieron a -80°C en el congelador. Las muestras se analizaron descongelando muestras a temperatura ambiente, y se realizó una etapa de preparación de las muestras usando una etapa de preparación de fase inversa. La muestra se eluyó entonces de la preparación mediante una etapa de elución con acetonitrilo, sobre la placa diana de MALDI-TOF. Se añadió ácido ciano-4-hidroxycinámico (ACHA) como la matriz para la formación de cristales, y se colocó en el espectrómetro de masas de MALDI-TOF en el que se identificó y anotó una huella peptídica de los productos de la degradación de MMP12/elastina.

- Las condiciones experimentales específicas usadas para generar péptidos presentados diferencialmente en muestras de orina humana procedentes de sujetos sanos y de pacientes que sufren COPD se obtuvieron según lo siguiente.

- El biofluido de orina se obtuvo y se recogió de sujetos mediante micción, y después se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C. La orina congelada se descongeló a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 2,5 con ácido ortofosfórico, y se procesó para las separaciones mediante HPLC. Las muestras de orina se introdujeron en un sistema cromatográfico bidimensional en el que el primer mecanismo de separación utilizado fue la cromatografía de exclusión molecular. El corte del material de columna se designó como 15 kDa. Los fraccionamientos que resultan de 1) la etapa de separación mediante columna de exclusión molecular se transfirieron en línea a una 2) etapa de columna de intercambio catiónico, en la que los péptidos/proteínas se separaron basándose en la carga. Estas fracciones se transfirieron entonces a una 3) etapa de columna de separación de fase inversa, en la que se eliminaron todos los componentes de la matriz que interfieren y que estaban presentes en la muestra. Las fracciones tridimensionales se colocaron en forma de manchas sobre una placa de diana de MALDI mediante un alimentador robótico que añadió la matriz de MALDI a las manchas de las muestras peptídicas/proteínicas. Después, la placa de muestra de MALDI se insertó en el instrumento del espectrómetro de masas MALDI-TOF, y se irradió hasta fragmentos que producen péptidos que después se analizaron según la masa exacta, cantidad y resolución isotópica de cada espectro peptídico de MALDI-TOF individual.

- La huella peptídica de elastina generada por la digestión mediante MMP12 en condiciones de laboratorio, y descrita anteriormente, se usó como un hito de referencia par encontrar péptidos homólogos idénticos o casi idénticos dentro de los biofluidos clínicos.

- Los fragmentos peptídicos de elastina o la huella peptídica de elastina se identifica en la orina de un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Dentro de un cuadro clínico, previamente se identificó que el paciente sufría COPD. En este ejemplo, el paciente mostró ensayos anormales de la función respiratoria, como se reveló por una baja puntuación de FEV1. Este paciente mostró además signos de hiperdistensión alveolar pulmonar y enfisema, usando formación de imágenes mediante CT. Este paciente mostró además signos de destrucción proteínica de elastina dentro del parénquima del pulmón mediante examen histológico del pulmón, y usando un método para identificar la proteína de elastina dentro del tejido pulmonar mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo

específico para la elastina humana, y específico para un epítipo hexamérico de la elastina y tropoelastina humanas. Este paciente mostró además signos histológicos de alveolitis y acumulación de macrófagos alveolares en áreas del pulmón, localizada adyacente a la expresión de elastina y a la degradación de elastina. Este paciente mostró además signos histológicos de que los mismos macrófagos localizados en los alvéolos estaban activados para expresar un marcador de activación, CD-68, dentro del tejido mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido pulmonar con un anticuerpo específico para CD-68. Este paciente mostró además signos histológicos de que los mismos macrófagos localizados en los alvéolos estaban activados para expresar MMP-12 humana dentro del tejido mediante inmunohistoquímica de secciones de tejido pulmonar con un anticuerpo específico para MMP-12 humana. Este paciente fue un miembro de un grupo de 20 pacientes bajo estudio. Los hallazgos descritos anteriormente no fueron únicos para este paciente individual con COPD. Los hallazgos descritos anteriormente fueron un hallazgo común entre los 20 pacientes del estudio que sufren COPD.

Se usó el siguiente método:

- 1) se obtuvo una muestra de biofluido de un ser humano sano; en este ejemplo, sano se define como una persona viva adulta de 20-80 años de edad, sin síntomas de enfermedad, sin ningún estado clínico actual, que no está siendo tratada con medicación o fármacos prescritos para ningún estado clínico, que no tiene riesgo de desarrollar una enfermedad tal como tabaquismo, drogadicción, alcoholismo, sobrepeso, o que no tiene una disposición genética diagnosticada para padecer la enfermedad en un comienzo posterior de la vida, por ejemplo. Aquí, biofluido se define como cualquier muestra de material clínico humano en forma de disolución. Éste puede incluir sangre, suero, plasma, saliva, lavados, lágrimas, orina, fluido seminal, fluido de las articulaciones, humor acuoso, lavados de cavidades o senos, la forma soluble de preparaciones tisulares, la forma soluble de preparaciones de órganos, o sudor, por ejemplo. Las muestras pueden derivar de sujetos individuales o de conjuntos de muestras individuales procedentes de múltiples sujetos. En este ejemplo, el biofluido sano fue orina.
 - 2) La muestra de orina sana se realizó para producir una huella peptídica sana; se define analizó, por ejemplo, como cualquier combinación de las etapas de selección, preparación, separación, identificación, anotación, y recuperación de datos almacenados de la muestra, y las comparaciones de datos procedentes del cuerpo de esta Solicitud, los ejemplos proporcionados en esta Solicitud, las reivindicaciones de esta Solicitud. En este ejemplo, huella se define como un constituyente peptídico individual identificable de una proteína natural, y/o que puede estar combinado o no con otro constituyente peptídico individual identificable de una proteína natural, y o la suma total de todos los péptidos individuales identificables que se pueden agrupar juntos y que, como tal, ese agrupamiento se convierte en una entidad por sí misma. Se define identificable como la fracción, masa e intensidad de entidades peptídicas individuales. Adicionalmente, se define masa como la asignación única de masa del MS de un péptido individual identificable, la masa derivada de entidades peptídicas individuales identificables recogidas, y o la masa derivada de entidades peptídicas individuales identificables recogidas, en combinación.
 - 3) Se obtuvo una muestra de biofluido humano enferma a partir de un individuo enfermo. En este ejemplo, enfermo se define como una persona adulta de 20-80 años de edad, con o sin síntomas clínicos o presentación de la enfermedad, y/o con un riesgo clínico de desarrollar una enfermedad tal como tabaquismo, drogadicción, alcoholismo, sobrepeso, con o sin una disposición genética diagnosticada para la enfermedad en un comienzo posterior de la vida. Por ejemplo, pacientes con un diagnóstico clínico de COPD, o pacientes que tienen riesgo de desarrollar (COPD). Por ejemplo, se define riesgo de la enfermedad como un fumador actual de tabaco u otra hierba medicinal, o una persona que siempre ha fumado, o como una persona que ha fumado y dejó de fumar, independientemente del marco de tiempo en relación con la toma de muestras de estos mismos pacientes para el estudio. Además, se define riesgo de la enfermedad como cualquier persona con deficiencias en la expresión o la regulación de expresión de alfa-1-antitripsina o moléculas bioquímicas relacionadas de origen natural, o cualquier entidad biológica relacionada con la expresión o función de alfa-1-antitripsina o moléculas bioquímicas relacionadas de origen natural. En este ejemplo, el individuo enfermo fue un sujeto que mostró signos del comienzo o progresión de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Además, los pacientes que sufren COPD se pueden caracterizar como sujetos que muestran ruptura de elastina usando análisis histológico, o análisis inmunohistoquímico de muestras de tejido pulmonar. Además, los pacientes que sufren COPD se pueden caracterizar como sujetos que muestran alveolitis, hiperdistensión de las vías respiratorias, o enfisema, usando formación de imágenes mediante rayos X (HRCT, CT), análisis histológico, o análisis inmunohistoquímico de muestras de tejido pulmonar. Además, los pacientes que sufren COPD se pueden caracterizar como sujetos que muestran signos de macrófagos activados dentro de muestras de tejido pulmonar usando histología e inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para la detección de productos de genes expresados por macrófagos activados. En este ejemplo, el paciente mostró signos histológicos de agrandamiento del espacio de las vías respiratorias pulmonares, enfisema, y destrucción de la integridad de la elastina pulmonar. El ejemplo mostró además signos de macrófagos alveolares activados cerca de los sitios de la destrucción de la elastina pulmonar.
- Se define aquí biofluido enfermo como cualquier muestra de material clínico humano en forma de disolución tomada de pacientes que cumplen en todo o en parte los criterios de la definición de enfermedad anterior. Éste puede incluir sangre, suero, plasma, saliva, lavados, lágrimas, orina, fluido seminal, fluido de las articulaciones, humor acuoso, lavados de cavidades o senos, la forma soluble de preparaciones de

tejidos, la forma soluble de preparaciones de órganos, o sudor, por ejemplo. Las muestras pueden derivar de pacientes individuales o de conjuntos de muestras individuales procedentes de múltiples pacientes. En este ejemplo, el biofluido fue orina.

- 4) La muestra enferma se analizó para producir una huella peptídica enferma; en este ejemplo, huella se define como un constituyente peptídico individual identificable de una proteína natural, y/o que se puede combinar o no con otro constituyente peptídico individual identificable de una proteína natural, y o la suma total de todos los péptidos individuales identificables que se pueden agrupar juntos y que, como tal, ese agrupamiento se convierte en una entidad por sí misma. Se define identificable como la fracción, masa e intensidad de entidades peptídicas individuales. Además, masa se define como la asignación única de masa mediante MS de un péptido individual identificable, la masa derivada de entidades peptídicas individuales identificables recogidas, y o la masa derivada de entidades peptídicas individuales identificables recogidas, en combinación.

15 Sumario del procedimiento experimental

- 1) se obtuvo una muestra de biofluido humano sana;
- 2) la muestra de orina sana se analizó para producir una huella peptídica sana;
- 3) se obtuvo una muestra de biofluido humano enferma, a partir de un individuo enfermo;
- 4) la muestra enferma se analizó para producir una huella peptídica enferma;
- 5) la huella peptídica sana se comparó con la huella peptídica enferma para identificar el conjunto de péptidos encontrados sólo en la huella peptídica enferma;
- 6) el conjunto enfermo de péptidos identificado en la etapa (5) se comparó con la huella peptídica de los productos de degradación producidos en la etapa (8).

30 Descripción del procedimiento experimental

Las condiciones experimentales específicas usadas para generar péptidos presentados diferencialmente en muestras de orina humana procedentes de sujetos sanos y de pacientes que sufren COPD se obtuvieron según lo siguiente;

se tomaron muestras de biofluido a partir de pacientes, y después se repartieron en alícuotas y se congelaron a -80°C. La orina congelada se descongeló a temperatura ambiente, el pH se ajustó hasta 2,5 con ácido ortofosfórico, y se procesó para las separaciones mediante HPLC. Las muestras de orina se introdujeron en un sistema de cromatografía tridimensional en el que el primer mecanismo de separación utilizado fue cromatografía de exclusión molecular. El corte del material de la columna fue aproximadamente 15 kDa. Los fraccionamientos que resultan de la etapa de separación mediante exclusión molecular se transfirieron después en línea a una etapa de cromatografía en columna de intercambio catiónico, en la que los péptidos/proteínas se separaron basándose en la carga. Estas fracciones se transfirieron entonces a una etapa de separación de fase inversa en la que se eliminaron todos los componentes de la matriz que interfieren y que están presentes en la muestra, esta es la separación tridimensional. Las fracciones tridimensionales se colocaron en forma de manchas sobre una placa diana de MALDI mediante un alimentador robótico que añadió la matriz de MALDI a las manchas de las muestras peptídicas/proteínicas. Después, la placa de muestra de MALDI se insertó en el instrumento del espectrómetro de masas MALDI-TOF, y se irradió hasta fragmentos que producen péptidos que después se analizaron según la masa exacta, cantidad y resolución isotópica de cada espectro peptídico de MALDI-TOF individual.

50 Tablas

La Tabla 1 muestra las identidades de unidad de masa atómica de MS de 97 péptidos de elastina que resultan de la digestión con MMP12 y de la separación mediante cromatografía en columna. La Tabla 2 muestra las identidades de unidades de masa atómica de MS de 185 péptidos de elastina que resultan de la digestión mediante MMP12 y de la separación mediante cromatografía en columna. Para generar cada conjunto de péptidos, se aplicaron al aparato de MS fracciones de eluatos de columna que contienen péptidos separados, se identificaron, se anotaron y después se colocaron en una base de datos para el análisis estadístico.

60 Figuras

La Figura 1 y Figura 2 ilustran dos ejemplos en los que se han determinado las diferencias cualitativas y cuantitativas entre las huellas peptídicas de sujetos sanos y de pacientes que sufren COPD. Se muestran datos de péptidos de elastina putativos detectados en las muestras de orina, respectivamente. En las Figuras 1A y 2A se muestran ejemplos de los péptidos encontrados presentes en el biofluido de orina procedente de pacientes que sufren COPD, debidos a la degradación de MMP-12 activa, mientras que las Figuras 1B y 2B representan fracciones equivalentes procedentes de sujetos sanos que no contienen estos péptidos. La ausencia de valores de estos péptidos en los sujetos sanos se basó en el nivel más bajo de cuantificación que ofrece la instrumentación MALDI.

ES 2 303 954 T3

La Figura 1 muestra el espectro de masas generado a partir de una fracción de separación en fase líquida dada, en la que: la Figura 1A muestra la huella peptídica en una fracción de orina humana procedente de una persona que sufre COPD; la Figura 1B muestra la huella peptídica en un sujeto sano; la Figura 1C muestra la huella peptídica en una mezcla de MMP-12 + elastina, 2,5 h de incubación.

La Figura 2 es otro ejemplo que muestra el espectro de masas generado a partir de una fracción de separación en fase líquida dada, en la que: la Figura 2A muestra la huella peptídica en una fracción de orina humana procedente de una persona que sufre COPD; la Figura 2B muestra la huella peptídica en un sujeto sano; la Figura 2C muestra la huella peptídica en una mezcla de MMP-12 + elastina, 2,5 h de incubación.

Los resultados mostrados en la Figura 1 presentan el espectro de masas generado a partir de una fracción de separación en fase líquida dada con péptidos que tienen una propiedad químico-física dada específica del péptido. En la Figura 1A, el espectro de masas resultante muestra la presencia del pico de masa de 1094,60 en pacientes que sufren COPD, que corresponde a un producto enzimático de MMP-12 con elastina como sustrato. La Figura 1B ilustra el espectro de masas resultante de voluntarios sanos, en el que la masa de 1094,60 del pico del péptido no es distinguible cualitativamente de las señales del fondo. Estos datos son estadísticamente significativos cuando se comparan con los grupos de pacientes enfermos y sanos.

La Figura 2A muestra que el pico del péptido correspondiente a una masa de 1285,7 está presente en una fracción de orina humana de una persona que sufre COPD. La Figura 2B muestra que este pico del péptido está ausente del espectro de masa del individuo sano. Estos datos son estadísticamente significativos cuando se comparan con los grupos de pacientes enfermos y sanos.

TABLA 1

Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica
1	772,4	28	1185,7	55	1379,6	82	1758,9
2	798,4	29	1193,6	56	1402,8	83	1762,9
3	802,4	30	1199,6	57	1424,8	84	1763,9
4	817,5	31	1216,6	58	1440,7	85	1770,0
5	823,4	32	1232,6	59	1455,8	86	1832,9
6	824,4	33	1237,6	60	1469,8	87	1840,0
7	865,4	34	1242,7	61	1477,8	88	1851,0
8	874,5	35	1254,7	62	1484,8	89	1885,0
9	878,5	36	1255,9	63	1505,8	90	1920,0
10	904,4	37	1262,6	64	1508,9	91	1929,8
11	937,5	38	1265,7	65	1519,8	92	1942,0
12	944,5	39	1285,7	66	1520,8	93	1998,1
13	951,5	40	1287,7	67	1524,8	94	2168,1

ES 2 303 954 T3

14	977,5	41	1291,7	68	1536,8	95	2367,2
15	1027,5	42	1296,7	69	1542,8	96	2620,3
16	1072,6	43	1298,7	70	1570,7	97	2823,5
17	1073,6	44	1299,7	71	1596,8		
18	1089,5	45	1314,7	72	1599,8		
19	1094,6	46	1320,8	73	1613,9		
20	1107,6	47	1322,7	74	1644,8		
21	1114,6	48	1331,7	75	1666,9		
22	1137,6	49	1347,7	76	1670,9		
23	1141,6	50	1352,7	77	1687,9		
24	1142,6	51	1363,7	78	1696,9		
25	1145,6	52	1368,8	79	1702,2		
26	1155,6	53	1369,0	80	1706,8		
27	1171,6	54	1370,7	81	1718,9		

TABLA 2

Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica	Número de péptido	Masa peptídica
1	772,4	41	1169,6	81	1379,6	121	1671,9	161	1998,1
2	798,4	42	1171,6	82	1402,8	122	1676,9	162	2034,1
3	799,4	43	1177,6	83	1424,8	123	1677,9	163	2055,1
4	802,4	44	1185,7	84	1440,7	124	1687,9	164	2098,0
5	817,5	45	1188,6	85	1443,8	125	1688,8	165	2162,2
6	823,4	46	1193,6	86	1445,8	126	1696,9	166	2168,1
7	824,4	47	1196,6	87	1448,8	127	1698,9	167	2235,1
8	826,4	48	1199,6	88	1455,8	128	1702,2	168	2305,1
9	842,4	49	1212,6	89	1469,8	129	1704,9	169	2310,1
10	865,4	50	1216,6	90	1476,7	130	1705,9	170	2320,3
11	874,5	51	1232,6	91	1477,8	131	1706,8	171	2323,2
12	878,5	52	1237,6	92	1479,7	132	1712,9	172	2327,2
13	880,5	53	1242,7	93	1480,8	133	1718,9	173	2351,2
14	887,5	54	1254,7	94	1484,8	134	1724,9	174	2367,2
15	904,4	55	1255,9	95	1485,8	135	1727,9	175	2398,2
16	937,5	56	1262,6	96	1505,8	136	1758,9	176	2405,2
17	944,5	57	1265,7	97	1508,9	137	1759,9	177	2449,2
18	951,5	58	1282,7	98	1511,8	138	1762,9	178	2476,2
19	977,5	59	1285,7	99	1519,8	139	1763,9	179	2510,2

ES 2 303 954 T3

5	20	994,5	60	1287,7	100	1520,8	140	1770	180	2620,3
	21	1009,5	61	1291,7	101	1524,8	141	1773,9	181	2715,3
	22	1027,5	62	1292,6	102	1527,8	142	1778,9	182	2759,4
	23	1034,5	63	1296,7	103	1536,8	143	1832,9	183	2823,5
	24	1038,6	64	1298,7	104	1542,8	144	1833,9	184	3356,7
	25	1072,6	65	1299,7	105	1557,8	145	1840	185	3371,7
10	26	1073,6	66	1308,7	106	1558,8	146	1841,0		
	27	1085,5	67	1314,7	107	1570,7	147	1851		
	28	1089,5	68	1318,9	108	1583,8	148	1863,0		
15	29	1094,6	69	1320,8	109	1588,7	149	1879,0		
	30	1107,6	70	1321,7	110	1596,8	150	1885		
	31	1114,6	71	1322,7	111	1599,8	151	1904,1		
	32	1116,5	72	1325,7	112	1612,9	152	1907,0		
20	33	1132,5	73	1331,7	113	1613,9	153	1920		
	34	1137,6	74	1347,7	114	1628,8	154	1924,0		
	35	1138,6	75	1352,7	115	1631,8	155	1925,1		
	36	1141,6	76	1357,7	116	1644,8	156	1926,1		
25	37	1142,6	77	1363,7	117	1656,9	157	1929,8		
	38	1145,6	78	1368,8	118	1665,8	158	1936,0		
	39	1147,6	79	1369	119	1666,9	159	1942		
30	40	1155,6	80	1370,7	120	1670,9	160	1945,8		

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en la que la huella peptídica comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2.
2. Una huella peptídica según la reivindicación 1, que comprende al menos noventa de los péptidos identificados en la Tabla 2.
3. Una huella peptídica según la reivindicación 1, que comprende al menos ciento cincuenta de los péptidos identificados en la Tabla 2.
4. Una huella peptídica según la reivindicación 1, que comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 1.
5. Una huella peptídica según la reivindicación 1, que comprende todos los péptidos identificados en la Tabla 2.
6. Un método para determinar si la enzima MMP12 está asociada con la enfermedad Y, que comprende:
 - (a) analizar una muestra de biofluido o muestra de tejido sana obtenida, para producir una huella peptídica sana;
 - (b) analizar una muestra de biofluido enfermo obtenida o una muestra de tejido enferma, en el que la muestra enferma muestra signos del comienzo o progresión de la enfermedad Y, para producir una huella peptídica enferma;
 - (c) comparar la huella peptídica sana con la huella peptídica enferma e identificar el conjunto de péptidos encontrado en la huella peptídica enferma;
 - (d) comparar el conjunto enfermo de péptidos identificado en la etapa (c) con una huella peptídica que comprende productos peptídicos resultantes de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2, y determinar si hay similitudes o diferencias estadísticamente significativas entre ellas basándose en la comparación cualitativa y cuantitativa usando fórmulas estadísticas que ensayan los casos probables;
 - (e) si se determinan en la etapa (d) asociaciones significativas entre los parámetros cuantitativo y cualitativo de la medida, concluir que la enzima MMP12 está asociada con la enfermedad Y en la muestra analizada;
 - (f) si no se determinan en la etapa (d) asociaciones significativas entre los parámetros cuantitativo y cualitativo de la medida, concluir que la enzima MMP12 no está asociada con la enfermedad Y en la muestra analizada.
7. Un método según la reivindicación 6, en el que la enfermedad Y es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).
8. Un método para determinar la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), que comprende:
 - (a) analizar una muestra de biofluido obtenida o una muestra de tejido, para obtener su huella peptídica;
 - (b) comparar la huella peptídica de la muestra identificada en la etapa (a) con una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2, y determinar si hay entre ellas similitudes estadísticamente significativas;
 - (c) si se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que existe COPD;
 - (d) si no se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que no hay COPD, o que se está tratando con éxito.
9. Un kit de ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), que comprende medios para comparar la huella peptídica de una muestra de biofluido o la huella peptídica de una muestra de tejido con una huella de un sustrato que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que el kit comprende una huella de un sustrato que comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2.
10. Un método para analizar el efecto de un fármaco Z sobre la enzima MMP12, que comprende:
 - (a) analizar una muestra de biofluido obtenida, o una muestra de tejido, procedente de un ser humano o de un animal no humano que padece enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), habiendo sido cada ser humano o animal no humano pretratados ya con el fármaco Z, para obtener su huella peptídica;

ES 2 303 954 T3

(b) comparar la huella peptídica de la muestra identificada en la etapa (a) con una huella peptídica que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que la huella peptídica comprende uno o más de los péptidos identificados en la Tabla 2, y determinar si hay entre ellas similitudes estadísticamente significativas;

(c) si se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que el fármaco Z no está inhibiendo la enzima MMP12;

(d) si no se determinan en la etapa (b) similitudes estadísticamente significativas, concluir que el fármaco Z está inhibiendo la enzima MMP12.

11. Un kit de diagnóstico para analizar el efecto de un fármaco Z sobre la enzima MMP12, que comprende medios para comparar la huella peptídica de una muestra de biofluido o la huella peptídica de una muestra de tejido con una huella de un sustrato que comprende productos peptídicos que resultan de la degradación de elastina por la enzima MMP12, en el que el kit comprende una huella de un sustrato que comprende al menos veinte de los péptidos identificados en la Tabla 2, y en el que la muestra se ha obtenido de un ser humano o animal no humano que ha sido tratado o que se está tratando con el fármaco Z.

Fig 1A/

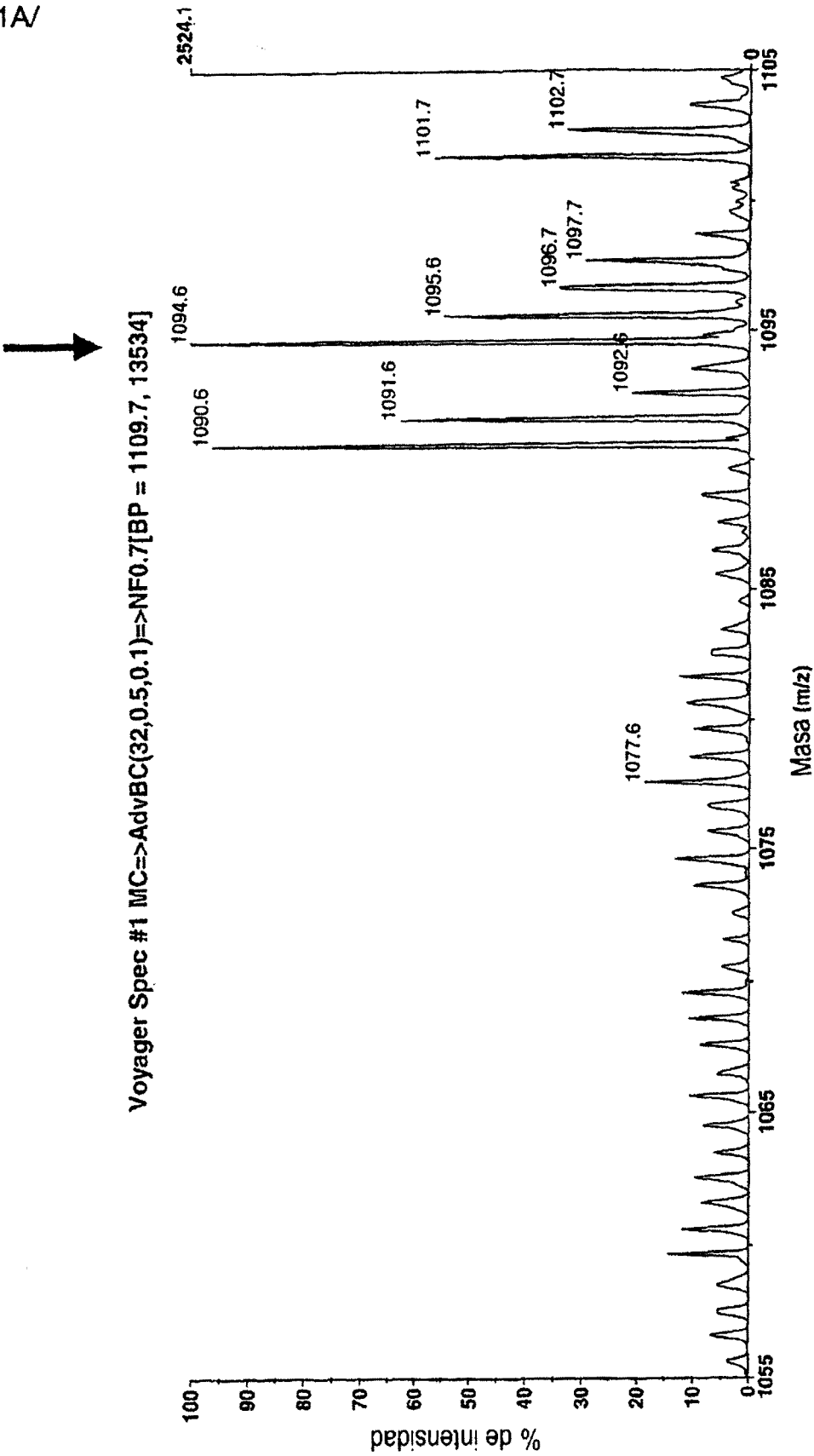


Fig 1B/

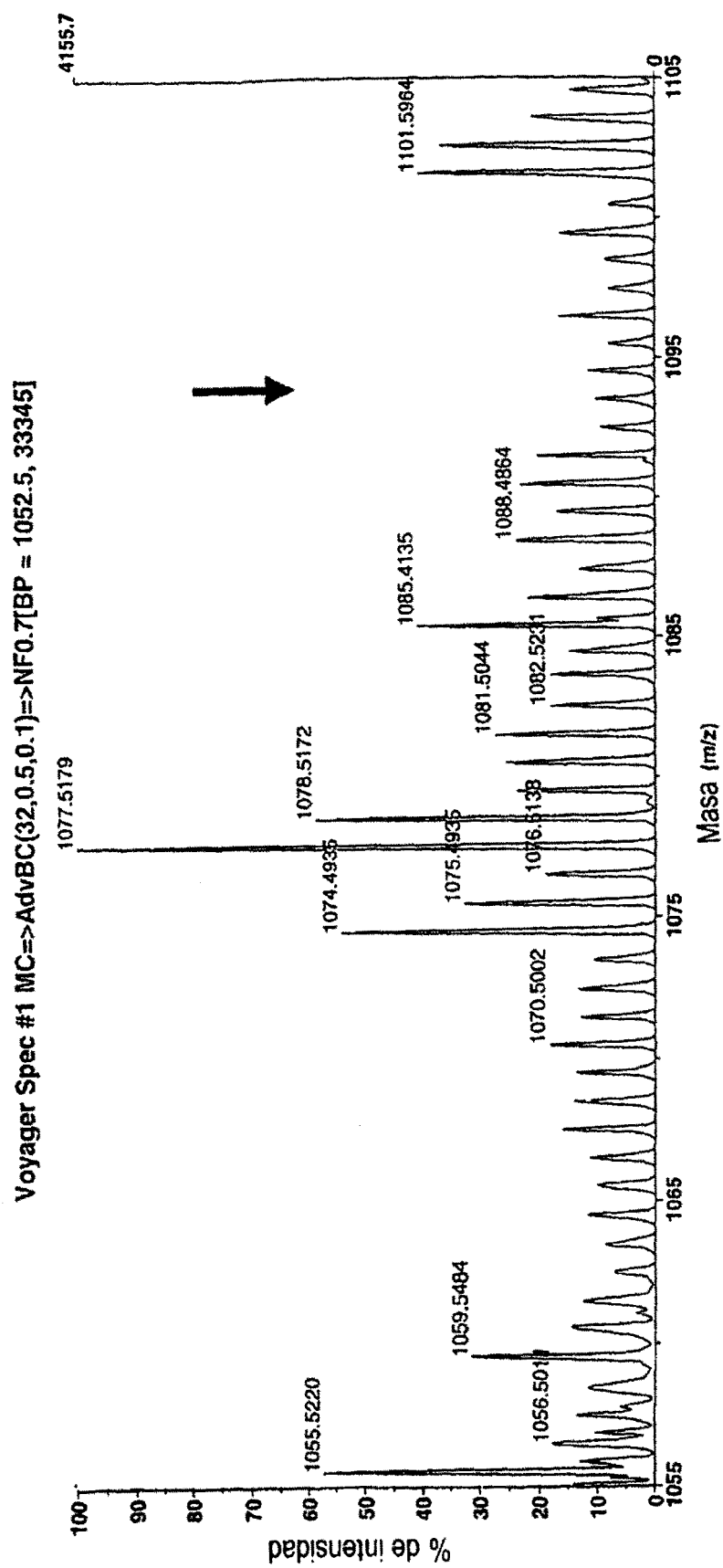


Fig 1C/

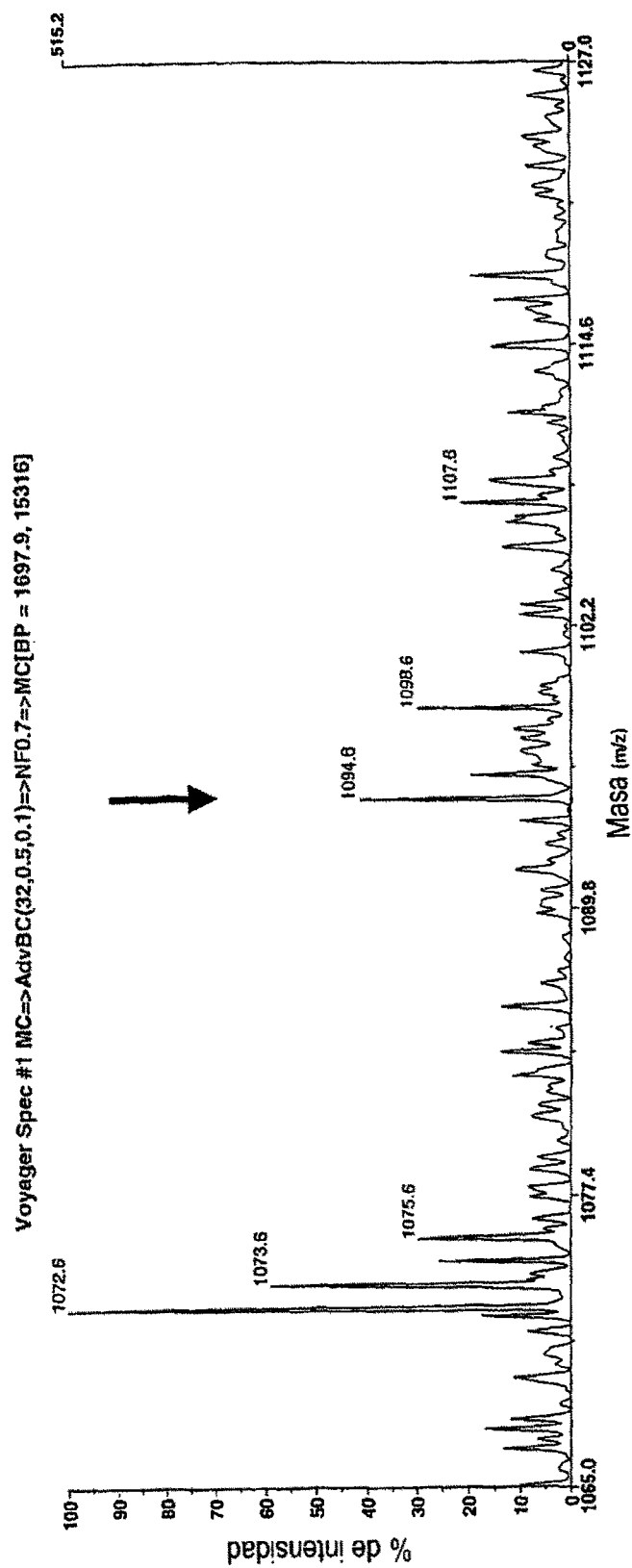


Fig 2A/

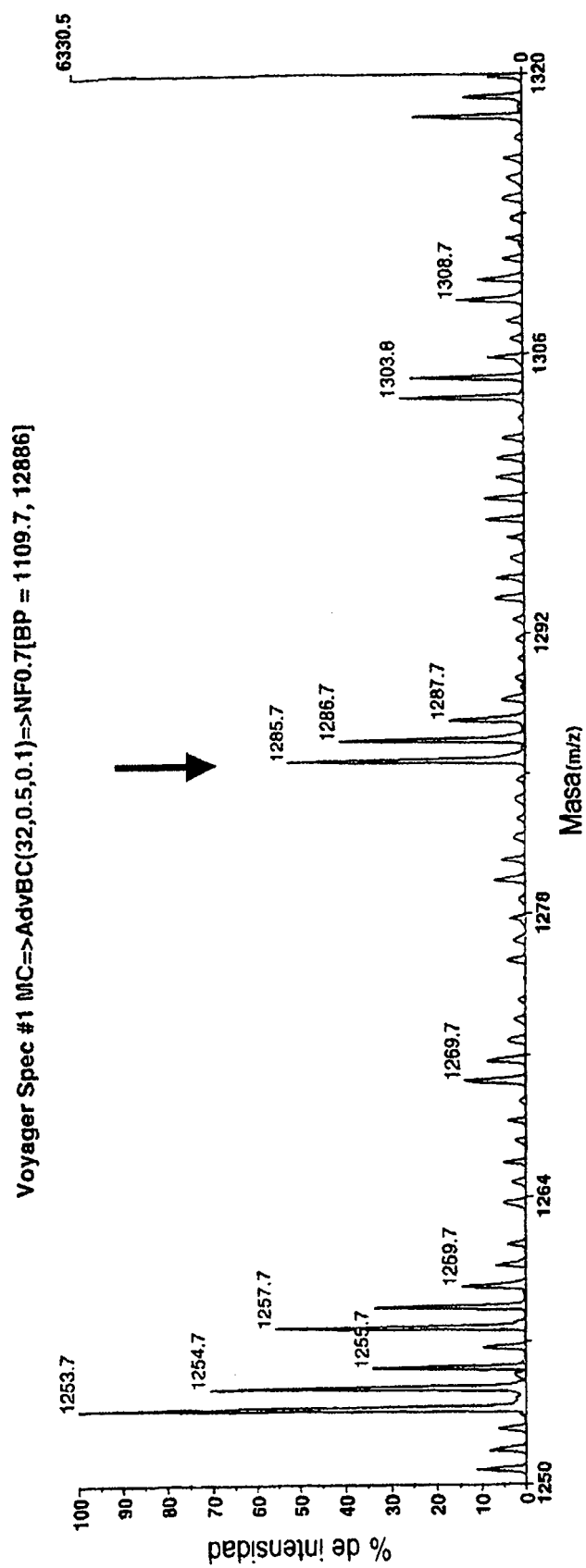


Fig 2B/

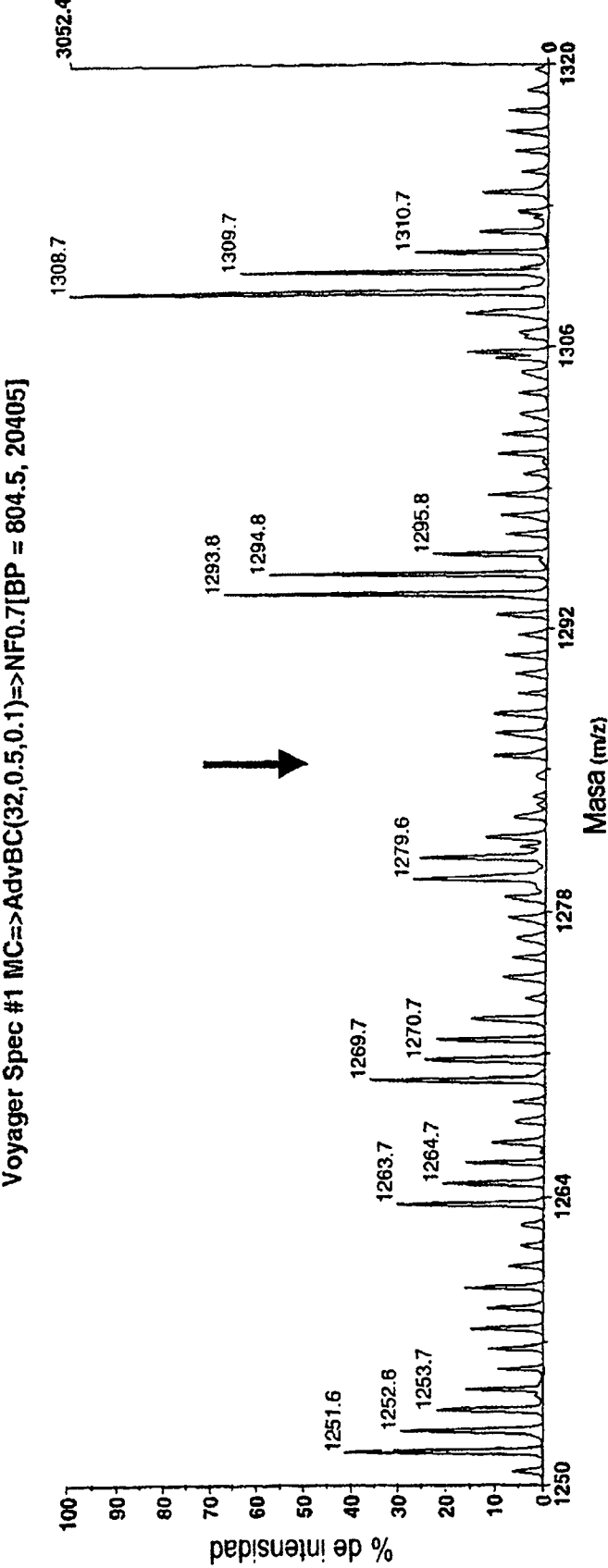


Fig 2C/

