

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 582**

21 Número de solicitud: 201630559

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.04.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.11.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070265**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACION  
SANITARIA FUNDACION JIMENEZ DIAZ (60.0%)**

**Avenida de los Reyes Católicos, 2  
28040 Madrid ES;**

**FUNDACION DE INVESTIGACION DEL HOSPITAL  
NACIONAL DE PARAPLEJICOS DE TOLEDO  
(20.0%) y**

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE  
(20.0%)**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ LLAMAS, Gloria;**

**VIVANCO MARTÍNEZ, Fernando;**

**GONZÁLEZ CALERO, Laura;**

**GONZÁLEZ BARDERAS, M<sup>a</sup> Eugenia y**

**RUILOPE URIOSTE, Luis Miguel**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **UN MÉTODO PRONÓSTICO Y KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RIESGO DE DESARROLLO DE ALBUMINURIA, RIESGO DE DAÑO RENAL Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN UN SUJETO HUMANO HIPERTENSO**

57 Resumen:

Un método de pronóstico y kit para identificar el riesgo de desarrollo de albuminuria, riesgo de daño renal y riesgo cardiovascular en un sujeto humano hipertenso. El método comprende la evaluación de la concentración en orina de al menos un compuesto seleccionado de entre glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3-ureidopropionato, 3-hidroxitirato, malato y piruvato, la determinación de si al menos uno de los marcadores está por encima o por debajo de los valores estándar en sujetos sanos, en el que dichos marcadores son la concentración de los compuestos y paneles integrados por varios compuestos, y la identificación de riesgos en dicho sujeto humano.

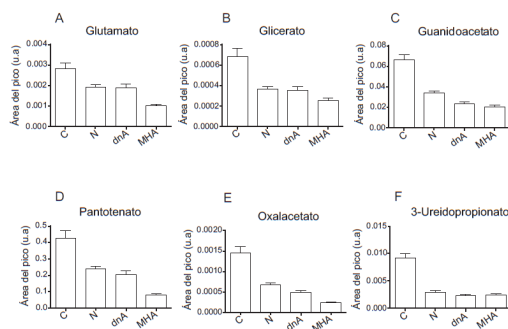


Fig. 1

ES 2 644 582 A1

**UN MÉTODO PRONÓSTICO Y KIT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RIESGO DE  
DESARROLLO DE ALBUMINURIA, RIESGO DE DAÑO RENAL Y RIESGO  
CARDIOVASCULAR EN UN SUJETO HUMANO HIPERTENSO**

5

**DESCRIPCIÓN**

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

10 La invención se refiere a un método pronóstico para la identificación del riesgo de desarrollo  
de albuminuria, riesgo de daño renal y riesgo cardiovascular en un sujeto humano  
hipertenso. La invención se refiere a un método pronóstico que comprende la evaluación de  
la concentración de al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo consistente  
15 en glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3-ureidopropionato, 3-  
hidroxibutirato, malato y piruvato en una muestra de orina y la determinación de uno de los  
marcadores o grupo de marcadores (paneles) que está por encima o debajo de los valores  
de sujetos sanos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

20 La hipertensión es una enfermedad multi-factorial de prevalencia en aumento y un  
importante factor de riesgo para la mortalidad cardiovascular incluso en presencia de un  
tratamiento aparentemente adecuado. La albuminuria se ha demostrado claramente ser un  
marcador de daño cardiovascular.

25 La supresión crónica del sistema renina-angiotensina (RAS) se ha demostrado que facilita el  
control de la presión arterial (PA), previene el desarrollo de la albuminuria de nueva  
aparición y disminuye la cantidad de albúmina urinaria en pacientes con persistencia de la  
albuminuria alta o muy alta. Sin embargo, en un subgrupo relevante de pacientes bajo  
supresión crónica de RAS existe alta albuminuria, ya sea mantenida (MHA) o desarrollada  
30 de novo (dnA). La albuminuria de novo se desarrolla hasta un 16,1% de los pacientes  
normoalbuminúricos durante los tres años siguientes al inicio del tratamiento (Cerezo C et al.  
Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system  
suppression. J Hypertens 2012;30:204-209).

35 Este grupo de pacientes probablemente representa aquellos con mayor riesgo de progresión  
de enfermedad CV y renal. El descubrimiento de predictores de progresión o desarrollo de

albuminuria durante la supresión crónica RAS está garantizado como una herramienta útil para detectar dónde la terapia farmacológica debe ser intensificada y también dónde los nuevos medicamentos deben ser principalmente probados.

5 El metaboloma está compuesto por los productos finales de bajo peso molecular del metabolismo del cuerpo, representando la respuesta del cuerpo definitiva para una determinada condición (por ejemplo, enfermedad) y complementando muy bien los estudios genéticos y de proteínas. La orina representa una fuente rica para investigar alteraciones moleculares asociadas con la fisiología renal y las enfermedades renales. El metaboloma  
10 fue previamente investigado en enfermedades cardiovasculares y de riñón. Sin embargo, muy pocos estudios se han llevado a cabo en el contexto de la hipertensión y aquellos relacionados con muestras humanas son particularmente escasos y centrados en la progresión de la enfermedad renal en individuos diabéticos.

## 15 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la presente invención es un método de pronóstico para identificar el riesgo de desarrollo albuminuria, riesgo de daño renal y riesgo cardiovascular en un sujeto humano hipertenso, que comprende:

20 a) la evaluación de la concentración de al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3-ureidopropionato, 3-hidroxi butirato, malato y piruvato en una muestra de orina obtenida de dicho sujeto humano,

b) la determinación de si al menos uno de los marcadores está por encima o por debajo de  
25 los valores estándar de sujetos sanos, en la que dichos marcadores se seleccionan del grupo consistente en la concentración de glutamato, la concentración glicerato, la concentración guanidoacetato, la concentración de pantotenato, la concentración de oxalacetato, la concentración de 3-ureidopropionate, la concentración de 3- hidroxibutirato, la concentración de malato, la concentración de piruvato, el panel que consiste en la  
30 concentración de glutamato, la concentración de guanidoacetato y la concentración de pantotenato, panel que consta de la concentración guanidoacetato, la concentración de pantotenato, la concentración de glutamato, la concentración de glicerato, la concentración de oxalacetato, la concentración de 3-ureidopropionato y la concentración de piruvato y el panel que consiste en la concentración de 3-hidroxi butirato y la concentración de piruvato y

35 c) la identificación del riesgo en dicho sujeto humano evaluando el resultado del paso b).

El método de pronóstico del primer aspecto de la presente invención es útil para identificar el riesgo de desarrollo albuminuria, el riesgo de daño renal y el riesgo cardiovascular en un sujeto humano hipertenso que está o no está bajo un tratamiento anti-hipertensión. Si dicho sujeto humano está bajo tratamiento para la hipertensión, dicho tratamiento podría basarse en inhibidores de sistema renina-angiotensina o podría basarse en cualesquiera otros compuestos apropiados para tratamientos anti-hipertensivos.

Otros compuestos apropiados para los tratamientos anti-hipertensión incluyen, pero no se limitan a, antagonistas del calcio, diuréticos, antagonistas de receptores de mineralocorticoides, alfa-bloqueantes, beta-bloqueantes y bloqueantes del sistema nervioso simpático.

En un aspecto particular, la invención es el método de pronóstico del primer aspecto de la invención, en el que dicho sujeto humano hipertenso está bajo el tratamiento con inhibidores de sistema renina-angiotensina.

Los ejemplos de la presente invención mostraron diferencias significativas para un total de nueve metabolitos urinarios: glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato y 3-ureidopropionate con valores disminuidos en comparación con los individuos sanos, y 3-hidroxi-butarato, malato y piruvato, con un aumento de respuesta en la hipertensión con la inhibición de RAS y/o condición de albuminuria.

La identificación del riesgo se considera positiva si las concentraciones de glutamato y/o glicerato y/o guanidoacetato y/o pantotenato y/ o oxalacetato y/ o 3-ureidopropionate son más bajas que los valores estándar de los sujetos sanos y/o concentraciones de 3-hidroxi-butarato sanos y/o malato y/o piruvato son más altas que los valores estándar de los sujetos sanos.

Los ejemplos de la presente invención confirmaron que guanidoacetato, glutamato y pantotenato mostraron niveles significativamente más altos en pacientes todavía en la condición de normoalbuminuria, pero que desarrollarán albuminuria en el futuro.

El panel que consiste en la concentración de glutamato, la concentración de guanidoacetato y la concentración de pantotenato, también llamado panel met-dnA en la presente solicitud, es un panel molecular para la identificación de los pacientes aún en la condición normoalbuminuria, pero que desarrollarán albuminuria en el futuro. Dicho panel identifica a

los pacientes con un riesgo cardiovascular, pero que no se identificarán correctamente usando las técnicas del estado del arte, ya que dichos pacientes tienen niveles normales de albuminuria. La identificación de dichos pacientes permite un tratamiento personalizado temprano. Dicho tratamiento temprano evitará daños renales irreversibles y daños  
5 cardiovasculares.

El panel consistente en la concentración de guanidoacetato, la concentración de pantotenato, la concentración de glutamato, la concentración de glicerato, la concentración de oxalacetato, la concentración de 3-ureidopropionato y la concentración de piruvato es un  
10 panel molecular para identificación de pacientes que responden a la hipertensión (HTN) con o sin albuminuria.

El panel que consta de la concentración 3-hidroxitirato y la concentración de piruvato, también llamado panel de met-MHA en la presente solicitud, es un panel molecular para la  
15 identificación de pacientes con albuminuria alta mantenida (MHA).

Otro aspecto es el método de pronóstico del primer aspecto de la invención, en el que las concentraciones del paso (b) se cuantifican mediante una técnica seleccionada del grupo consistente en resonancia magnética nuclear, inmunoensayo, cromatografía, sensores  
20 electroquímicos, microarray y espectrometría de masas o cualquier combinación de los mismos.

Un segundo aspecto es un kit para realizar el método del primer aspecto de la invención, comprendiendo reactivos adecuados para la cuantificación de la concentración de al menos  
25 uno de los compuestos seleccionados del grupo que consistente en glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3-ureidopropionato, 3-hidroxitirato, malato y piruvato en una muestra de orina obtenida de dicho sujeto humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Metabolitos de la orina que responden a HTN. Se observaron tendencias decrecientes en pacientes hipertensos crónicamente RAS suprimidos para el glutamato (A), glicerato (B), guanidoacetato (C), pantotenato (D), oxalacetato (E) y 3-ureidopropionato (F) en respuesta a HTN. Los gráficos representan el análisis SRM-LC-MS / MS de los metabolitos urinarios en una cohorte de 68 pacientes y 14 sujetos sanos (Tabla 1). Las señales individuales se normalizaron basándose en la corriente iónica total (TIC) y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación inter-grupos. Se aplicó la técnica no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Para mayor claridad, los detalles de importancia se incluyen en la Tabla 2 y más detalles se incluyen en la sección de análisis estadístico. C: control, N: normoalbuminuria, dnA: albuminuria de novo, MHA: albuminuria alta mantenida.

Figura 2. Metabolitos de la orina que responden a la albuminuria. Se observaron tendencias crecientes en pacientes hipertensos crónicamente RAS suprimidos para 3-hidroxiбутирато (A), malato (B) y piruvato (C) en respuesta a la albuminuria. Los gráficos representan el análisis SRM-LC-MS / MS de los metabolitos urinarios en una cohorte de 68 pacientes y 14 sujetos sanos (Tabla 1). Las señales individuales se normalizaron basándose en la corriente iónica total (TIC) y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación inter-grupos. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Para mayor claridad, los detalles de importancia se incluyen en la Tabla 2 y más detalles se incluyen en la sección de análisis estadístico. C: control, N: normoalbuminuria, dnA: albuminuria de novo, MHA: albuminuria alta mantenida.

Figura 3. Metabolitos urinarios con potencial predictivo. Un panel específico compuesto por tres metabolitos (guanidoacetato, glutamato y pantotenato) predice el desarrollo de albuminuria cuando se analiza en orina de los pacientes aún en condiciones de normoalbuminuria. Los gráficos representan el análisis SRM-LC-MS / MS de los metabolitos urinarios en una cohorte de 35 pacientes normo-albuminúricos (Tabla 1, cohorte de confirmación) que permanecieron como N o progresaron a dnA durante el seguimiento de al menos un año desde la toma de muestras de orina. Las señales individuales se normalizaron basándose en la corriente iónica total (TIC) y las áreas de los picos normalizados fueron calculados para la comparación inter-grupos. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. C: control, N:

normoalbuminuria, dnA: albuminuria de novo, MHA: albuminuria alta mantenida. \*\*\*\*: P valor <0,0001, \*\*\*: P valor <0,001, \*: valor de p <0,05.

Figura 4. Paneles multi-moleculares definidos de acuerdo a su respuesta ya sea a hipertensión (met-HTA), albuminuria alta mantenida (met-MHA) o albuminuria de novo (met-dnA). Los paneles superiores muestran las curvas ROC (AUC: área bajo la curva, 95% de intervalo de confianza) y los paneles inferiores muestran los gráficos de clases de probabilidades predictivas mostrando agrupaciones de acuerdo con su estado clínico. Met-HTN está compuesta por guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionato, oxalacetato y piruvato. Met-MHA se compone de 3-hidroxiacetato y piruvato. Met- dnA está compuesto por guanidoacetato, glutamato y pantotenato. Las curvas ROC se generaron mediante la validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreo equilibrado. "Random forest" fue seleccionado como método de clasificación empleado y el diagrama de probabilidad de predicción de clases se obtuvo utilizando el mejor clasificador (basado en el AUC).

Figura 5. La correlación positiva entre la exactitud de predicción de los paneles y el número de características incluidas.

## 20 EJEMPLOS DE LA INVENCION

### Materiales y métodos

#### *Clasificación y selección de pacientes*

25 La selección de pacientes se basó en un estudio anterior que muestra el desarrollo de albuminuria de novo en pacientes durante la supresión crónica del sistema renina-angiotensina (RAS) (Cerezo C et al. Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. J Hypertens 2012; 30: 204-209). En pocas palabras, en ese estudio, se revisó la evolución de 1533 pacientes de la Unidad Hipertensión -Hospital 12 de Octubre, que habían estado bajo supresión crónica de RAS durante al menos 5 años (2 antes de la llegada a la Unidad y tres de seguimiento después). Después de un período de 3 meses de estabilización, durante el cual se intentó el mejor control posible de factores de riesgo cardiovascular, y la dosis de supresión de RAS se les aumentó hasta el máximo tolerado, se obtuvieron los datos de referencia. Desde el inicio, 35 1141 pacientes se mantuvieron normoalbuminúricos, mientras que los restantes 392 (27,3%)

- presentaron albuminuria persistente. La PA se estimó mediante el uso de un dispositivo semiautomático validado OMRON en condiciones estandarizadas y la presencia de formas secundarias de hipertensión arterial fue excluida. Desde el inicio, los pacientes fueron seguidos posteriormente por un período mínimo de 3 años en los que se evaluó la progresión de la albuminuria cada seis meses. La supresión de RAS se mantuvo durante toda la duración del seguimiento. De los pacientes normoalbuminúricos al inicio del estudio, el 16,1% desarrollaron albuminuria de novo (es decir, ausente al inicio del estudio y posteriormente desarrollada) durante el período de 3 años. El desarrollo de albuminuria de novo se definió como cualquiera nueva aparición de alta albuminuria (ratio albúmina-creatinina de 20 a 200 mg/g de creatinina en hombres y 30-300 mg/g de creatinina en mujeres) confirmado en al menos una segunda ocasión entre las determinaciones semestrales realizadas en tres muestras de orina de la mañana o albuminuria muy alta (> 200 mg / g de creatinina en hombres y > 300 mg/g de creatinina en mujer).
- La investigación metabólica se realizó al final del tercer año de seguimiento. Un grupo de 118 pacientes hipertensos fueron seleccionados como una cohorte representativa (75 no diabéticos y 43 diabéticos). La diabetes se diagnosticó basándose en una glicemia en ayunas > 126 mg / dl, un nivel de glucosa sérica > 198 mg / dl después de una prueba de tolerancia oral a la glucosa, o el uso de fármacos antidiabéticos orales (presentes en 32 pacientes). Los 118 pacientes fueron clasificados en tres grupos de la siguiente manera: a) pacientes que permanecieron normoalbuminúricos durante el seguimiento de 3 años (N); b) pacientes que desarrollaron albuminuria novo durante el seguimiento (dnA); c) pacientes con albuminuria persistente desde el inicio y durante el seguimiento (MHA). Un grupo control de muestras de orina de 30 sujetos normotensos sanos (C), emparejado por sexo y edad se incluyó para evaluar las diferencias atribuibles a la hipertensión en sí. Este estudio se lleva a cabo con los requisitos para un estudio ómico en términos de tamaño del grupo muestral y flujo de trabajo técnico. Todo el grupo de 118 pacientes y 30 controles se dividió en dos cohortes diferentes para la fase de descubrimiento y la fase de confirmación. La primera fase de descubrimiento se llevó a cabo en una cohorte de 50 pacientes hipertensos y 16 controles. Las variaciones identificadas a nivel de metaboloma fueron evaluados más a fondo en una cohorte independiente de confirmación de 68 hipertensos y controles. Las características clínicas de estos pacientes reclutados para el estudio e incluidos en la cohorte de descubrimiento o cohorte de confirmación se resumen en la Tabla 1.
- Tabla 1. Características y medicación de los pacientes de referencia. Valores expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD), o porcentajes (%). Se evaluaron las



diferencias estadísticas entre los tres grupos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (P-valor <0,05 fue considerado significativo). IMC: índice de masa corporal; HDL: lipoproteína de alta densidad del colesterol; LDL: lipoproteína de baja densidad del colesterol. N: normoalbuminuria; dnA: albuminuria de novo; MHA: albuminuria alta mantenida. IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARB: bloqueadores de los receptores de angiotensina.

COHORTE DE DESCUBRIMIENTO INICIAL	N (n=17)	dnA (n=18)	MHA (n=15)	P-valor
Edad (años)	61±4	66±6	65±8	0.023
Sexo (masculino), %	47	67	60	0.499
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	29±4	29±5	32±5	0.219
Fumar en la actualidad. %	12	22	20	0.707
Colesterol total (mg/dl)	193±31	162±21	164±23	0.005
Triglicéridos (mg/dl)	114±53	124±62	121±86	0.886
Colesterol HDL (mg/dl)	52±9	52±12	45±13	0.183
Colesterol LDL (mg/dl)	118±28	84±14	98±19	0.001
Glucemia (mg/dl)	106±25	122±28	109±24	0.066
Acido úrico (mg/dl)	4.6±1.6	6.1±1.7	5.9±1.6	0.032
Aclaramiento de creatinina (mg/ml)	95±28	92±53	91±35	0.691
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	81±10	72±20	74±24	0.551
Presión sanguínea sistólica (mmHg) 135	135±16	132±16	134±16	0.968
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	83±11	80±12	81±9	0.676
ACR (mg/g)	7±9	230±404	215±379	<0.0001
Diabetes Mellitus. %	18	50	33	0.1015

ES 2 644 582 A1

Antihipertensivos, %				
ACEi	24	22	13	0.7436
ARB	59	67	73	0.7967
Diurético	59	44	53	0.696
Bloqueante de los canales de calcio	35	50	60	0.3765
Beta bloqueante	12	33	40	0.1758
Alfa bloqueante	12	33	20	0.3055
Otros tratamientos, %				
Anticoagulante	12	44	33	0.1071
Tratamiento de reducción de lípidos	77	78	67	0.7428
Agente antidiabético	18	44	33	0.2411
Antialdosterónicos	6	17	27	0.2838
COHORTE DE CONFIRMACIÓN	N (n=39)	dnA (n=13)	MHA (n=16)	P-value
Edad (años)	65±12	68±11	63±14	0.581
Sexo (masculino). %	36	62	69	0.052
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	30±5	31±4	29±4	0.505
Fumar en la actualidad %	10	15	13	0.881
Colesterol total (mg/dl)	184±29	168±27	184±36	0.261
Triglicéridos (mg/dl)	120±49	129±66	146±58	0.308
Colesterol HDL (mg/dl)	55±14	50±12	49±12	0.186
Colesterol LDL (mg/dl)	104±28	93±20	107±27	0.352
Glucemia (mg/dl)	115±33	116±27	123±39	0.894

ES 2 644 582 A1

Acido úrico (mg/dl)	5.4±1.7	6.4±1.7	7.2±1.7	0.003
Aclaramiento de creatinina (mg/ml)	183±437	96±36	75±42	0.238
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	81±20	72±22	68±28	0.201
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	138±18	144±20	144±32	0.618
135				
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	80±10	80±8	84±18	0.713
ACR (mg/g)	10±13	104±122	896±969	<0.0001
Diabetes Mellitus. %	33	39	50	0.5181
Antihipertensivos, %				
ACEi	10	8	31	0.1029
ARB	85	70	63	0.1738
Diurético	54	54	56	0.9861
Bloqueante de los canales de calcio	62	46	75	0.2877
Beta bloqueante	36	23	13	0.1993
Alfa bloqueante	13	23	19	0.6551
Otros tratamientos, %				
Agentes anticoagulantes	46	39	19	0.1691
Tratamiento de reducción de lípidos	80	54	88	0.0861
Agente antidiabético	23	15	31	0.6162
Antialdosterónicos	21	8	6	0.2961

Por último, se llevó a cabo un estudio prospectivo para evaluar la capacidad predictiva del desarrollo de albuminuria de novo para estos metabolitos que muestran alguna respuesta

relacionada con la hipertensión o la albuminuria. Los 35 pacientes normoalbuminúricos de la cohorte de confirmación (Tabla 1) pudieron ser clínicamente seguidos durante al menos un año adicional desde el muestreo de orina. Se clasificaron, en no progresores (permaneciendo como N) o progresores a dnA. El estudio clínico fue aceptado por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre y se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado por escrito antes de su inclusión.

*Análisis del metaboloma de orina por  $^1\text{H}$  NMR e identificación de metabolitos por RMN 2D*

10

Una primera fase de descubrimiento fue abordada por RMN. Se obtuvieron muestras de orina individuales de un total de 50 pacientes y 16 sujetos sanos. La tabla 1 recoge las características basales de los pacientes incluidos. Los tres grupos son comparables, con diferencias marginales para el colesterol total, colesterol LDL y ácido úrico. Brevemente, las muestras de orina se centrifugaron y los sobrenadantes se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras congeladas se descongelaron y se diluyeron con solución de 0,01 mM propionato de trimetilsilil de sodio (TSP) (como referencia interna para la calibración espectros) en  $\text{D}_2\text{O}$  tamponado con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  a pH 7,0. Todos los experimentos de RMN se realizaron a 277 K en un instrumento Bruker AVANCE III 700 y los espectros se procesaron utilizando TOPSPIN (versión 1.3, Bruker Biospin Ltd). Los espectros  $^1\text{H}$ -RMN se analizaron utilizando el software AMIX (versión 3.6.8, Bruker Rheinstetten, Alemania). Cada espectro se dividió en regiones y las regiones individuales fueron normalizadas para la comparación. La identificación inequívoca de metabolitos específicos con respuesta variable para la hipertensión y albuminuria se realizó mediante 2D RMN, Metabohunter y HMD (Tulpan D et al. MetaboHunter: an automatic approach for identification of metabolites from  $^1\text{H}$ -NMR spectra of complex mixtures. BMCBioinformatics. 2011;12:400). Para validar la asociación de metabolitos identificados con hipertensión y albuminuria, los metabolitos se midieron adicionalmente en una cohorte independiente por un método basado en la espectrometría de masas cuantitativa, como se describe en la siguiente sección.

30

*Confirmación de respuestas alteradas de metabolitos por análisis basado en espectrometría de masas*

35

Las muestras de orina se recogieron de una cohorte independiente compuesta por 68 pacientes y 14 sujetos sanos. La tabla 1 recoge las características basales de esta cohorte

de confirmación, mostrando grupos sin diferencias significativas en cualquiera de las variables entre los grupos de pacientes, aparte de ácido úrico. Los metabolitos alterados fueron analizados por SRM-LCMS / MS para la confirmación en un 6460 Triple Quadrupolo LC-MS/MS (1200 Serie 5, Agilent Technologies) controlado por el software Mass Hunter (Agilent Technologies v4.0) como se publicó anteriormente (Martin-Lorenzo M et al. KLK1 and ZG16B proteins and arginine–proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics*. 2015;11:1056-1067). Brevemente, las proteínas de la orina se eliminaron por precipitación orgánica y la separación se realizó a 0,4 ml/min en un gradiente de acetonitrilo. Las condiciones óptimas de análisis se establecieron previamente por análisis de estándares de metabolitos comerciales. Las señales individuales se normalizaron basándose en la corriente iónica total (TIC) y las áreas de los picos normalizadas fueron calculadas para la comparación inter-grupos.

#### 15 *Análisis estadístico*

Para identificar diferencias significativas en las características clínicas o medicamentos, los tres grupos (N, ndA y MHA) se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%. Para el cálculo de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metabolitos entre los grupos, nosotros aplicamos por primera vez el método de ROUT para detectar valores atípicos en base a la Tasa de Falso Descubrimiento (FDR), ajustando el Q al 5%. A continuación, se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron por medio del software GraphPad Prism (versión 6,01). Para evaluar la actuación de los marcadores individuales o de panel, las curvas ROC se construyeron mediante el servidor web Metaboanalyst (versión 3.0) (Xia J et al. *MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful*. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: W251-W257). Las curvas ROC se generaron mediante la validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreo equilibrado. Las curvas ROC univariante se calcularon en primer lugar con puntos de corte óptimos definidos como los más cercanos a la esquina superior izquierda. Entonces el análisis multivariante ROC se realizó mediante la combinación de estos metabolitos con respuesta similar. "Random forest" fue el método de clasificación empleado y el diagrama de probabilidad de predicción de clases se obtuvo utilizando el mejor clasificador (basado en el AUC). En la sección de resultados, se detallan los metabolitos específicos que componen cada panel.

Ejemplo 1. Una huella digital de metabolito responde a la condición de hipertensión y albuminuria

Los metabolitos se identificaron inicialmente como potenciales respondedores a la hipertensión con inhibición de RAS y albuminuria, basado en análisis de RMN realizada en una cohorte de descubrimiento inicial (véase la Tabla 1). Para la confirmación y la selección final de firmas metabólicas, los metabolitos se analizaron en una cohorte independiente (cohorte de confirmación) (véase la Tabla 1), utilizando una metodología altamente específica y cuantitativa basada en la medición de masas específicas correspondientes al metabolito de interés (SRM-LC -MS / MS) y como se ha publicado previamente (Martin-Lorenzo M et al. KLK1 and ZG16B proteins and arginine–proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery. *Metabolomics*. 2015;11:1056-1067). Se confirmaron diferencias significativas para un total de nueve metabolitos urinarios: glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato y 3- ureidopropionato con valores disminuidos en comparación con los individuos sanos (Figura 1), y 3- hidroxibutirato, malato y piruvato, con un aumento de la respuesta en la hipertensión con la condición de inhibición de RAS o albuminuria (Figura 2). En la Tabla 2, se muestra la comparación estadística inter- grupos para metabolitos que responden, ya sea a la hipertensión por sí sola, o a hipertensión con dnA o MHA.

Tabla 2. Metabolitos que muestran alteración significativa en la respuesta a hipertensión (HTA), albuminuria de novo (dnA) y albuminuria alta mantenida (MHA). Se muestran los P-valores. Las diferencias estadísticas entre cada dos grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (P-valor <0,05 fue considerado significativo). C: control. N: normoalbuminúricos. ns: no significativo.

25

METABOLITO (tendencia)	C/N	C/dnA	C/MHA	N/dnA	N/MHA	dnA/MHA
Glutamato ↓	0.0034	0.0128	<0.0001	ns	<0.0001	0.0005
Glicerato ↓	<0.0001	0.0005	<0.0001	ns	0.0068	0.0318
3-Ureidopropionato ↓	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	ns	ns
3-Hidroxi-butirato ↑	ns	ns	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001
Piruvato ↑	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0299	<0.0001	0.0001
Guanidoacetato ↓	<0.0001	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001	0.0150
Oxalacetato ↓	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0226	<0.0001	0.0062
Pantotenato ↓	0.0004	0.0002	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001
Malato ↑	0.0058	0.003	<0.0001	ns	<0.0001	<0.0001

La Figura 1 muestra cómo el glutamato (Figura 1A), glicerato (Figura 1B), guanidoacetato (Figura 1C), pantotenato (Figura 1D) y oxalacetato (Figura 1E) disminuyen significativamente en la orina de pacientes hipertensos en comparación con sujetos sanos y, aún más, en MHA. El 3-Ureidopropionato también disminuye significativamente en respuesta a HTN (Figura 1F), pero sin mostrar un efecto de empeoramiento con MHA.

Con una tendencia opuesta, el 3-hidroxi-butirato (Figura 2A) y el malato (Figura 2B) responden de manera significativa a MHA, por su parte piruvato aumenta progresivamente con la hipertensión, dnA y MHA (Figura 2C).

Ejemplo 2. Un patrón metabólico específico predice el desarrollo albuminuria en pacientes hipertensos normoalbuminuricos

Una vez identificados los patrones metabólicos con alteración de la respuesta en este escenario clínico, se realizó un estudio prospectivo por SRM-LC-MS/MS para evaluar una respuesta predictiva potencial para el desarrollo de albuminuria de esos nueve metabolitos encontrados alterados de manera significativa en los pacientes hipertensos. En un subgrupo de 35 pacientes normoalbuminuricos que fueron seguidos clínicamente durante al menos 1 año desde la toma de muestras de orina, 26 permanecieron como N, mientras que 9 evolucionaron a dnA. En este último grupo guanidoacetato, glutamato y pantotenato mostraron niveles significativamente más altos antes de que los pacientes pudieran clasificarse como dnA (Figura 3). Esto significa que estos tres metabolitos ya muestran una alteración en sus niveles urinarios cuando la situación clínica de los pacientes se encuentra todavía en la condición de normoalbuminuria.

Ejemplo 3. Paneles multi-moleculares ligados a la hipertensión, albuminuria mantenida y predicción de progresión

A la vista de las respuestas individuales de los metabolitos mostrando alteraciones significativas inter- grupos (Figuras 1 y 2), evaluamos el valor añadido de los paneles metabólicos. Metabolitos con respuestas similares (tendencias de variación) se agruparon y se evaluó el rendimiento de los paneles. Los análisis ROC multivariante se realizaron basándose en datos de espectrometría de masas y los resultados se recogen en la Figura 4. Un panel de respuesta molecular para la hipertensión ("met-HTN") puede definirse, incluyendo las respuestas a guanidoacetato, pantotenato, 3-ureidopropionate, oxalacetato y piruvato, y mostrando un valor de área bajo la curva ROC (AUC) de 0,942 (Figura 4A). Un panel compuesto por 3-hidroxiacetato y piruvato, denominado "Met-MHA" identifica MHA con valor AUC de 0,892 (Figura 4B).

En el estudio prospectivo, se encontró una alteración significativa en la orina de los pacientes N que más tarde progresaran a dnA para guanidoacetato, glutamato y pantotenato (Figura 3). Con estos datos, se evaluó la combinación de estas tres respuestas metabólicas en un tercer panel ("met-dnA") que resulta en un valor de AUC de 0,861 (Figura 4C).

El valor aditivo en la exactitud de predicción proporcionada por estos paneles diagnóstico/ pronóstico en lugar del basado en la respuesta de un marcador individual se demostró aquí. Se observa una correlación positiva entre la exactitud de predicción de los paneles y el número de características que incluye, aumentando la sensibilidad y la especificidad (véase la Figura 5).

25



**REIVINDICACIONES**

1. Un método de pronóstico para identificar el riesgo de desarrollo de albuminuria, riesgo de daño renal y el riesgo cardiovascular en un sujeto humano hipertenso, caracterizado porque comprende:
- 5 a) la evaluación de la concentración de al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste de glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, 5 oxalacetato, 3-ureidopropionate, 3-hidroxitirato, malato y piruvato en una muestra de orina obtenida de dicho sujeto humano,
- b) la determinación si al menos uno de los marcadores está por encima o por debajo de los  
10 valores estándar de sujetos sanos, en el que dichos marcadores se seleccionan del grupo que consiste en la concentración de glutamato, concentración de glicerato, concentración de guanidoacetato, concentración de pantotenato, concentración de oxalacetato, concentración de 3-ureidopropionato, concentración de 3-hidroxitirato, concentración de malato, concentración de piruvato, panel que consiste en la concentración de glutamato,  
15 concentración de guanidoacetato y concentración de pantotenato, panel que consiste en la concentración de guanidoacetato, la concentración de pantotenato, la concentración de glutamato, la concentración de glicerato, la concentración de oxalacetato, la concentración de 3-ureidopropionato y la concentración de piruvato y el panel que consiste en la concentración de piruvato y la concentración de 3-hidroxitirato y,
- 20 c) la identificación del riesgo en dicho sujeto humano evaluando el resultado del paso b).
2. Método de pronóstico de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho sujeto humano hipertenso está bajo tratamiento con inhibidores del sistema renina-angiotensina.
- 25
3. Método de pronóstico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque las concentraciones del paso (b) se cuantifican mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en resonancia magnética nuclear, inmunoensayo, cromatografía, sensores electroquímicos, microarray y espectrometría de masas o cualquier combinación de lo  
30 anterior.
4. Kit para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende reactivos adecuados para la cuantificación de la concentración de al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en  
35 glutamato, glicerato, guanidoacetato, pantotenato, oxalacetato, 3 ureidopropionato, 3-hidroxitirato, malato y piruvato en una muestra de orina obtenida de dicho sujeto humano.

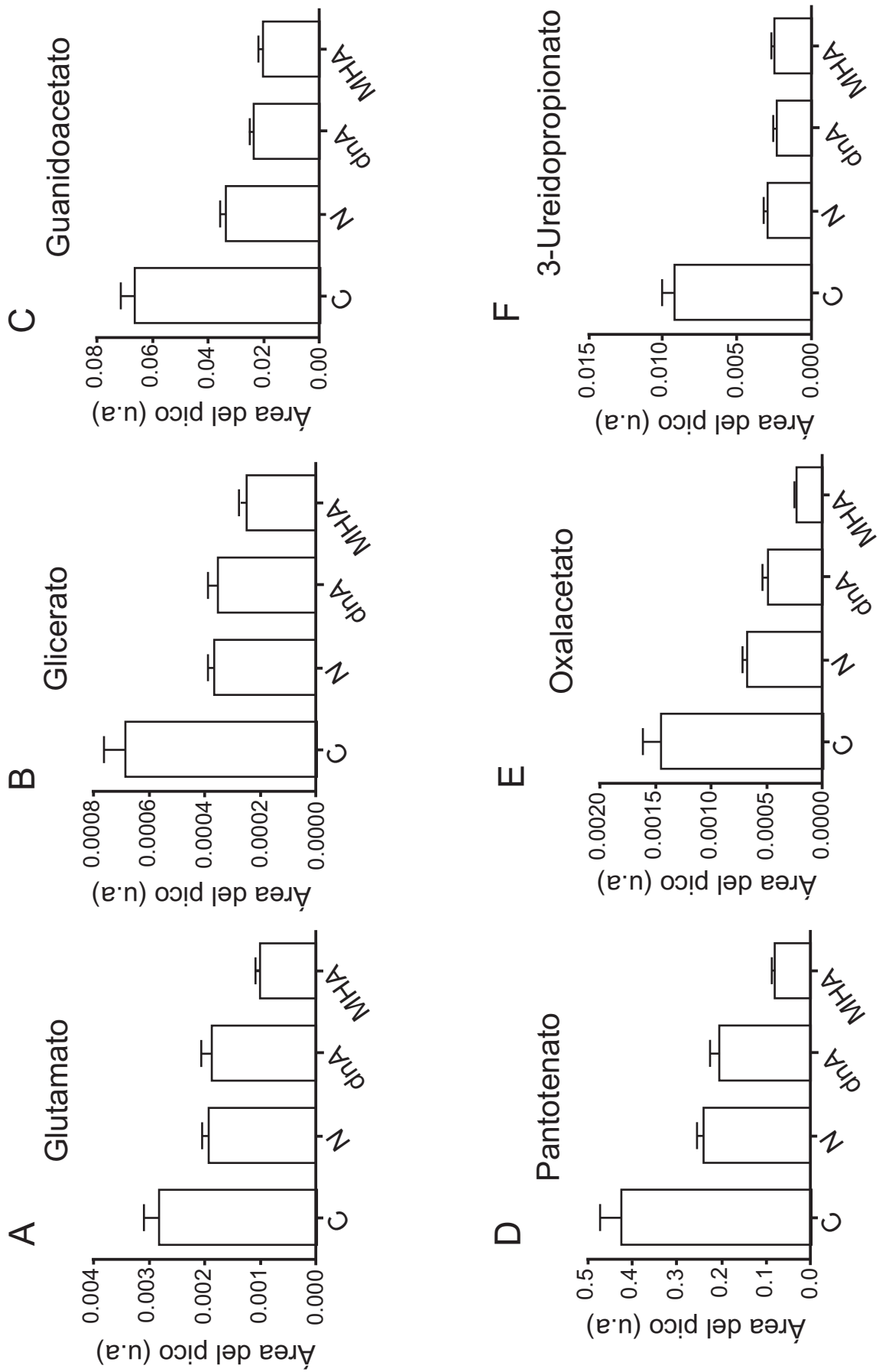


Fig. 1

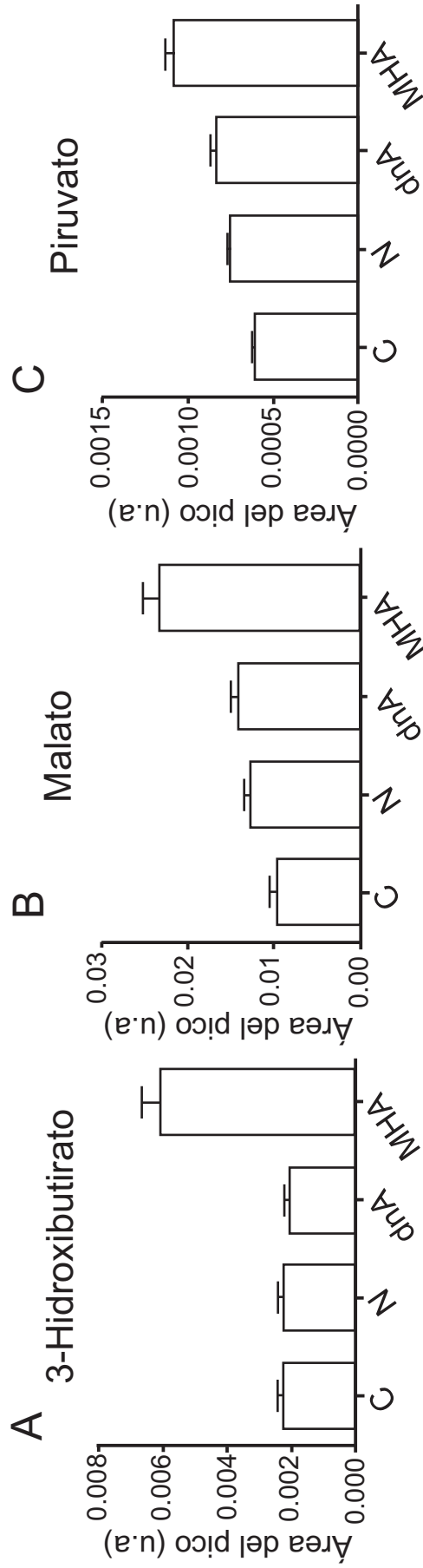


Fig. 2

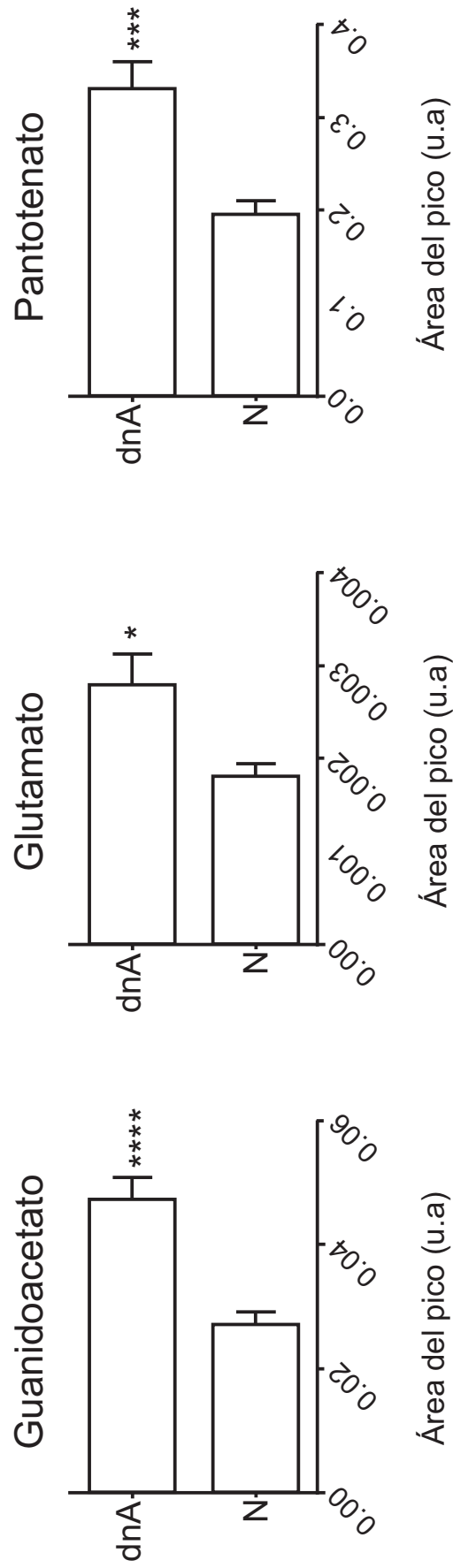


Fig. 3

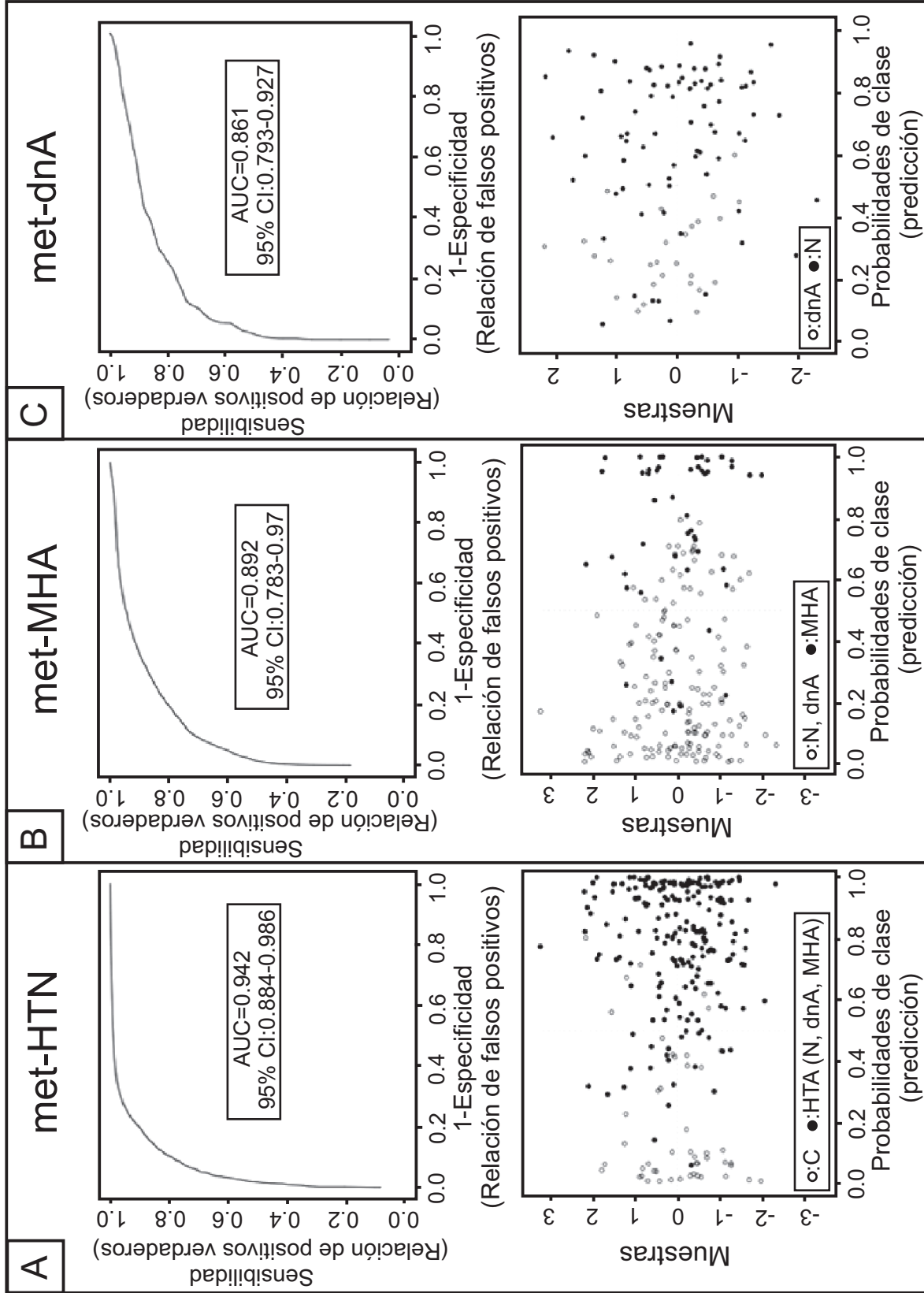


Fig. 4

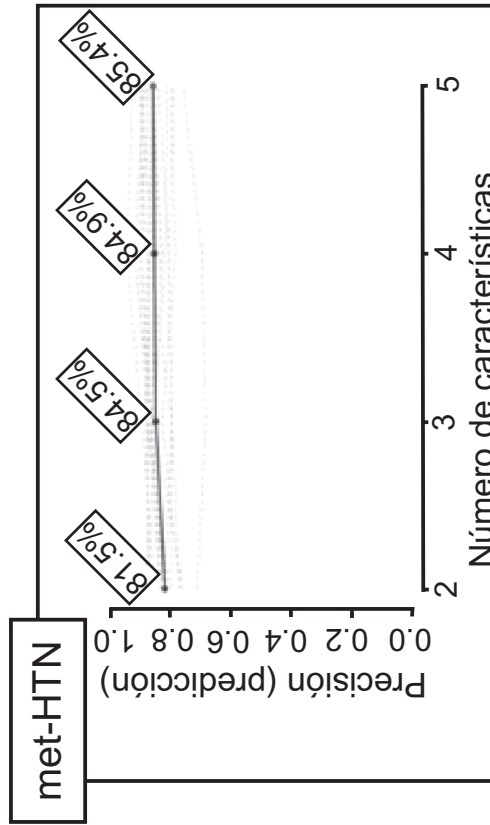
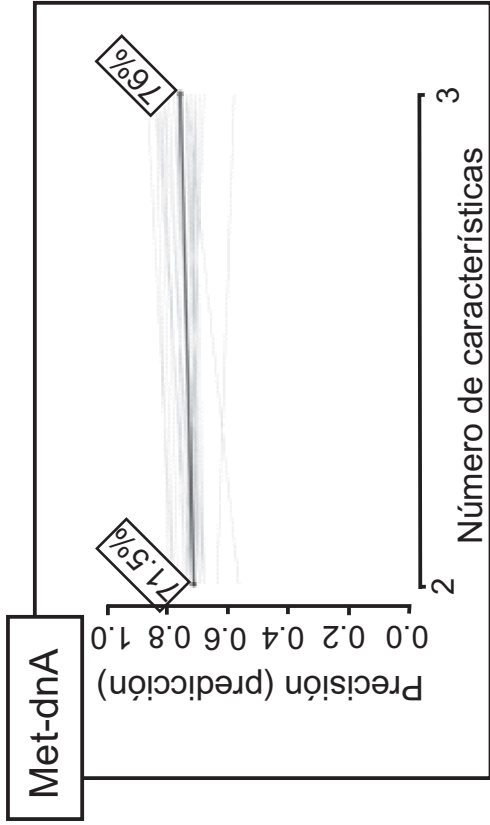


Fig. 5