

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 193**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2013** E 13158401 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** EP 2775306

54 Título: **La hormona paratiroidea biológica activa no oxidada determina mortalidad en pacientes en hemodiálisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2018**

73 Titular/es:

**IMMUNDIAGNOSTIK AG (100.0%)  
Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, DE**

72 Inventor/es:

**ARMBRUSTER, FRANZ PAUL;  
HOCHER, BERTHOLD y  
ROTH, HEINZ JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 689 193 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

La hormona paratiroidea biológica activa no oxidada determina mortalidad en pacientes en hemodiálisis

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a medios y métodos de monitorización de la concentración de hormona paratiroidea en muestras de plasma de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC).

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

El exceso de mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica estadio 5 es un importante problema no resuelto. La mortalidad anual de pacientes con enfermedad renal crónica estadio 5 es de aproximadamente 10 a 20%. Como un amplio estudio reciente demostró una asociación en forma de J entre la hormona paratiroidea (PTH) y la mortalidad, la PTH parece ser un factor responsable del exceso de mortalidad en pacientes que requieren hemodiálisis. Por consiguiente, la hormona paratiroidea (PTH) se ha descrito como una toxina urémica con múltiples efectos sistémicos que incluyen trastornos óseos (osteodistrofia renal), miopatía, anomalías neurológicas, anemia, prurito y cardiomiopatía. El hiperparatiroidismo es común en la ERC y produce morbilidad y mortalidad significativas si no se trata. Tanto los niveles bajos y como los altos de PTH medidos con los ensayos actuales de PTH se asocian con una progresión de enfermedades cardiovasculares y una mortalidad por todas las causas sustancialmente aumentada en pacientes en hemodiálisis (Floege J. et al., *ARO investigators. Serum iPTH, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population*. *Nephrol Dial Transplant*.2011;26:1948-1955; Torres PA et al, *Calcium-sensing receptor, calcimimetics and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease*. *Kidney Int*. 2012;82:19-25; Souberbielle JC et al. in *Parathyroid hormone measurement in CKD*. *Kidney Int*. 2010;77:93-100). Los niveles elevados de PTH se han asociado con una mayor mortalidad, pero los valores estándar de corte de la PTH no se han probado de manera suficiente (Melamed ML et al, *Third-generation parathyroid hormone assays and all-cause mortality in incident dialysis patients: the CHOICE study*, *Nephrol Dial Transplant*, 2008;23(5):1650-8).

Por lo tanto, se han establecido directrices con el objetivo de mantener la PTH en concentraciones asociadas con la menor morbilidad y la mayor supervivencia. Las directrices de la Iniciativa de Calidad de los Desenlaces de la Enfermedad Renal (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative "KDOQI") recomiendan medir regularmente las concentraciones de PTH de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y ajustar la medicación de los pacientes (por ejemplo, vitamina D, fijadores de fosfato, calcimiméticos) de modo que los niveles plasmáticos de PTH se mantengan dentro de un rango objetivo de acuerdo con el estadio de CKD (por ejemplo, 150 a 300 ng/L en pacientes con ERC estadio 5). Si los enfoques farmacológicos no funcionan adecuadamente, puede considerarse la paratiroidectomía.

El hiperparatiroidismo secundario también puede ocurrir como una respuesta adaptativa al deterioro de la función renal cuando la 1,25-dihidroxi vitamina D circulante disminuye tan pronto como en el estadio 2 de la ERC y continúa cayendo a medida que disminuye la tasa de filtración glomerular (TFG). La enfermedad renal crónica se asocia con una pérdida progresiva de actividad 1 $\alpha$ -hidroxilasa, debido a razones funcionales tales como inhibición enzimática por hiperfosfatemia, hiperuricemia, acidosis metabólica y, a veces, también deficiencia de 25-hidroxivitamina D. Más importante es, sin embargo, simplemente la pérdida de tejido renal sano y, por lo tanto, 1 $\alpha$ -hidroxilasa, que explica la reducción de la actividad 1 $\alpha$ -hidroxilasa en ERC. A medida que la TFG disminuye por debajo de 60 mL/min/1.73·m<sup>2</sup>, se retiene fosfato que estimula, directamente o a través del sistema klotho/FGF23, la secreción de PTH. Además, en esta situación, la deficiencia de 1,25-dihidroxi-vitamina D contribuye a una mayor secreción de PTH, ya que la secreción/expresión génica de PTH en la glándula paratiroides está controlada negativamente por la 1,25-dihidroxi vitamina D.

La hipocalcemia se desarrolla cuando la TFG disminuye por debajo de 50 mL/min/1.73·m<sup>2</sup>, estimulando aún más la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) desde las células de la glándula paratiroides a la circulación sanguínea. En la forma intacta, la hormona paratiroidea humana (hPTH) consta de una sola cadena polipeptídica que tiene 84 aminoácidos y un peso molecular de aprox. 9500 Dalton (véase SWISS-PROT: P01270, PTHY-HUMAN). Con la progresión de la enfermedad, la vida media de hPTH (aa 1-84) intacta aumenta y los fragmentos inmunoreactivos C-terminales de la hormona tienden a acumularse en el suero. Entonces, se produce una elevación crónica de la actividad paratiroidea, resultando en pérdida ósea, fracturas, calcificación vascular, enfermedad cardiovascular y, por lo tanto, un aumento de la mortalidad cardiovascular (véase Fraser WD, *Hyperparathyroidism*. *Lancet*. 2009; 374: 145f).

Parte del problema con el uso de las mediciones de PTH ha sido la confusión en relación a la interpretación de los ensayos utilizados. La medición de PTH en sangre ha evolucionado desde principios de la década de 1960, cuando se desarrollaron por primera vez los IER (RIA) para la medición de PTH (Berson SA et al, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1963; 49:613-617). Sin embargo, estos ensayos de primera generación demostraron no ser fiables debido a diferentes características de los antisueros utilizados y la comprensión de que la PTH circula no solo en forma de péptido intacto de 84 aminoácidos, sino también como fragmentos múltiples de la hormona, particularmente de las

regiones intermedia y carboxi (C)-terminal de la molécula de PTH. Después de la secreción, el péptido de PTH se degrada en cuestión de minutos en el riñón en fragmentos activos e inactivos y los fragmentos respectivos tienen, además, vidas medias variables. Se desarrolló una segunda generación de inmunoensayos de PTH usando dos anticuerpos, uno de unión en la porción aminoterminal del péptido de PTH con la actividad biológica, y el otro en su porción carboxiterminal (John MR et al. (1999), J. Clin. Endocrinol. Metab., 84, 4287-4290; Gao P et al., 2000, Poster M455, ASBMR 22nd Annual Meeting; Roth HJ et al. (2000), Poster P1288: 11th International Congress of Endocrinology, Sydney). Sin embargo, todavía existía una discrepancia entre la concentración de PTH inmunoreactiva medida en suero y los hallazgos clínicos (Goltzman D et al, *Discordant disappearance of bioactive and immunoreactive parathyroid hormone after parathyroidectomy*, J Clin Endocrinol Metab 1984, 58(1):70-75. Por lo tanto, una tercera generación de ensayo de PTH intacta se ha desarrollado que, no obstante, fracasa en mejorar el diagnóstico de enfermedades óseas u otros signos clínicos de hiperparatiroidismo secundario en pacientes urémicos (Brossard JH et al., *Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays*, Clin Chem. 2000;46:697-703). Mientras tanto, parece aceptado que algunos fragmentos de PTH inmunorreactivos tienen una actividad biológica comparable con péptidos de PTH intactos, mientras que otros como hPTH(3-34) parecen inhibir los efectos de la hormona paratiroidea (véanse EP-A 0 349 545; Schmidt-Gayk; et al. (1999) Osteologie forum, 5, 48-58), Suva et al. (1987) Science, 237, 893ff; EP 0 451 867). Además, se ha postulado que grandes fragmentos inactivos, pero inmunorreactivos de PTH no-(1-84) conducen a determinaciones erróneas (LePage R. et al. (1998) Clin. Chem., 44, 805-809). Además, la dipeptidil peptidasa-4 (DPP4) se expresa en la superficie de muchos tipos de células y una serina exopeptidasa más bien indistinta. Esto condujo a la hipótesis de que la PTH es un sustrato de la DPP4 o exoproteinasa similar, mientras que los dos aminoácidos extremos N-terminales son necesarios para la actividad cAMP-ciclasa y la unión del péptido PTH a su receptor. En consecuencia, también se han desarrollado inmunoensayos dúo-posición que emplean anticuerpos que pueden distinguir entre cadenas peptídicas de PTH aminoterminalmente "intactas" y péptidos de PTH a los que faltan uno o dos aminoácidos en el extremo aminoterminal (véase WO 2001/44818 (Armbruster et al), WO 96/10041 (Mägerlein et al.); WO 2003/03986 (Hutchison JS)).

El descubrimiento de cadenas peptídicas oxidadas de PTH en muestras de suero de pacientes urémicos ha llevado al desarrollo de inmunoensayos para la determinación de PTH no oxidada (1-84) y fragmentos biológicamente activos de los mismos (WO 2002/082092; Hocher et al., "*Measuring Parathyroid Hormone (PTH) in Patients with Oxidative Stress - Do We Need a Fourth Generation Parathyroid Hormone Assay?*" PLoS One, 7(7):e40242, 2012). Por lo tanto, hay múltiples inmunoensayos disponibles para medir la hormona paratiroidea en plasma y concentraciones de varias formas de péptido PTH "bioactivo" que son similares en grupos de pacientes y notablemente diferentes en otros grupos de pacientes. Por lo tanto, sería deseable obtener información fiable sobre el estatus de PTH de los pacientes que permita una adaptación de la medicación de pacientes renales para reducir la morbilidad y la mortalidad (véase también Sprague SM et al., *The Case for Rutine Parathyroid Hormone Monitoring*, Clin J Am Soc Nephrol, Oct. de 2012, como doi: 10.2215/CJN.04650512e; Goldsmith DJA, *refutación; The Case for Rutine Parathyroid Hormone Monitoring*, Clin J Am Soc Nephrol 8: 319-320, 2013. doi: 10.2215/CJN.10231012). Por lo tanto, el estado de la técnica en la medición de PTH representa un problema.

#### 40 RESUMEN DE LA INVENCION

El problema se resuelve mediante un método de monitorización y evaluación de la PTH que proporciona información fiable sobre cómo adaptar los fármacos generalmente prescritos a pacientes con ERC que interfieren con la secreción de PTH. El uso de estos fármacos también se guía mediante las directrices internacionales.

En consecuencia, la presente descripción se refiere a un método *in vitro* de monitorización y evaluación de la necesidad de una medicación que interfiere con la regulación del nivel de la hormona paratiroidea en un paciente renal sujeto a estrés oxidativo durante tratamiento de hemodiálisis que comprende los pasos de purificar una muestra de plasma o suero de dicho paciente renal de péptidos de PTH humana oxidados en cualquiera de las metioninas 8 o 18 o en ambas o en triptófano 23 poniendo en contacto dicha muestra con un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos oxidados de PTH humana pero el cual no se une a la PTH humana no oxidada (1-84) y a fragmentos de la misma; determinar la cantidad de péptidos humanos inmunoreactivos de PTH (iPTH) en dicha muestra mediante un inmunoensayo basado en anticuerpos contra la PTH humana (1-84) y fragmentos de la misma que contienen al menos los dominios responsables para la unión al receptor y la activación de la cAMP-ciclasa localizados entre los aminoácidos 3 a 34 de la secuencia de PTH humana; y obtener un valor de estatus de PTH (valor de n-oxPTH) para dicho paciente renal que incluye la tasa de péptidos de PTH inmunorreactivos humanos (iPTH) secretados por células de la glándula paratiroides en la circulación y la tasa a la cual los péptidos humanos inmunoreactivos PTH (iPTH) son oxidados por el estrés oxidativo sufrido por dicho paciente; y comparar el valor de estatus de PTH (n-oxPTH) con un valor de referencia en el que la morbilidad y la mortalidad por todas las causas es baja para determinar la necesidad de una medicación con respecto a una regulación del valor de estatus de PTH o para la suplementación del paciente con hormona paratiroidea humana o fragmentos activos de la misma o ambos. En particular, el método puede usarse para una muestra de un paciente renal sujeto a un tratamiento de hemodiálisis. En otros casos, la muestra puede provenir de un paciente renal con enfermedad renal crónica (ERC) o uremia o hiperparatiroidismo.

El método comprende preferiblemente el paso de poner en contacto dicha muestra de plasma o suero con una fase sólida que tiene un anticuerpo unido que reconoce y se une específicamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos de PTH humana oxidados pero el cual no se une a la PTH humana no oxidada (1-84) y fragmentos de la misma.

5 El método comprende una determinación de péptidos inmunoreactivos de PTH humana (iPTH) potentes que puede abarcar el uso de un inmunoensayo dúo-posición en el que un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une a un dominio implicado en la unión del péptido de PTH a los receptores de PTH 1 y 2. Alternativamente, la determinación puede comprender el uso de un inmunoensayo dúo-posición en el que un anticuerpo se une a un determinante antigénico que comprende la aminoácidos valina y serina del extremo aminoterminal de la PTH humana y el otro anticuerpo se une en la región entre amino los ácidos 14 a 34 de la secuencia de PTH humana. En otra realización, la determinación de PTH humana inmunorreactiva (iPTH) potente puede comprender el uso de un inmunoensayo dúo-posición en el que un anticuerpo se une a un determinante antigénico que comprende los aminoácidos 1 a 13 de la secuencia de PTH humana.

10 El anticuerpo empleado contra péptidos oxidados de PTH humana se une selectivamente a un epítipo tridimensional entre los aminoácidos 3 a 34 de la secuencia de PTH humana que no comprende las metioninas oxidadas en la posición 8 y/o 18. En otras palabras, nuestro análisis mostró que el anticuerpo monoclonal empleado específico para humano oxidado se une a un epítipo conformacional entre los aminoácidos 3 a 34 de la secuencia de PTH humana que comprende cualquiera de los sulfóxidos de metionina o sulfonas de metionina.

15 Un aspecto de la descripción se refiere a una determinación de la proporción de PTH humana inmunorreactiva (iPTH) y la cantidad de péptidos de PTH unidos por dicho anticuerpo que reconoce y se une selectivamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos de PTH humana oxidada.

20 Un aspecto adicional se refiere al uso de un kit en el método de la invención, el kit comprendiendo una fase sólida con un anticuerpo que reconoce y se une selectivamente a un epítipo tridimensional ubicado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos oxidados de PTH humana y una combinación de anticuerpos para determinar PTH humana inmunoreactiva intacta (iPTH) en plasma o suero que comprende un anticuerpo monoclonal que se une a un dominio implicado en la unión del péptido de PTH a los receptores de PTH 1 y 2.

25 El método descrito normalmente comprende una purificación de una muestra de plasma o suero de un paciente de cadenas de péptidos de PTH sujetas a estrés oxidativo y oxidadas en la metionina 8 o 18 o en ambas o en triptófano 23 poniendo en contacto dicha muestra con un anticuerpo que se une a un determinante antigénico oxidado de la hormona paratiroidea humana. La oxidación de PTH y, por lo tanto, la inactivación es un problema en pacientes con ERC en hemodiálisis ya que estos pacientes sufren de estrés oxidativo que interfiere con las mediciones convencionales de PTH. El método comprende además una determinación del estatus de la hormona paratiroidea secretada en dicha muestra purificada mediante un inmunoensayo que mide la concentración de esos péptidos de la hormona humana paratiroidea que contienen al menos los dominios responsables de la unión al receptor y activación de la cAMP-ciclasa de forma que se obtenga un estatus de PTH, en adelante estatus "n-oxPTH", que corresponde al equilibrio de la tasa de péptidos PTH secretados por las células de la glándula paratiroides en la circulación y la eliminación de péptidos de PTH de la circulación que se han oxidado por el estrés oxidativo a través del tratamiento de hemodiálisis. Así, el método descrito compara el estatus n-oxPTH medido con un estatus n-oxPTH en el que la mortalidad por todas las causas de pacientes en hemodiálisis es baja para determinar la necesidad de una medicación con respecto a una regulación de la hormona paratiroidea secretada o mediante una suplementación directa de la hormona paratiroidea.

35 El método comprende contactar dicha muestra de plasma con una fase sólida que tiene anticuerpos unidos que se unen a un determinante antigénico oxidado de la hormona paratiroidea humana. El material de unión puede ser en forma de una suspensión viscosa.

40 De acuerdo con un aspecto preferido, el método comprende el uso de un inmunoensayo dúo-posición en el que un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une a un dominio implicado en la unión del péptido de PTH a los receptores de la PTH 1 y 2. El anticuerpo puede ser uno que reconoce y se une selectivamente a un epítipo entre los aminoácidos 1 a 13 de la hormona paratiroidea humana como se describe en el documento WO 2003/003986 (Hutchison JS) o como se describe en el documento WO 01/44818 (Armbruster FP et al.) o en el documento US 6,030,790 (Adermann et al). Otros anticuerpos adecuados para determinar la concentración de péptidos de PTH humana secretados potentes se describen en el documento WO 00/42437.

45 En otra realización, el método comprende el uso de un inmunoensayo dúo-posición en el que un anticuerpo se une a un determinante antigénico que comprende los aminoácidos valina y serina del extremo aminoterminal de la PTH humana y el otro anticuerpo se une en la región entre los aminoácidos 14 a 34 de la secuencia de PTH humana.

50 En una realización preferida, el anticuerpo para purificar los péptidos PTH inmunorreactivos potentes reconoce un determinante antigénico tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de la hormona paratiroidea humana

que es formado por un cambio de conformación peptídica tras la oxidación de la hormona paratiroidea nativa en cualquier metionina en posición 8 y/o 18 o en triptófano en posición 23. Si bien no hay datos de RMN disponibles, un experto apreciará que se produce el mismo cambio de conformación de péptido de PTH aproximadamente mediante una eliminación proteolítica de los aminoácidos del extremo aminoterminal, serina y valina, de modo que tal anticuerpo de conformación también retirará dichos péptidos mal plegados. Si el cambio de conformación conduce sinérgicamente a una oxidación del péptido tras el estrés oxidativo, sigue sin ser elucidado. Sin embargo, la oxidación y el cambio de conformación son indicativos de la tasa de eliminación de PTH del plasma.

Un aspecto de la invención se refiere a la prueba de muestras de suero o plasma de un paciente aquejado de enfermedad renal crónica. Otro aspecto está relacionado con la prueba de muestras de pacientes urémicos o pacientes con hipertiroidismo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

La presente invención se comprende mejor cuando se lee junto con las tablas y figuras adjuntas, que sirven para ilustrar las realizaciones preferidas. Se entiende, sin embargo, que la invención no se limita a las realizaciones específicas descritas en las figuras:

**Fig. 1** es un diagrama que muestra la distribución de la frecuencia relativa (%) de los valores séricos medidos para un estatus medido de la hormona paratiroidea no oxidada (n-oxPTH) en 340 pacientes en hemodiálisis.

**Fig. 2** es un diagrama que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de muerte en 340 pacientes en hemodiálisis; los pacientes fueron estratificados en terciles de concentraciones de estatus de la hormona paratiroidea no oxidada (n-oxPTH) medida (prueba de rango logarítmico, chi cuadrado = 14,30; p = 0,0008).

**Fig. 3** son diagramas que muestran las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de muerte en pacientes en hemodiálisis que tienen un nivel de iPTH medido más alto que el rango de iPTH normal en sujetos sanos (70 ng/L). (A) Cuando los pacientes fueron estratificados según la mediana del estatus de la hormona paratiroidea no oxidada (n-oxPTH) medible (Prueba de rango log, chi cuadrado = 0,046; p = 0,80) el estatus de n-oxPTH no se correlaciona con los desenlaces de los pacientes. (B) Cuando los pacientes se estratificaron de acuerdo a la mediana de las concentraciones de iPTH (prueba de rango logarítmico, Chi cuadrado = 3,852; p = 0,049), los niveles de PTH oxidada medidos usando el ensayo iPTH es predictivo para el desenlace de los pacientes.

**Fig. 4** es un diagrama con las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de muerte en 340 pacientes en hemodiálisis. De acuerdo con las directrices internacionales, los pacientes se estratificaron en cinco categorías iPTH que representan niveles muy bajos (<20 ng/L), bajos (20 a 65 ng/L), medianos (65 a 150 ng/L), objetivo (150 a 300 ng/L) y altos (> 300 ng/L) (Chi cuadrado 16,35; P = 0,0026 por prueba de log-rank). El patrón en forma de J entre los niveles iPTH y el desenlace son característicos para los pacientes en hemodiálisis y, por lo tanto, indican que los hallazgos observados en el estudio actual son de aplicación general.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los estudios en animales han demostrado que la oxidación de PTH en residuos de metionina da como resultado una pérdida de actividad biológica. Cualquier estrés oxidativo o una desactivación oxidativa de la hormona paratiroidea puede ser compensada o incluso sobrecompensada mediante una mayor secreción de la hormona paratiroidea en la circulación. Aquí, revelamos un parámetro de estrés oxidativo y su impacto en la mortalidad de pacientes en hemodiálisis que da lugar a una decisión terapéutica y medicación específica. Más específicamente, se comparan los efectos de la PTH inmunorreactiva intacta no oxidada (n-oxPTH) y la PTH inmunorreactiva intacta (iPTH) en el suero y se asocian con la supervivencia de pacientes en hemodiálisis.

"PTH intacta" se define como la cantidad o concentración de péptidos de PTH inmunorreactiva cuando se determina mediante un inmunoensayo mono- o dúo-posición que detecta el péptido de PTH que contiene al menos los dominios responsables de la unión al receptor y la activación de la cAMP-ciclasa. Aquellos se encuentran en la parte aminoterminal de la proteína PTH (hPTH(1-37)). El dominio de unión al receptor de cAMP comprende la región de His<sup>14</sup> a Phe<sup>34</sup> y el dominio de estimulación de síntesis de ADN comprende Asp<sup>30</sup> a Phe<sup>34</sup>. El péptido aminoterminal completo hPTH (1-34) es necesario para el plegado correcto y la estimulación de la ruta de señal dependiente de cAMP. El potencial estimulador se pierde por la supresión de Ser<sup>1</sup> y Val<sup>2</sup>, pero la capacidad de unión al receptor de cAMP no se ve afectada por esta supresión, lo que indica que la activación y los lugares de unión al receptor están ubicados en diferentes dominios.

La "PTH intacta" inmunorreactiva como se definió anteriormente no es sinónimo de "PTH bioactiva" ya que la bioactividad de la PTH se ve afectada por el plegado correcto de las cadenas peptídicas de PTH y la ausencia de una oxidación de una o más metioninas en posiciones 8 y/o 18 o triptófano 23. A pesar de numerosos estudios, las rutas para la bioactividad de la hormona paratiroidea y su desactivación siguen sin estar claras y difícilmente pueden correlacionarse con una entidad peptídica de PTH que se dice que comprende la "bioactividad efectiva". La desaparición discordante de la bioactividad de PTH y la inmunorreactividad en plasma en pacientes apunta a un equilibrio dinámico de PTH, por lo que una medicación con PTH requiere una determinación de la tasa de secreción momentánea de actividad "PTH intacta" y una tasa de eliminación momentánea de "péptidos oxPTH" de manera que la medición del estatus n-oxPTH descrito tenga en cuenta ambas tasas de PTH y pueda dar indicaciones para una medicación adecuada de PTH requerida por el paciente.

Las mediciones de n-oxPTH pueden realizarse usando sistemas de prueba para la determinación de "PTH bioactiva" que no tienen una reactividad cruzada clínicamente relevante con los abundantes productos de degradación de PTH C-terminales, por ejemplo, hPTH (35-84) y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, el inmunoanálisis Elecsys™ 2010 PTH de la empresa Diagnostics GmbH, Mannheim y CAP-PTH-IRMA de la empresa Scantibodies. El inmunoensayo de electroquimioluminiscencia emplea un anticuerpo monoclonal captor contra un epítipo de conformación aminoterminal que comprende los aminoácidos 26 a 32 de hPTH y un anticuerpo trazador marcado con complejo de rutenio contra un epítipo de hPTH C-terminal correspondiente a los aminoácidos 55 a 64. El anticuerpo monoclonal captor reconoce el "fragmento grande hPTH (7-84)" inactivo pero no fragmentos de hPTH bioactivos como hPTH(1-34), hPTH (1-35) o hPTH (1-37) (Gao P et al., 2000, Poster M455. ASBMR 22nd Annual Meeting, Roth HJ et al. (2000), Poster PI 288; 11th International Congress of Endocrinology, Sydney). El CAP-PTH-IRMA de la empresa Scantibodies (Santee, CA, EE. UU.) emplea anticuerpos policlonales contra la región N-terminal de hPTH(1-6) que se describen como tales que no se unen a los fragmentos grandes de PTH (7-84). Por otra parte, Quest Diagnostics Inc. introdujo una "prueba de PTH Bio-intacta" y obtuvo la aprobación de la FDA, ya que decía reconocer la molécula completa de la hormona paratiroidea, en lugar de fragmentos de la molécula, que tiene tendencia a romperse. Actualmente, la medición de PTH a menudo se complica por la presencia de fragmentos de PTH inactivos en la sangre, lo cual afecta a la utilidad clínica de dicha prueba. Al reconocer la molécula de PTH completa, que consiste en una cadena de 84 aminoácidos, el ensayo Bio-Intact PTH tiene especificidad para la región N-terminal de PTH, que se considera esencial para el efecto biológico de la PTH. La prueba Bio-Intact PTH usa anticuerpos patentados que se describen como tales que se unen a un epítipo tridimensional que comprende los aminoácidos 1-13. Se use cualquier inmunoensayo que sea para determinar la tasa de secreción de hPTH en circulación, el estado de hPTH resultante no refleja la verdadera bioactividad de PTH porque estos inmunoensayos no pueden tener en cuenta todos los factores relevantes, como las rutas de degradación, la multitud de fragmentos de PTH activos, parcialmente activos e inactivos, ni de sus vidas medias diferentes en suero o plasma.

La presente solicitud describe que los pacientes en hemodiálisis que tienen n-oxPTH en el tercil n-oxPTH superior muestran una mayor supervivencia en comparación con los pacientes del tercil n-oxPTH inferior. Después del ajuste multivariable, se redujo el tercil n-oxPTH más alto, mientras que la edad más alta aumentó las probabilidades de muerte en pacientes en hemodiálisis. La validez de la presente descripción se ve reforzada por el hecho de que la estratificación en cinco categorías de los datos de iPTH de nuestra cohorte de acuerdo a las directrices internacionales revela que los pacientes en hemodiálisis con niveles objetivo de iPTH de acuerdo a las directrices tienen una mediana de supervivencia más larga en comparación con los otros grupos. El patrón de supervivencia en forma de J confirma los resultados derivados de los datos de iPTH de un gran metaanálisis de mortalidad. Los ensayos actuales de PTH no distinguen entre la secreción y la eliminación de las formas de PTH, aunque es bien sabido que la oxidación de la PTH da como resultado la pérdida de su actividad biológica. Nuestro análisis en un subgrupo de pacientes en hemodiálisis que muestran iPTH por encima del rango normal superior (70 ng/L) claramente separó los verdaderos efectos de la hormona de los desastrosos efectos del aumento de la eliminación y la oxidación. La mayoría de los inmunoensayos actuales notarían una mayor eliminación de la PTH inmunorreactiva, pero no el aumento de la oxidación y la desactivación. Observamos que el aumento de la mortalidad en este subgrupo dependió de la oxidación proteica de iPTH como un sustituto de la oxidación proteica en general y la oxidación asociada a la alteración de la función y estructura de la proteína, pero no en la n-oxPTH biológicamente activa.

La PTH humana es secretada por las células principales de las glándulas paratiroides como un polipéptido que tiene 84 aminoácidos. Después de la secreción a la circulación, los péptidos bioactivos de PTH que comprenden los dominios esenciales aumentan el calcio sanguíneo mediante una activación del receptor de la hormona paratiroidea 1, presente en niveles elevados en los huesos y los riñones, y el receptor de la hormona paratiroidea 2, presente en niveles elevados en el sistema nervioso central sistema, páncreas, testículos y placenta. La vida media de esos péptidos bioactivos de PTH es de aproximadamente 4 minutos solamente. Se sabía también que la oxidación de esos péptidos de PTH puede dar como resultado una pérdida de actividad biológica (Galceran T et al., en *Absence of biological effects of oxidized parathyroid hormone (1-34) in dogs and rats*. *Endocrinology*. 1984;115:2375-2378; Horiuchi N. *Effects of oxidation of human parathyroid hormone on its biological activity in continuously infused, thyroparathyroidectomized rats*. *J Bone Miner Res*. 1988;3:353-358; Zull JE et al, en *Effect of methionine oxidation and deletion of amino-terminal residues on the conformation of parathyroid hormone*. *Circular dichroism studies*. *J Biol Chem*. 1990; 265:5671-5676). De hecho, muchas publicaciones se han ocupado del efecto del estrés oxidativo

5 en el caso de pacientes con insuficiencia renal crónica (Martin-Mateo MC et al. (1999), Ren Fail 21: 55-167; Hasselwander O et al. (1998) Free Radic Res 29:1-11; Zoccali C et al. (2000) Nephrol Dial Transplant 15: Suppl. 2; Canaud B et al. (1999) Blood Purif 17:99-106). Varios grupos de trabajo han investigado la hormona paratiroidea oxidada y su actividad biológica (Alexiewicz LM et al (1990), J Am Soc Nephrol 1:236-244; Zull J E et al. (1990) J Biol Chem 265:5671-5676; Pitts TO et al. (1988) Miner Electrolyte Metab 15: 267-275; Horiuchi N (1988) J Bone Miner Res 3:353- 358; Frelinger A L et al. (1986) Arch Biochem Biophys 244:641-649; GalceranT et al. (1984) Endocrinology 115,2375-2378; Frelinger A L et al. (1984) J Biol Chem 259:5507- 5513; O'Riordan JLH et al. (1974) J Endocr 63:117-124; Logue FC et al (1991) Ann Clin Biochem 28:160-166; Logue FC (1991b) J Immun Meth 39:159). El estrés oxidativo en pacientes en diálisis y su consecuencia en la morbilidad y la mortalidad por todas las causas, sin embargo, no se ha investigado y reconocido hasta el momento.

15 Los denominados análisis *intact PTH* (iPTH) y *bio-intact sandwich* no diferencian entre las cadenas peptídicas de PTH no oxidadas (n-oxPTH) y las cadenas peptídicas oxidadas de PTH (oxPTH). Usando espectroscopia de masas demostramos recientemente que el estrés oxidativo en pacientes en hemodiálisis puede conducir a una oxidación de la PTH humana *in vivo* y a una variedad de productos inactivos de PTH con residuos de metionina oxidados en las posiciones 8 y 18 (Hocher B et al en *Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress-do we need a fourth generation parathyroid hormone assay?* PLoS One. 2012;7:e40242). Este descubrimiento y la distinción inmunológica entre cadenas peptídicas de PTH oxidadas "intactas" y no oxidadas en plasma o suero dan lugar a un estatus n-oxPTH que permite una nueva medicación de pacientes en hemodiálisis. De aquí en adelante, el término n-oxPTH se usa para una concentración de PTH inmunorreactiva "intacta" (iPTH) como se definió anteriormente en suero o plasma después de tomar en cuenta la eliminación de PTH en suero o plasma mediante la oxidación de cadenas peptídicas de PTH. Si la concentración de n-oxPTH medida representa la "verdadera" bioactividad de la PTH presente en el suero o no, no es relevante ya que descubrimos que la mortalidad por todas las causas de los pacientes en hemodiálisis está ligada al equilibrio de la PTH intacta secretada inmunorreactiva y las cadenas peptídicas de PTH que son inmunorreactivas para la oxidación en la porción aminoterminal de PTH. Solo después de la eliminación de esas cadenas oxidadas de PTH, la tasa resultante de iPTH secretada en el suero proporciona un parámetro *in vitro* que permite una decisión terapéutica tal como que una terapia con vitamina D, fijadores de fósforo o calcimiméticos necesite ajuste para alcanzar los objetivos de tratamiento provistos por las directrices internacionales. El descubrimiento de un parámetro dinámico de PTH que se correlaciona con la mortalidad por todas las causas en los pacientes en hemodiálisis permite, entonces, una medicación y terapia razonables. En los ejemplos que se describen a continuación, la concentración de PTH en el suero se midió mediante un sistema de inmunoensayo *intact-PTH* de tercera generación (ElecSys™2010 PTH Roche), tanto directamente (hormona paratiroidea intacta total, iPTH) como después de la retirada de las moléculas oxidadas de PTH de las muestras utilizando un anticuerpo monoclonal que se une a cadenas peptídicas oxidadas de PTH humana.

40 Los pacientes en hemodiálisis (224 hombres/116 mujeres) en nuestro estudio tenían una edad media de 66 años. 170 pacientes (50%) murieron durante el tiempo de seguimiento de 5 años. Los niveles medianos de n-oxPTH fueron más elevados en los supervivientes (7,2 ng/L) en comparación con los pacientes fallecidos (5,0 ng/L; p=0,002). El análisis de supervivencia mostró una mayor supervivencia en el tercil n-ox-PTH más alto en comparación con el tercil n-oxPTH más bajo (Chi cuadrado 14.3; p=0,0008). La mediana de supervivencia fue de 1702 días en el tercil n-oxPTH más alto, mientras que solo fue 453 días en el tercil n-oxPTH más bajo. La regresión de Cox multivariable ajustada mostró que una mayor edad aumentó las probabilidades de muerte, mientras que un mayor n-oxPTH reduce las probabilidades de muerte. Otro modelo que analizó un subgrupo de pacientes con concentraciones basales de iPTH secretada por encima del rango normal superior del ensayo iPTH (70 ng/L) reveló que la mortalidad en este subgrupo se asoció con la oxidación de PTH pero no con los niveles de n-oxPTH. La gran diferencia numérica entre los niveles objetivo de PTH de acuerdo a las directrices internacionales (objetivo de PTH = 150 a 300 ng/L) y la mediana del valor n-oxPTH en los supervivientes (7,2 ng/L) no escapará a la atención del lector experto y no podría haber sido anticipada. En conclusión, los poderes predictivos de los niveles de n-oxPTH e iPTH sobre la mortalidad de pacientes en hemodiálisis difieren sustancialmente. Mediciones de n-oxPTH, por lo tanto, reflejan con mayor precisión el estatus dinámico de la hormona PTH. La mortalidad asociada a iPTH, especialmente cuando los niveles de iPTH son altos, refleja principalmente la mortalidad asociado a la oxidación de la proteína PTH y el estrés oxidativo. Esto da lugar a un nuevo programa de medicación y terapia. El experto también apreciará que el grado de oxidación de la PTH y de una medición del estrés oxidativo inherente lleva a nuevas terapias y programas de medicación. Por lo tanto, la cantidad cuantitativa de péptidos oxidados de PTH en suero o plasma representa un parámetro médico importante que requiere regulación y monitorización.

## Ejemplos

### 60 EJEMPLO 1

#### *Mediciones de PTH*

65 La PTH se midió por medio de un sistema de inmunoensayo de PTH de electroquimioluminiscencia de tercera generación tanto directamente (iPTH) como previa retirada de moléculas de PTH mal plegadas u oxidadas de las

muestras usando anticuerpos monoclonales producidos contra la PTH humana oxidada (n-oxPTH). La retirada de PTH oxidada se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PTH oxidada humana como se describe abajo. El anticuerpo monoclonal anti-PTH humana oxidada fue inmovilizado en Sepharose 4B activada con CNBr (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia). Una columna (MobiSpinColumn, MoBiTec, Göttingen, Alemania) se rellenoó con una alícuota de cien µL de la suspensión viscosa y se equilibró con tampón PBS, pH 7,4. Entonces, 500 µL de las muestras de plasma se aplicaron sobre las columnas que se incubaron mezclando de extremo a extremo durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó con 250 µL de acetato de amonio 0,1 M tampón pH 7,0, seguido de un lavado con 250 µL de tampón de acetato de amonio 0,1 M, pH 7,0, que contiene 20% de acetonitrilo, y luego se eluyó 2 veces con 200 µL de tampón de elución (ácido fórmico 0,05 M, pH 3,5). El flujo continuo se recogió por separado y se liofilizó.

A continuación, las muestras se reconstituyeron en 500 µL de tampón PBS, pH 7,4 y se analizaron alícuotas para iPTH. El inmunoensayo iPTH empleado (ECLIA Elecsys 2010; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) se basa en un anticuerpo monoclonal biotinilado que reacciona con los aminoácidos 26-32, y un anticuerpo monoclonal de complejo de rutenio de captura que reacciona con los aminoácidos 55-64. Las determinaciones se realizaron en un Roche Modular E 170. El CV de intraensayo fue del 4,1% y el CV de interensayo fue de 5,8% a concentraciones de 35,0 y 180,0 ng/L, respectivamente.

## EJEMPLO 2

*Anticuerpos monoclonales contra un epítipo de conformación de PTH oxidada (aa 1-38)*

Se generaron anticuerpos monoclonales en ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron con el conjugado oxPTH (aa 1-38) tiroglobulina a 200 µg para ambas inmunizaciones, primaria y secundaria, con Freund incompleto (solo aceite mineral) en la cavidad intraperitoneal. Se probó cada uno de los antisueros para la unión a biotina-hPTH no oxidada (1-38). Para detectar los anticuerpos que reconocen específicamente péptidos oxPTH (aa 1-38) utilizamos la técnica de separación de anticuerpo doble y como trazador biotina-oxPTH (aa1-38) marcado con <sup>125</sup>I-estreptavidina. Después de la fusión celular y la selección de HAT, hibridomas seleccionados se cribaron de la misma manera, a saber, para la unión a PTH humana oxidada (aa 1-84) pero no a la PTH humana (1-84).

Para la caracterización definitiva de la especificidad de los anticuerpos monoclonales (MAB) y para la identificación de un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de conformación común a los péptidos oxidados de la hPTH (1-38), es decir, común a todas las formas de hPTH oxidada (aa 1-38) de forma independiente al estado de oxidación y la quiralidad (Met-R-O, Met-S-O y MetO<sub>2</sub> en las posiciones 8, 18 y ambas), el anticuerpo fue inmovilizado en Sepharose 4B activada con CNBr (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia). Una columna (MobiSpinColumn, MoBiTec, Göttingen, Alemania) se rellenoó con una alícuota de cien µL de la suspensión viscosa y equilibrada con tampón PBS, pH 7,4. Luego 2,5 µg de hPTH oxidada liofilizada (1-84) se disolvieron en 300 µL de tampón de equilibrado y se aplicaron sobre la columna. La columna se incubó de extremo a extremo durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó con 300 µL de tampón de equilibrado, seguido de 3 lavados con 300 µL de agua destilada, y luego se eluyó 2 veces con 200 µL de tampón de elución (TFA al 0,1%). Flujo continuo, fracciones de lavado (tampón de equilibrado y agua), así como eluido de la columna se recogieron por separado, se liofilizaron y se analizaron mediante nanoLC-ESI-FT-MS. Se seleccionó un anticuerpo monoclonal ("oxPTH-ConforMAB") que reconoce un epítipo de conformación presente en todas las formas de hPTH oxidada (aa 1-84) y fragmentos del mismo para su posterior análisis y caracterización. El oxPTH-ConforMAB seleccionado reconoció específicamente con alta afinidad todas las formas de fragmentos de hPTH oxidados y mal plegados, pero no PTH no oxidada (aa 1-84).

## EJEMPLO 3

*Pacientes*

Se realizó un seguimiento prospectivo del estudio de cohortes en 340 pacientes en hemodiálisis durante 5 años. Nuestros criterios de elegibilidad incluyeron a todos los pacientes prevalentes adultos en tratamiento de hemodiálisis debido a enfermedad renal crónica en estado terminal estadio 5 y presencia de consentimiento informado. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente y la aprobación ética del comité de ética local. Se obtuvieron los datos sobre el periodo de diálisis en la inclusión y la duración de hemodiálisis por sesión. Todos los pacientes fueron dializados rutinariamente durante 4 a 5 horas tres veces a la semana usando membranas biocompatibles sin reutilización del dializador. Las tasas de flujo sanguíneo fueron de 250 a 300 mL/min, las tasas de flujo de dializado fueron 500 mL/min, la conductividad del dializado fue de 135 mS. La presión sanguínea se midió antes de la diálisis. Se tomaron muestras de sangre en prediálisis al ingreso al estudio. La sangre se recogió inmediatamente antes del inicio de la sesión de hemodiálisis.

Los datos clínicos y de laboratorio incluyeron edad, sexo, medicamentos (uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueadores β, bloqueadores de los canales de calcio y eritropoyetina), índice de masa corporal (calculado como el peso corporal dividido por la altura al cuadrado), presión sanguínea sistólica y

diastólica, albúmina sérica, colesterol sérico, triglicéridos séricos, urea sérica, creatinina sérica, calcio sérico, potasio sérico y fosfato sérico.

5 170 pacientes (50%) murieron durante el tiempo de seguimiento de 5 años. Las causas de muerte se clasificaron como cardiovasculares, incluida la muerte súbita, la infección o el cáncer.

#### EJEMPLO 4

#### 10 *Análisis estadístico de las mediciones de n-oxPTH*

15 La Figura 1 muestra la distribución de las concentraciones de n-oxPTH en 340 pacientes en hemodiálisis (224 hombres y 116 mujeres) con una mediana de edad de 66 años (IQR, 56 a 75 años), una mediana de tiempo desde el inicio de diálisis (duración de diálisis) de 266 días (IQR, 31 a 1209 días), y una dosis mediana de diálisis (kt/V) de 1,2 (IQR 1,1 a 1,3). La causa de enfermedad renal crónica fue nefrosclerosis en 113 casos (33%), nefropatía diabética en 107 casos (31%), nefritis glomerular crónica en 29 casos (9%), enfermedad renal poliquística en 9 casos (3%) y otros/desconocido en 82 casos (24%). La concentración mediana de n-oxPTH fue de 5,9 ng/L (IQR, 2,4 a 14,0 ng/L). Las concentraciones de n-oxPTH no fueron diferentes en hombres y mujeres (5,9 ng/L; IQR, 2,4 a 14,2 ng/L; n = 224: frente a 5,5 ng/L; IQR, 2,4 a 14,0 ng/L; n = 116; p = 0,915).

20 La Tabla 1 resume la distribución de casos y variables de laboratorio estratificado por terciles de n-oxPTH. Los límites de tercil fueron concentraciones de n-oxPTH de 3,3 ng/L y 10,3 ng/L, respectivamente. Los pacientes en hemodiálisis del tercil superior n-oxPTH tenían mayor peso, índice de masa corporal, y urea más alta, un indicador de la ingesta de proteínas dietéticas, creatinina más alta, un indicador de la masa muscular, y signos típicos de metabolismo mineral alterado, es decir, calcio sérico más bajo y mayores concentraciones de fósforo sérico. Además, las concentraciones de fósforo sérico se correlacionaron directamente (Spearman r = 0,245; p < 0,001) con respecto a las concentraciones de n-oxPTH, y las concentraciones de calcio sérico lo fueron inversamente (Spearman r = -0,160; p = 0,004). Por otro lado, la edad (Spearman r = -0,099) y la duración de la diálisis (Spearman r = 0,098) no se correlacionaron significativamente con n-oxPTH.

**Tabla 1**

*Características clínicas y bioquímicas basales de pacientes en hemodiálisis por terciles de la hormona paratiroidea intacta no oxidada (n-oxPTH)*

35

CARACTERÍSTICA	TERCIL 1	TERCIL 2	TERCIL 3	VALOR P
Edad (años)	68 (57-76)	67 (56-77)	65 (54-72)	0,125
Sexo (% femenino)	35%	35%	35%	0,928
Duración (días)	241 (31-1233)	263 (58-913)	425 (31-1507)	0,429
Diabetes mellitus (%)	31%	46%	38%	0,076
Fumador (%)	31%	30%	35%	0,732
Peso (kg)	70 (60,0-80)	70 (60-78)	75 (67-85)	0,003
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	24,3 (21,1-26,5)	24,1 (21,9-26,3)	25,6 (22,9-29,4)	0,003
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	134 (110-146)	133 (112-149)	138 (118-153)	0,326
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	69 (58-80)	67 (57-80)	72 (60-83)	0,185
Hemoglobina (mg/dL)	10,0 (9,1-11,4)	10,2 (9,3-11,2)	10,5 (8,9-11,8)	0,589
Leucocitos (10 <sup>9</sup> /L)	8,0 (5,9-10,1)	8,4 (6,0-10,8)	8,1 (6,3-11,3)	0,895
Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)	218 (178-272)	221 (167-275)	230 (174-296)	0,846
Albúmina sérica (g/L)	3,3 (2,9-3,7)	3,3 (2,8-3,6)	3,4 (2,9-3,8)	0,371
Colesterol sérico (mg/dL)	152 (129-186)	151 (125-190)	150 (126-189)	0,963
Urea (mg/dL)	69 (47-93)	57 (48-89)	77 (57-102)	0,026
Creatinina sérica (mg/dL)	5,5 (3,8-7,9)	5,6 (3,7-7,9)	7,1 (5,8-9,3)	0,001
Potasio sérico (mmol/L)	4,8 (4,0-5,3)	4,5 (4,1-5,2)	4,9 (4,2-5,3)	0,238
Calcio sérico (mmol/L)	2,30 (2,19-2,50)	2,19 (2,06-2,37)	2,22 (2,06-2,40)	0,001
Fósforo sérico (mg/dL)	1,55 (1,07-1,91)	1,43 (1,21-1,90)	1,90 (1,36-2,30)	0,001
Dosis de diálisis (ktV)	1,2 (1,1-1,3)	1,2 (1,1-1,4)	1,2 (1,0-1,4)	0,227
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (%)	26%	26%	26%	0,992

Bloqueadores $\beta$ (%)	60%	60%	60%	0,996
Bloqueadores de los canales de calcio (%)	28%	34%	29%	0,583
Terapia con eritropoyetina (%)	57%	53%	42%	0,064

a) Las variables continuas se dan como medianas y rango intercuartílico. Entre grupos, comparaciones se hicieron usando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para variables continuas y usando la prueba de Chi cuadrado para variables categóricas.

5

b) El índice de masa corporal se calculó como el peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado.

170 pacientes (50%) murieron durante el tiempo de seguimiento de 5 años. La muerte se produjo a una mediana de 217 días (IQR, 67 a 564 días) después del ingreso al estudio. Las causas de muerte fueron enfermedades cardiovasculares en 102 pacientes (60%), infecciones en 39 pacientes (23%), cáncer en 19 pacientes (11%) y otras razones desconocidas en 10 (6%). Los niveles de mediana de n-oxPTH fueron más altos en los supervivientes (7,2 ng/L; IQR 3,1 a 16,5 ng/L) en comparación con los pacientes fallecidos (5,0 ng/L; IQR, 1,9 a 11,1 ng/L;  $p = 0,002$  mediante la prueba de Mann Whitney). El análisis de supervivencia mostró una mayor supervivencia en el tercil n-oxPTH superior en comparación con el tercil n-oxPTH inferior (Chi cuadrado 14,30;  $p = 0,0008$  mediante la prueba de log-rank). La mediana de supervivencia fue de 1702 días en el tercil n-oxPTH superior, mientras que solo fue de 453 días en el tercil n-oxPTH inferior (Figura 2).

10

15

Se realizaron análisis de supervivencia multivariados ajustados utilizando el modelo de regresión de riesgos proporcionales con selección reversa de variables, usando  $p < 0,05$  para la retención variable. Las variables probadas fueron plasma n-oxPTH, categoría iPTH, dosis de diálisis, duración de diálisis, edad, hemoglobina y fósforo sérico. La categoría iPTH, la dosis de diálisis, la duración de diálisis y el fósforo sérico no mostraron efectos significativos. Esta regresión de Cox multivariable ajustada mostró que esa mayor edad aumentó las probabilidades de muerte, mientras que una mayor n-oxPTH redujo las probabilidades de muerte (Tabla 2).

20

25

**Tabla 2**

*Regresión de Cox multivariable ajustada mostrando las probabilidades de muerte de pacientes en hemodiálisis.*

VARIABLE	B(SE)	RELACIÓN DE PROBABILIDADES	(95% CI)
Tercil n-oxPTH	-0,276 (0,103)	0,759	(0,620 to 0,929)
Edad	0,068 (0,008)	1,070	(1,053 to 1,087)
Hemoglobina	-0,169 (0,055)	0,844	(0,756 to 0,940)

Se realizaron análisis de supervivencia multivariados ajustados utilizando el modelo de regresión de riesgos proporcionales con selección reversa de variables, usando  $P < 0,05$  para la retención variable. Las variables probadas fueron plasma n-oxPTH, categoría iPTH, dosis de diálisis, recolección de diálisis, edad, hemoglobina, fósforo sérico. La categoría iPTH, la dosis de diálisis, la recolección de diálisis y el fósforo sérico no mostraron efectos significativos.

35

Además, un modelo que analiza solo pacientes con iPTH por encima de la parte superior del rango normal (70 ng/L) reveló que la mortalidad en este subgrupo dependía de la oxidación proteica de iPTH pero no en n-oxPTH biológicamente activo. En otras palabras, n-oxPTH no tenía impacto en la mortalidad de pacientes con niveles de iPTH por encima del rango normal superior, mientras que, en estos pacientes, la iPTH se asoció con la mortalidad por todas las causas (Figura 3).

40

Utilizando otro modelo, estratificamos *a priori* los niveles de iPTH en cinco categorías de acuerdo a directrices internacionales, que representan muy bajo ( $< 20$  ng/L), bajo (20 a 65 ng/L), mediano (65 a 150 ng/L), objetivo (150 a 300 ng/L), y alto ( $> 300$  ng/L). El análisis de supervivencia mostró un patrón en forma de J, es decir, los pacientes con niveles objetivo de iPTH tuvieron una mediana de supervivencia más larga en comparación con las otras categorías (Chi cuadrado 16,35;  $P = 0,0026$  mediante prueba de log-rank). Este patrón en forma de J entre los niveles de iPTH y el desenlace es característico para los pacientes en hemodiálisis, lo que confirma que nuestros datos se obtuvieron de una cohorte de hemodiálisis típica (Figura 4).

45

**EJEMPLO 5**

50

*Análisis estadístico*

Las variables continuas se expresaron como mediana con rango intercuartil (IQR) y se compararon con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn cuando fuera apropiado. Las asociaciones entre variables se probaron utilizando la correlación no paramétrica de Spearman. Los análisis de tiempo hasta el evento se realizaron utilizando el método de Kaplan-Meier. La comparación de las curvas de supervivencia se realizó con la prueba de log-rank (Mantel-Cox). Las variables categóricas se expresaron como proporciones y se compararon con la prueba de Chi cuadrado. Se realizaron análisis de supervivencia multivariados ajustados utilizando el modelo de regresión de riesgos proporcionales. Los modelos multivariados se construyeron con selección regresiva de variables, utilizando  $p < 0,05$  para la retención variable. 45 pacientes (13%) se sometió a un trasplante de riñón durante el seguimiento. Estos pacientes fueron controlados el día del trasplante. Todas las pruebas de hipótesis fueron bilaterales, con significancia estadística definida como tal que tenga un valor de  $p$  de menos de 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) o SPSS 25 para Windows (versión 15, SPSS, Chicago, IL).

## RESUMEN

La presente aplicación examina el equilibrio dinámico en plasma o suero entre la PTH intacta secretada (iPTH), la eliminación de la actividad de PTH por oxidación y el parámetro resultante correspondiente a la PTH intacta no oxidada (n-oxPTH) en la supervivencia de pacientes en hemodiálisis. Las mediciones de n-oxPTH se realizaron con inmunoensayo de PTH después de purificar la muestra de las cadenas peptídicas oxidadas de PTH. El presente estudio indica que los pacientes en hemodiálisis en el tercil n-oxPTH superior disfrutaron de una mayor supervivencia en comparación con los pacientes en el tercil n-oxPTH inferior. Después del ajuste multivariable se redujo el tercil n-oxPTH más alto, mientras que la edad más alta aumentó las probabilidades de muerte de pacientes en hemodiálisis. La validez de la presente descripción se ve reforzada por el hecho de que la estratificación de los datos de iPTH de nuestra cohorte en cinco categorías según las directrices internacionales revela que los pacientes en hemodiálisis con niveles objetivo de iPTH de acuerdo a las directrices tenían una mediana de supervivencia más larga en comparación con las otras categorías. Este patrón de supervivencia en forma de J confirma los resultados derivados de datos iPTH de un amplio metaanálisis de mortalidad. El análisis de un subgrupo de pacientes en hemodiálisis que muestran iPTH por encima del rango normal superior (70 ng/L) separó claramente los efectos positivos de los péptidos de iPTH secretados del efecto negativo de péptidos de PTH sometidos a oxidación. El aumento de la mortalidad en este subgrupo dependió de la oxidación proteica de iPTH.

Un nefrólogo familiarizado con este tema apreciará que este análisis debe extenderse a pacientes en diálisis con concentraciones muy altas de iPTH, que significa pacientes de los que se considera que tienen hiperparatiroidismo secundario de acuerdo a los estándares de diagnóstico clásicos. El número de pacientes con semejantes concentraciones altas de iPTH en nuestra cohorte de estudio fue demasiado bajo para permitir aseveraciones claras. Los análisis de cohortes de pacientes en diálisis con hiperparatiroidismo secundario según se investigó en la cohorte del estudio EVOLVE pueden ayudar a abordar esta importante cuestión clínica.

Las directrices actuales recomiendan medir los niveles de PTH de manera rutinaria y obtener niveles objetivo de PTH (es decir, de 150 a 300 ng/L), porque varios estudios observaron un peor resultado con niveles de PTH superiores a 300 ng/L. En contraste, encontramos que pacientes en hemodiálisis en el tercil superior, es decir, que tienen niveles de n-oxPTH por encima de 10,3 ng/L, disfrutaron de una mayor supervivencia. Este hallazgo es sorprendente, pero sin desear estar ligado a cualquier teoría, puede haber una explicación. La cohorte de diálisis estudiada solo comprendió algunos pacientes con concentraciones de iPTH superiores a 300 ng/L, por lo que las respuestas para esta subcohorte requieren un grupo de estudio más amplio. La eliminación de iPTH del plasma o suero ocurre principalmente en el hígado y el riñón, pero hay evidencia de que la vida media de la iPTH oxidada excede la de la iPTH no oxidada. En esencia, la tasa de eliminación metabólica de iPTH no oxidada es del rango de aproximadamente 21,6 ml/min por kg de peso corporal, mientras que la tasa de aclaramiento metabólico del iPTH oxidado es de solamente 8,8 ml/min por kg de peso corporal (Neuman WF et al. *The metabolism of labeled parathyroid hormone. V. Collected biological studies.* Calcif Tissue Res 1975;18:271-287; Hruska KA et al en *Peripheral metabolism of intact parathyroid hormone. Role of liver and kidney and the effect of chronic renal failure*, J Clin Invest. 1981;67:885-892). Por lo tanto, altos niveles de iPTH en la literatura del estado de la técnica pueden representar meramente grandes cantidades de cadenas peptídicas oxidadas de PTH y que los pacientes sufrían de un mayor estrés oxidativo. Además, el debilitamiento puede tener un impacto en la PTH intacta inmunorreactiva medible. El debilitamiento está, además, asociado con la inflamación y el estrés oxidativo. Por lo tanto, el impacto por el debilitamiento en las mediciones de PTH intactas del estado de la técnica está probablemente relacionado con la presencia de péptidos de PTH oxidados. Sin embargo, esto debe ser probado en futuros estudios.

La extirpación de las glándulas paratiroideas en modelos animales de uremia, así como en pacientes que sufren de hiperparatiroidismo, demuestra que altas concentraciones de PTH contribuyen a la calcificación vascular, por lo tanto, a la morbilidad y mortalidad cardiovascular en la uremia. Al mismo tiempo, también es cierto que el estrés oxidativo también está relacionado con la mortalidad cardiovascular en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal. Nuestros datos indican que la curva de supervivencia en forma de J para iPTH representa una superposición de dos procesos biológicos diferentes. Los ensayos inmunoreactivos convencionales de iPTH, ni diferencian entre esas formas de PTH ni apreciaron el tamaño del estrés oxidativo en la medición de PTH. No había

- 5 conocimiento sobre cómo usar la información referente al estatus n-oxPTH con respecto a la terapia y la medicación de pacientes con ERC. En conclusión, el poder predictivo de iPTH y n-oxPTH inmunorreactivo para la mortalidad por todas las causas difiere sustancialmente. Por lo tanto, las decisiones clínicas basadas en cualquier concentración de péptido PTH inmunorreactivo en plasma o suero puede ser engañosa en pacientes con enfermedad renal terminal si no se tiene en cuenta la eliminación oxidativa de la PTH.

## REIVINDICACIONES

1. Método de monitorización *in vitro* y evaluación de la necesidad de una medicación que interfiere con la regulación del nivel de la hormona paratiroidea en un paciente renal sujeto a estrés oxidativo durante el tratamiento de hemodiálisis que comprende los pasos de
  - purificar una muestra de plasma o suero de dicho paciente renal de péptidos de PTH humana oxidados en la metionina 8 o 18 o ambas o en el triptófano 23 mediante el contacto de dicha muestra con un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos oxidados de la PTH humana, pero dicho anticuerpo no se une a la PTH humana no oxidada (1-84) y fragmentos de la misma;
  - determinar la cantidad de péptidos inmunoreactivos de PTH humana (iPTH) en dicha muestra mediante un inmunoensayo basado en anticuerpos contra PTH humana (1-84) y fragmentos de la misma que contienen al menos los dominios responsables para la unión al receptor y la activación de la cAMP-ciclasa situados entre los aminoácidos 3 a 34 de la secuencia de PTH humana; y
  - obtener un valor de estatus PTH (valor n-oxPTH) para dicho paciente renal que incluye la tasa de péptidos inmunoreactivos de PTH humana (iPTH) secretados por células de la glándula paratiroides en la circulación y la tasa a la que los péptidos inmunoreactivos de PTH humana (iPTH) se oxidan por el estrés oxidativo sufrido por dicho paciente; y
  - comparar el valor de estatus de PTH (n-oxPTH) con un valor de referencia en el que la morbilidad y todas las causas de mortalidad es bajo para determinar la necesidad de una medicación con respecto a una regulación del valor del estatus de PTH o para la suplementación del paciente con hormona paratiroidea humana o fragmentos activos de la misma o ambos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es de un paciente renal aquejado de enfermedad renal crónica (ERC) o uremia o hiperparatiroidismo.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende el paso de contactar dicha muestra de plasma o suero con una fase sólida que tiene unido un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de los péptidos oxidados de PTH humana pero dicho anticuerpo no se une a la PTH humana (1-84) no oxidada y fragmentos de la misma.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende una determinación cuantitativa de dichos péptidos unidos por dicho anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos oxidados de PTH humana.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación de péptidos inmunoreactivos de PTH humana (iPTH) comprende el uso de un inmunoensayo de doble posición en el que un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une a un dominio implicado en la unión del péptido PTH a los receptores de PTH 1 y 2.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación de péptidos inmunoreactivos de PTH humana (iPTH) comprende el uso de un inmunoensayo de doble posición en el que un anticuerpo se une a un determinante antigénico que comprende los aminoácidos valina y serina del extremo aminoterminal de la PTH humana y el otro anticuerpo se une en la región entre los aminoácidos 14 a 34 de la secuencia de PTH humana.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la determinación de PTH humana inmunoreactiva (iPTH) comprende el uso de un inmunoensayo de doble posición en el que un anticuerpo se une a un determinante antigénico que comprende los aminoácidos 1 a 13 de la secuencia de PTH humana.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo específico para péptidos oxidados de PTH humana se une a un epítipo tridimensional entre los aminoácidos 3 a 34 de la secuencia de la PTH humana que no comprende las metioninas oxidadas en la posición 8 y/o 18.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende una determinación de la proporción de PTH humana inmunoreactiva (iPTH) y la cantidad de péptidos de PTH unidos por dicho

anticuerpo que reconoce y se une selectivamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos oxidados de PTH humana.

- 5
10. Uso de un kit en el método de la reivindicación 1, el kit comprendiendo una fase sólida con un anticuerpo que reconoce y se une selectivamente a un epítipo tridimensional localizado entre los aminoácidos 3 a 34 de péptidos oxidados de PTH humana, y una combinación de anticuerpos para determinar la PTH humana intacta inmunorreactiva (iPTH) en plasma o suero que comprende un anticuerpo monoclonal que se une a un dominio implicado en la unión del péptido de PTH a los receptores de PTH 1 y 2.

Fig. 1

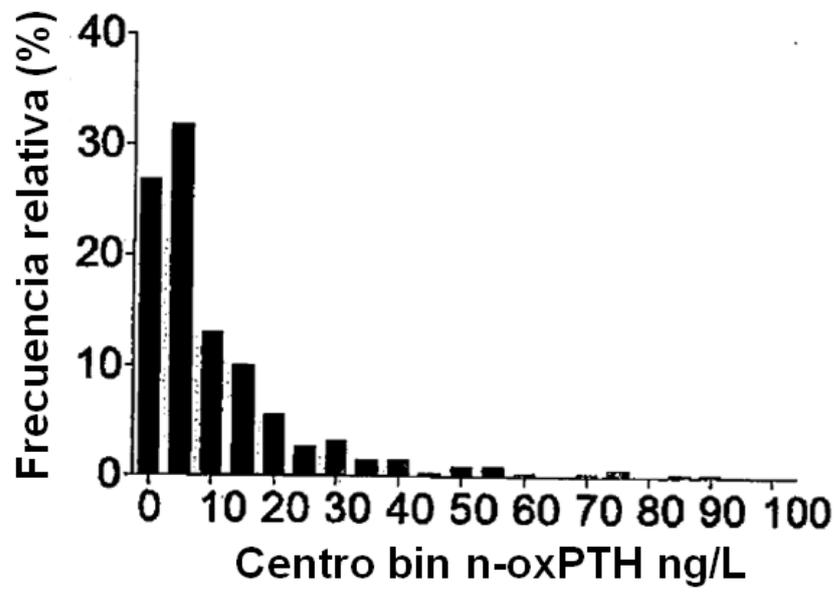


Fig. 2

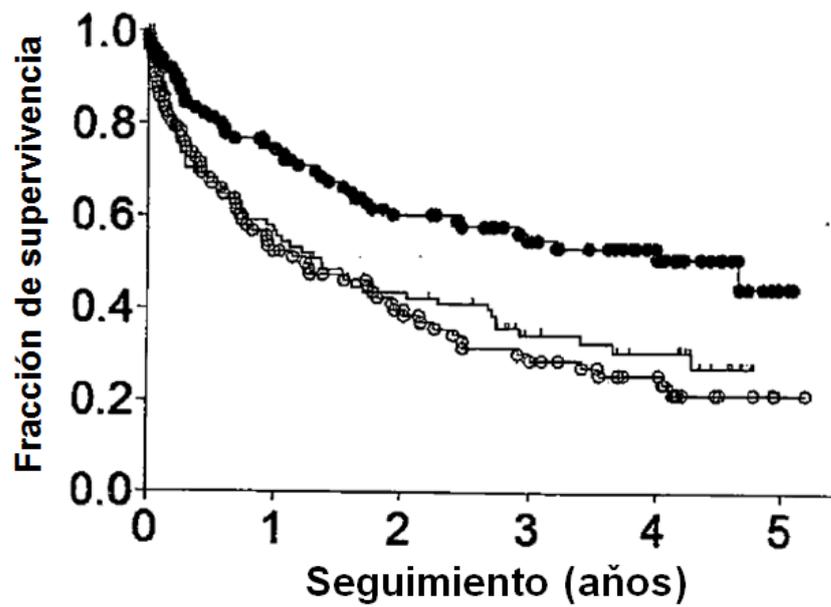


Fig. 3

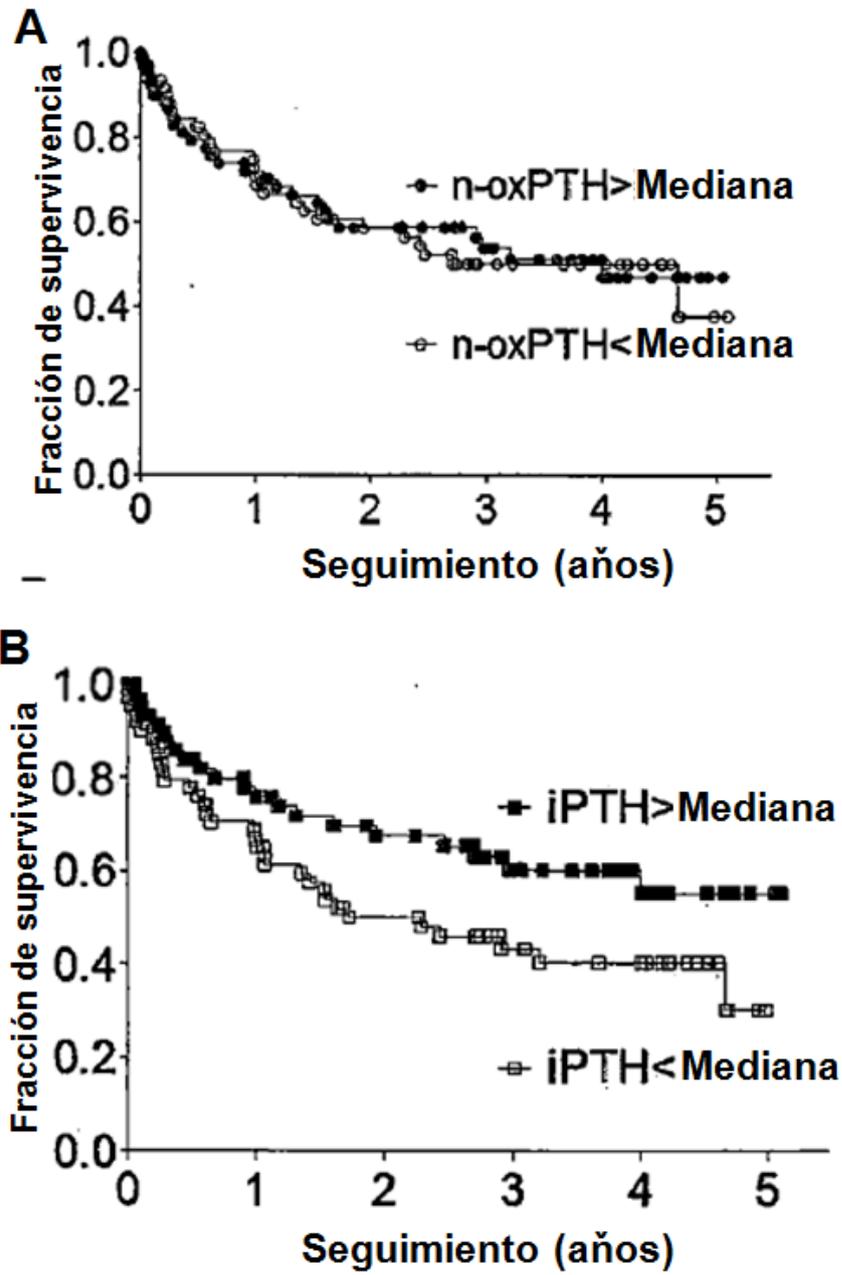


Fig. 4

