

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 099**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2014 PCT/EP2014/072339**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055825**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2014 E 14789218 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3058374**

54 Título: **Procedimiento de diagnóstico de hiperaldosteronismo primario**

30 Prioridad:

18.10.2013 EP 13189386
28.01.2014 EP 14152763

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2020

73 Titular/es:

ATTOQUANT DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)
Campus-Vienna-Biocenter 5
1030 Vienna , AT

72 Inventor/es:

POGLITSCH, MARKO;
SCHWAGER, CORNELIA;
VAN OYEN, DUNJA y
LEITNER, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 745 099 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

Procedimiento de diagnóstico de hiperaldosteronismo primario

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario (PHA). En particular, la presente invención se refiere al uso de un nuevo parámetro de diagnóstico que se compone de la proporción entre el nivel de angiotensina II (Ang II o Ang 1-8), en particular el nivel de Ang II en estado de equilibrio estable y el nivel de aldosterona en una muestra biológica, como, por ejemplo, plasma. La proporción de los dos parámetros medidos se utiliza para diagnosticar el PHA en pacientes y tiene claras ventajas sobre los procedimientos de diagnóstico utilizados actualmente.

10 Antecedentes de la invención

El PHA, también conocido como aldosteronismo primario, se caracteriza porque la sobreproducción de la hormona mineralocorticoide, aldosterona, no es el resultado de una secreción excesiva de renina. La aldosterona provoca un aumento en la retención de sodio y agua y la excreción de potasio en los riñones, lo que conduce a la hipertensión arterial. El diagnóstico de PHA en pacientes con hipertensión arterial es un desafío analítico importante debido a la interferencia de las pruebas actualmente disponibles con tratamientos antihipertensivos y la insuficiente capacidad de diagnóstico de los ensayos empleados. El PHA tiene muchas causas, incluida la hiperplasia suprarrenal y el carcinoma suprarrenal. Cuando se produce debido a un adenoma suprarrenal productor de aldosterona solitario, que es un tipo de tumor benigno y es la causa más frecuente de PHA (66 % de los casos), se conoce como síndrome de Conn. Otras causas de PHA incluyen hiperplasia suprarrenal idiopática bilateral (30 % de los casos), hiperplasia suprarrenal primaria (unilateral) (2 % de los casos), carcinoma adrenocortical productor de aldosterona (<1 % de los casos), hiperaldosteronismo familiar (FH), aldosteronismo remediable de glucocorticoide (FH tipo I, <1 % de los casos), FH tipo II (<2 % de los casos) y adenoma o carcinoma ectópico productor de aldosterona (<0,1 % de los casos) (Williams textbook of endocrinology. (11th ed.) Philadelphia: Saunders/Elsevier. 2008. ISBN 978-1-4160-2911-3.). Sin embargo, debido a las limitadas capacidades de diagnóstico, los datos sobre la prevalencia de las subformas de PHA son divergentes. Estudios recientes indican que la prevalencia de aldosteronismo debido a hiperplasia suprarrenal idiopática bilateral (IAH) es más alta de lo que se había creído anteriormente, hasta en un 75 % de los casos de PHA. Una vez diagnosticado, el PHA generalmente puede curarse mediante una intervención quirúrgica.

La medición de la aldosterona sola no se considera adecuada para diagnosticar el hiperaldosteronismo primario. Se sabe que, a diferencia de la medición de los niveles de aldosterona sola, la especificidad y la sensibilidad diagnóstica para detectar PHA se pueden mejorar midiendo la actividad o concentración de renina y la aldosterona y combinando los dos parámetros en una proporción aritmética, la proporción de aldosterona a renina (ARR), que actualmente se utiliza para el diagnóstico de PHA (Tiu S, Choi C, Shek C, Ng Y, Chan F, Ng C, Kong A (2005). "The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling". J Clin Endocrinol Metab 90 (1): 8. doi:10.1210/jc.2004-1149. PMID 15483077). La proporción de aldosterona a renina (ARR) es la concentración de masa de aldosterona dividida por la actividad de renina y/o la concentración de renina en el plasma sanguíneo. La proporción de aldosterona a renina se puede dar en ng/dl por ng/(ml·h), es decir, nanogramos por decilitro de aldosterona por nanogramo por (mililitro x hora) de renina. Además, se puede dar en pmol/litro por µg/(litro·h), donde la aldosterona se da en concentraciones molares. El primero se puede convertir al segundo multiplicando por 27,6. Además, el valor inverso se da ocasionalmente, es decir, la proporción de renina a aldosterona, cuyo valor es el inverso multiplicativo de la proporción de aldosterona a renina. Las proporciones entre la aldosterona y la renina también se pueden calcular utilizando otras unidades de concentración (unidad de masa por ml y/o cantidad de unidad por ml) para cualquiera de los dos parámetros, lo que da como resultado valores absolutos diferentes para la proporción mientras se contiene la información similar. La concentración de renina utilizada para el cálculo de la ARR también se puede dar en µg UIE/ml, que es una unidad que se usa con frecuencia en el diagnóstico clínico y que también refleja la concentración de renina.

El corte (o umbral) de los individuos normales de aquellos con hiperaldosteronismo primario en base a la ARR se ve significativamente afectado por las condiciones de las pruebas, como la posición del cuerpo y la hora del día. En promedio, se ha estimado que un corte de la ARR de 23,6 ng/dl por ng/(ml·h), expresado en unidades alternativas como 650 pmol/litro por µg/(litro·h), tiene una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 94 % (Tiu et al, citado anteriormente). Un valor de la ARR en un individuo que es más alto que el corte se utiliza en la técnica anterior para indicar hiperaldosteronismo primario.

Si se utiliza la proporción inversa (es decir, renina a aldosterona), se considera que un valor inferior al corte indica hiperaldosteronismo primario.

Sin embargo, el amplio intervalo de la ARR que muestran los pacientes que padecen PHA no permite una discriminación clara y confiable entre la hipertensión esencial y el PHA, lo que conduce a resultados de diagnóstico y decisiones de tratamiento falsos positivos y/o falsos negativos. Se requieren medicamentos

especiales y requisitos dietéticos junto con un sofisticado protocolo de prueba que incluya infusión de solución salina para mejorar el poder de diagnóstico del ARR en un procedimiento de prueba confirmatorio posterior al cribado de la ARR.

5 Las sociedades endocrinas sugieren que se realice una evaluación de PHA en grupos de pacientes en riesgo, incluidos pacientes con la etapa 2 (> 160-179/100-109 mm Hg), etapa 3 (> 180/110 mm Hg) de la Joint National Commission o hipertensión resistente a fármacos; hipertensión e hipocalcemia espontánea o inducida por diuréticos; hipertensión con incidentaloma suprarrenal; o hipertensión y antecedentes familiares de hipertensión de inicio temprano o accidente cerebrovascular a una edad temprana (< 40 años). Los familiares hipertensos de primer grado de pacientes con PHA también muestran un mayor riesgo de PHA. De acuerdo con las pautas clínicas, la forma estándar de diagnóstico de PHA hasta la decisión de la cirugía de curación se considera laboriosa y representa varios riesgos para los pacientes.

15 La lógica detrás de la medición de la ARR para diagnosticar el PHA se encuentra detrás de las vías fisiológicas responsables de la secreción de aldosterona en la corteza suprarrenal. La renina es una enzima clave del sistema renina angiotensina (RAS) que produce angiotensina I a partir de angiotensinógeno, que se convierte en Ang II a través de otras peptidasas. Se sabe que la Ang II se enlaza a los receptores AT1 (AT1R) que conducen a la secreción de aldosterona, lo que resulta en sus efectos fisiológicos en el riñón y otros tejidos. Bajo condiciones saludables, el RAS regula los niveles plasmáticos de aldosterona. Bajo la condición de PHA, la producción de aldosterona se vuelve parcialmente independiente del RAS, lo que significa que la renina ya no es necesaria para mantener la producción de aldosterona. La medición de la ARR intenta hacer uso de esta desregulación de renina y aldosterona. Los pacientes con PHA generalmente tienen niveles elevados de aldosterona en plasma. Por lo tanto, algunos investigadores requieren niveles elevados de aldosterona además de una ARR elevada para una prueba de cribado positiva para PHA (generalmente aldosterona > 15 ng/dl).

25 El proceso de diagnóstico para PHA se inicia con una prueba ARR de detección de casos en los grupos de pacientes especificados anteriormente (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9): 3266-3281). En caso de que este primer valor de ARR medido exceda un cierto umbral, el paciente se somete a pruebas adicionales para asegurar la validez de los resultados obtenidos. Es de destacar que el valor exacto para el umbral de la ARR aún se discute en la literatura, debido a la frecuente aparición de falsos negativos y positivos.

30 Si bien hay pocos fármacos antihipertensivos que se cree que solo tienen efectos limitados sobre el valor de la ARR medida, se sabe que muchos fármacos antihipertensivos interfieren fuertemente con las pruebas de la ARR. La principal causa de interferencia está representada por el fuerte impacto de estos fármacos en la concentración de renina y la actividad de renina, lo que lleva a resultados de la ARR alterados. Como consecuencia, una fase de aclarado de los fármacos antihipertensivos suele ser necesaria antes de las pruebas de confirmación, lo que representa un riesgo considerable para los pacientes hipertensos. La prueba de confirmación en sí misma consiste en un procedimiento clínico que requiere mucho tiempo y es costoso y está destinado a reducir los niveles de renina de los pacientes en respuesta a los desafíos osmóticos o farmacológicos en combinación con las pruebas de ARR antes y después del procedimiento.

40 Una prueba de confirmación de PHA muy común es una prueba de infusión de solución salina, donde se administran dos litros de solución salina al 0,9 % al paciente en el transcurso de 4 horas. El aumento de volumen debe resultar en una disminución de la actividad y concentración de la renina. Se cree que los niveles de aldosterona posteriores a la prueba inferiores a 50 pg/ml indican la ausencia de PHA, mientras que los niveles de aldosterona posteriores a la prueba superiores a 100 pg/ml se interpretan como un signo probable de PHA. Los valores entre 50 pg/ml y 100 pg/ml se consideran indeterminados (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9):3266-3281).

45 Las pruebas de confirmación positiva desencadenan pruebas clínicas adicionales que incluyen técnicas de imágenes suprarrenales, como por ejemplo, tomografía computarizada (CT) y muestreo de vena suprarrenal (AVS) para determinar la fuente de producción de aldosterona excesiva e independiente de renina. Una vez que se clasifica el subtipo, se puede realizar una adrenalectomía unilateral o un tratamiento con antagonistas de los receptores de mineralocorticoides.

50 La etapa clave en el proceso de diagnóstico es la detección de casos en pacientes hipertensos de alto riesgo. La ARR como prueba de detección de casos podría fácilmente mostrar resultados falsos positivos y negativos, ya que entre los pacientes hipertensos se demostró que la distribución de valores de ARR en los pacientes con PHA se superpone con la distribución de valores de ARR en pacientes sin PHA (Gary L. Schwartz and Stephen T. Turner; Clinical Chemistry 51, No. 2, 2005), que podría fácilmente conducir a un tratamiento equivocado innecesario de los pacientes. En caso de falsos positivos, estos tratamientos equivocados pueden dar lugar a complicaciones severas como una fase de aclarado de fármacos de varias semanas en un paciente hipertenso, a pesar de que tome al menos tres fármacos antihipertensivos, representan un riesgo significativo de eventos cardiovasculares fatales durante este período de presión sanguínea no controlada. Además de eso, las pruebas de confirmación generalmente requieren hospitalización y monitoreo constante por parte de los médicos, consumiendo tiempo y dinero del paciente y del sistema de atención médica. En caso de un resultado falso

negativo, el paciente con PHA continuará viviendo con hipertensión resistente, que tiene un pronóstico fatal debido a un riesgo fuertemente aumentado de eventos cardiovasculares potencialmente mortales como accidentes cerebrovasculares o ataques cardíacos.

5 La presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario en un sujeto, que comprende obtener una muestra biológica del sujeto, medir el nivel de aldosterona y el nivel de Ang II, y calcular su proporción (proporción de aldosterona a angiotensina II, AA2R). Dicho procedimiento tiene ventajas sustanciales con respecto a los procedimientos de diagnóstico en base a la ARR utilizada actualmente descrita anteriormente.

Breve descripción de la invención

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario en un sujeto, que comprende medir el nivel de aldosterona y el nivel de Ang II, y calcular la proporción de estos (proporción de aldosterona a angiotensina II, AA2R), en una muestra. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para diagnosticar PHA, que comprende un estándar de Ang II, un estándar de aldosterona, y opcionalmente además comprende un manual y/o componentes adicionales.

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Panel izquierdo: proporción Ang II a PRA en 14 voluntarios sanos. Panel derecho: proporción Ang II a PRC en plasma de voluntarios sanos sin tratar y sanos tratados con inhibidores de ACE.

20 **Figura 2:** Panel izquierdo: proporción Ang II a PRA en voluntarios sanos no tratados y tratados con inhibidor de ACE (n= 14). Panel intermedio: PRA en voluntarios sanos no tratados y tratados con inhibidor de ACE (n= 14). Panel derecho: proporción Ang II a PRC en voluntarios sanos no tratados y tratados con inhibidor de ACE (n= 4).

25 **Figura 3:** Comparación de ARR y AA2R para un paciente sin PHA y un paciente con PHA confirmado, antes y 4 horas después de la prueba de confirmación de infusión salina. Panel izquierdo: los valores se dan como porcentaje de la señal preinfusión para el paciente sin PHA. Panel derecho: se muestra la comparación de los factores de discriminación específicos de ARR y AA2R entre pacientes sin PHA y pacientes con PHA para cada punto de tiempo.

30 **Figura 4:** Impacto de los tratamientos antihipertensivos en la concentración activa de renina. Se recogieron muestras de plasma de voluntarios sanos antes (predosis) y 4 horas después de la administración de una dosis única de un inhibidor de ACE (izquierda), inhibidor de renina (medio) o bloqueador del receptor de angiotensina (ARB, derecha). Los valores medios de 5 voluntarios sanos +/- SEM se muestran en los gráficos.

35 **Figura 5:** Comparación del impacto de la administración de bloqueadores RAS en la ARR (panel superior) y la AA2R (panel inferior). Se recogieron muestras de plasma de voluntarios sanos antes (predosis) y 4 horas después de la administración de una dosis única de un inhibidor de ACE (izquierda), inhibidor de la renina (medio) o bloqueador del receptor de angiotensina (ARB, derecha). Se midieron la concentración de aldosterona en plasma, la concentración de angiotensina II en equilibrio y la concentración de renina activa y se calculó la ARR y la AA2R para cada muestra. Para el cálculo de la ARR, las concentraciones de aldosterona en ng/l se dividieron por la concentración de renina activa en plasma en ng/l. Para el cálculo de la AA2R, las concentraciones de aldosterona en pmol/l se dividieron por las concentraciones de Ang II en pmol/l. Los valores medios de 5 voluntarios sanos +/- SEM se muestran en los gráficos.

Descripción detallada de la invención

45 Los procedimientos disponibles actualmente para el diagnóstico de PHA en pacientes hacen uso de la correlación entre la actividad de renina en plasma o la concentración de renina en plasma y la concentración de aldosterona en plasma. Se demostró que el cálculo de la proporción de aldosterona a renina (ARR) permite una discriminación parcial entre pacientes sin PHA y pacientes con PHA. Sin embargo, los resultados falsos positivos al igual que los falsos negativos son frecuentes. Se sabe que la renina es responsable de la producción de angiotensina I (Ang I), que sirve como un sustrato para la formación de Ang II por otras enzimas proteolíticas como la chymasa o la enzima convertidora de angiotensina (ACE). La Ang II es la principal hormona efectora del RAS y es responsable principalmente de las funciones fisiológicas mediadas por el RAS, incluida la regulación del balance de fluidos y la presión arterial. Es ampliamente aceptado que la actividad y concentración de renina sirven como marcadores sustitutos de la actividad del RAS (Swales JD y Thurston HJ; Clin Endocrinol Metab. 1977 Jul; 45(1):159-63), que se utiliza para apoyar el uso de la ARR como marcador de diagnóstico para el PHA.

55 Sorprendentemente, resultó que los niveles de Ang II medidos en muestras de plasma equilibradas (es decir, los niveles de Ang II medidos de acuerdo con el procedimiento de estado de equilibrio estable (SSE) como se describe a continuación, también llamados niveles de equilibrio Ang II) muestran una pobre correlación con la

actividad de renina en plasma (PRA) y la concentración de renina en plasma (PRC), indicada por una gran variabilidad en las proporciones de Ang II a PRA y Ang II a PRC cuando se comparan sujetos individuales (Figura 1, panel izquierdo y derecho). Se extrajo sangre de 14 voluntarios sanos sin tratamiento antihipertensivo. Se aisló el plasma mediante centrifugación y se midieron los niveles de equilibrio de Ang II en muestras estabilizadas después de 60 minutos de equilibrado de plasma a 37 °C. Los procedimientos para medir los niveles de RAS en estado de equilibrio estable se describen más en el documento WO 2013/182237. Para la medición de PRA, se sometieron muestras similares a un ensayo de formación de angiotensina I como se describe (Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569)]. La angiotensina I se cuantificó por espectrometría de masas y la actividad de renina en plasma se calculó en (ng Ang I/ml)/h. La gráfica muestra la proporción de equilibrio de actividad de Ang II a renina. Las proporciones de los 14 donantes estaban en un intervalo entre 48 y 1.022 [pg Ang II/ml]/[(ng Ang I/ml)/h], que es 11% y 232% de la media de todos los 14 donantes.

En un segundo enfoque, la concentración plasmática de renina (PRC) se determinó en 4 voluntarios no tratados y 4 voluntarios tratados con inhibidor de ACE utilizando un ensayo de renina en base a anticuerpos (Diasorin) disponible en el mercado y aplicado clínicamente. Los niveles de equilibrio de Ang II se midieron por espectrometría de masas después de 60 minutos de equilibrado de plasma a 37 °C y estabilización de la muestra. La proporción de equilibrio de Ang II a PRC se calculó y se muestra en el gráfico para pacientes no tratados y tratados con inhibidores de ACE. La unidad de la proporción mostrada es [pg Ang II/ml]/[μgUIE/ml Renina]. En todas las cohortes de pacientes investigadas, se encontró que la proporción de Ang II a PRA y de Ang II a PRC era altamente variable. Además, el tratamiento con inhibidores de ACE resultó en una reducción significativa de las proporciones de Ang II a PRC (Figura 2, panel derecho) y Ang II a PRA (Figura 2, panel izquierdo).

En conclusión, una concentración y/o actividad de renina similar resulta en diferentes concentraciones de Ang II en donantes individuales, lo que indica que la actividad y/o concentración de renina es un marcador pobre para la actividad fisiológica del RAS. Como consecuencia, la ARR muestra de manera insuficiente el nivel de aldosterona relacionado con la actividad del RAS, lo que pone un signo de interrogación sobre la idoneidad de la ARR como herramienta de cribado para el PHA. Estas consideraciones explican aún más las limitaciones en la detección de casos de PHA a través de mediciones de ARR, que es propensa a resultados falsos positivos y falsos negativos y altamente dependiente de los antecedentes terapéuticos de los pacientes (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9):3266-3281.; and Gary L. Schwartz and Stephen T. Turner; Clinical Chemistry 51, No. 2, 2005).

Además, las proporciones de Ang II a PRA y Ang II a PRC se ven significativamente afectadas por el tratamiento con inhibidores de ACE (Figura 1, panel derecho; Figura 2, panel izquierdo y derecho). Sorprendentemente, mientras que el tratamiento con inhibidores de ACE aumenta la actividad y la concentración de renina, la proporción de Ang II a renina se redujo significativamente (Figura 2, panel central).

Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la pobre correlación de la concentración de renina y la actividad con los niveles de Ang II en ausencia y presencia de un fármaco antihipertensivo como un inhibidor de ACE podría causar el poder predictivo limitado de la ARR para el diagnóstico de PHA.

En contraste, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario en un sujeto, que comprende medir el nivel de aldosterona y el nivel de angiotensina II (Ang II) en una muestra biológica del sujeto, y calcular la proporción entre el nivel de aldosterona y el nivel de Ang II (proporción de aldosterona a angiotensina II, AA2R). En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario en un sujeto, que comprende obtener una muestra biológica del sujeto, medir el nivel de aldosterona y el nivel de angiotensina II, y combinarlos en una proporción aritmética (proporción de aldosterona a angiotensina II, AA2R).

El término "nivel", como se usa en la presente memoria, se refiere a la concentración de una sustancia (por ejemplo, un componente del RAS, como renina, Ang II, aldosterona, etc.) en una muestra biológica, como por ejemplo sangre, plasma o suero. Dicha concentración puede administrarse en mol/l, mmol/ml, μg UIE/ml, ng/ml, pg/ml o cualquier otra unidad de concentración.

En una realización, una AA2R alta indica hiperaldosteronismo primario y una AA2R baja indica que no hay hiperaldosteronismo primario. En una realización, una AA2R alta en comparación con la AA2R de uno o más sujetos sin PHA confirmado indica hiperaldosteronismo primario y/o una AA2R baja en comparación con la AA2R de uno o más sujetos con PHA confirmado no indica hiperaldosteronismo primario. En una realización, una AA2R similar a la AA2R de uno o más pacientes confirmados sin PHA indica que no hay hiperaldosteronismo primario y/o un AA2R similar al AA2R de uno o más pacientes con PHA confirmado indica un hiperaldosteronismo primario. En una realización, el término "similar" como se usa anteriormente significará que la diferencia entre las proporciones respectivas (es decir, las AA2Rs) es inferior al 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 %.

La AA2R resultó mostrar una proporción mejorada de positivo a negativo, como lo muestra la comparación de un paciente hipertenso sin PHA con un paciente hipertenso con PHA antes y después de una prueba de infusión

5 salina (SIT) (Ejemplo 1, Figura 3). En el panel izquierdo, para cada prueba individual (ARR y AA2R), los resultados de la prueba se relacionaron con el valor pre SIT y se expresaron en porcentaje. El paciente con PHA fue claramente positivo de acuerdo con los criterios de la prueba de ARR, con niveles de aldosterona en plasma en la prueba de infusión salina (SIT) pre y post de 471 pg/ml y 548 pg/ml respectivamente, y una ARR pre y post resultante (proporción aldosterona a PRC) de 588,8 y 421,5 respectivamente (PRC pre SIT: 0,8 µg UIE/ml; PRC post SIT: 1,3 µg UIE/ml). El paciente sin PHA mostró una concentración de aldosterona en plasma pre y post SIT de 190 pg/ml y 64 pg/ml respectivamente con una ARR pre y post SIT de 19,2 y 16,4 respectivamente, lo que es claramente negativo de acuerdo con los criterios de la prueba (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9):3266 -3281). Además, los factores de discriminación específicos del ensayo se calcularon como una medida del rendimiento diagnóstico (o potencia de diagnóstico) y se compararon para ARR y AA2R (Figura 3, panel derecho). El factor de discriminación es útil para comparar diferentes pruebas midiendo dos muestras idénticas con ambas pruebas, una de las cuales es una muestra verdadera negativa y otra es una verdadera positiva. El factor de discriminación representa la proporción entre la señal positiva verdadera y la señal negativa verdadera. Un factor de discriminación alto significa que la diferencia entre una muestra verdadera negativa y una verdadera positiva es alta, lo que implica un mejor rendimiento diagnóstico en comparación con una prueba con un factor de discriminación menor obtenido para muestras similares. Cuando se relaciona el valor de ARR pre SIT del paciente con PHA confirmado con el valor de ARR pre SIT del paciente sin PHA confirmado, se obtiene un factor de discriminación de 30,7 entre el paciente sin PHA confirmado (verdadero negativo) y el paciente con PHA confirmado (verdadero positivo). El factor de discriminación post SIT entre el paciente sin PHA y el paciente con PHA fue de 25,5 cuando se analizó mediante ARR.

25 Sorprendentemente, el análisis por la AA2R de las muestras idénticas de los mismos dos pacientes reveló un factor de discriminación de 150,8 para muestras pre SIT y un factor de discriminación entre el paciente sin PHA y el paciente con PHA de 325,0 para muestras post SIT (Figura 3, panel derecho). Llegamos a la conclusión de que el uso de la AA2R en lugar de la ARR aumenta considerablemente el factor entre señales positivas y negativas, lo que lleva a un rendimiento de diagnóstico notablemente mayor.

30 En una realización de la presente invención, la proporción de valores entre uno o más sujetos con PHA positivo confirmado y uno o más sujetos con PHA negativo confirmado (es decir, el factor de discriminación) en base a la AA2R es mayor que entre los mismos conjuntos de datos en base a la ARR. Por consiguiente, en una realización, la proporción entre la AA2R de uno o más sujetos con PHA positivo confirmado y la AA2R de uno o más sujetos con PHA negativo confirmado es mayor que la proporción del mismo conjunto de datos en base a la ARR. En otras palabras, la proporción entre la AA2R de uno o más sujetos con PHA positivo confirmado y la AA2R de uno o más sujetos con PHA negativo confirmado es mayor que la proporción entre la ARR del mismo uno o más sujetos con PHA positivo confirmado y la ARR del mismo uno o más sujetos con PHA negativo confirmado.

35 El término "factor de discriminación" como se usa en la presente memoria puede referirse a la proporción del parámetro de diagnóstico (por ejemplo, ARR o AA2R) de uno o más sujetos con PHA confirmado (o sujetos PHA positivos confirmados) al parámetro de diagnóstico (por ejemplo, ARR o AA2R) de uno o más sujetos confirmados sin PHA (o sujetos PHA negativos confirmados), o con uno o más valores medios de dichos parámetros, por ejemplo, un valor medio de la ARR o AA2R de una cohorte de sujetos con PHA confirmado y un valor medio de la ARR o AA2R de una cohorte de sujetos sin PHA confirmado. En consecuencia, el factor de discriminación es la proporción de la ARR de uno o más sujetos con PHA confirmado a la ARR de uno o más sujetos sin PHA confirmado, o la AA2R de uno o más sujetos con PHA confirmado a la AA2R de uno o más sujetos sin PHA confirmado. El factor de discriminación es una medida del rendimiento de diagnóstico (o potencia de diagnóstico) del parámetro o prueba de diagnóstico correspondiente. Cuanto mayor es la proporción, mayor es el poder de diagnóstico y menor es el riesgo de resultados falsos positivos y/o falsos negativos. El término "sujeto con PHA confirmado" se refiere a un sujeto que padece PHA y que ha sido diagnosticado como positivo ya sea por los procedimientos convencionales (por ejemplo, una primera prueba de cribado que mide la ARR, y al menos una prueba de confirmación que mide la ARR una segunda o tercera o más veces, opcionalmente antes de y después de una SIT), o haber sido diagnosticado como positivo por los procedimientos de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, la medición de AA2R que no requiere ninguna prueba de confirmación), y/o incluso puede haber sido confirmado por cirugía y/o técnicas de imagen (por ejemplo, CT y/o muestreo de venas suprarrenales). El término "sujeto sin PHA confirmado" se refiere a un sujeto que no padece PHA y que ha sido diagnosticado como negativo por los procedimientos convencionales (por ejemplo, una primera prueba de cribado que mide la ARR, y opcionalmente una o más pruebas de confirmación que miden la ARR una segunda o tercera o más veces, opcionalmente antes y después de una SIT), o que hayan sido diagnosticados como negativos por los procedimientos de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, la medición de la AA2R no requiere ninguna prueba de confirmación u otras medidas de confirmación, como por ejemplo, técnicas de imagen). Se pueden usar una o más muestras de uno o más "sujetos sin PHA confirmados" o de uno o más "sujetos con PHA confirmado" como controles normales en los procedimientos de la invención para comparación con la muestra bajo investigación, es decir, una o más muestras de uno o más "sujetos sin PHA confirmado" pueden usarse como control negativo, y/o una o más muestras de uno o más "sujetos con PHA confirmado" pueden usarse como control positivo. Por ejemplo, una AA2R alta en comparación con la AA2R de uno o más sujetos sin PHA confirmado indica hiperaldosteronismo primario, y/o una AA2R baja en comparación

con la AA2R de uno o más sujetos con PHA confirmado no indica hiperaldosteronismo primario. Si se usan dos o más muestras como control negativo y/o positivo, se puede determinar el valor medio (es decir, la media aritmética) o la mediana de las muestras correspondientes. En base a tales muestras de control o valores de estos, se puede determinar un umbral de discriminación (o corte), por encima del cual se diagnostica al sujeto como positivo para el PHA y por debajo del cual se diagnostica al sujeto como negativo para el PHA. Dicho umbral también se puede determinar en función de la distribución del valor de AA2R en una cohorte de pacientes que comprende sujetos positivos para el PHA y negativos para el PHA. El umbral se puede determinar por separado para diferentes cohortes de pacientes (por ejemplo, se pueden determinar diferentes umbrales para grupos de pacientes tratados con diferentes fármacos antihipertensivos). Cualquiera de los parámetros descritos anteriormente que se pueden usar para determinar un umbral (o nivel de comparación) se puede usar solo o en combinación con uno o más de los otros parámetros para obtener un umbral final.

Aunque los procedimientos de la presente invención pueden no requerir ninguna prueba de confirmación, como ya se indicó anteriormente, la prueba de confirmación puede aun así realizarse (por ejemplo, si lo desea un médico o un paciente). Además, los procedimientos de la invención en sí pueden usarse como pruebas de confirmación, es decir, aplicados después de que se haya realizado una primera prueba de cribado con procedimientos clásicos en base a la ARR.

En una realización, el factor de discriminación para uno o más pares de datos o conjuntos de datos dados (por ejemplo, uno o más sujetos sospechosos o con PHA confirmado en comparación con uno o más sujetos sospechosos o sin PHA confirmado, o el valor medio de una cohorte de sujetos sospechosos o con PHA confirmado en comparación con el valor medio de una cohorte de sujetos sospechosos o sin PHA confirmado) según lo determinado en función de la AA2R es mayor que el factor de discriminación para los mismos pares de datos o conjuntos de datos según lo determinado en base a la ARR, en particular en base a la ARR de una prueba de cribado (es decir, la primera medición de la ARR, y/o la ARR antes de cualquier prueba de confirmación), y/o en base a la ARR de una prueba de confirmación (es decir, la segunda medición o más de la ARR, y/o la ARR después de cualquier prueba de cribado). En una realización, el factor de discriminación para uno o más pares de datos o conjuntos de datos dados (por ejemplo, uno o más sujetos sospechosos o con PHA confirmado en comparación con uno o más sujetos sospechosos o sin PHA confirmado, o el valor medio de una cohorte de sujetos sospechosos o con PHA confirmado en comparación con el valor medio de una cohorte de sujetos sospechosos o sin PHA confirmado) según lo determinado en base a la AA2R es mayor que, en particular significativamente mayor que, el factor de discriminación para los mismos pares de datos o conjuntos de datos según lo determinado en base a la ARR, en particular en base a la ARR de una prueba de cribado (es decir, la primera medición de la ARR, y/o la ARR antes de cualquier prueba de confirmación), y/o en base a la ARR de una prueba de confirmación (es decir, la segunda medición o más de la ARR, y/o la ARR después de cualquier prueba de cribado). En una realización, el factor de discriminación para uno o más pares de datos o conjuntos de datos dados (por ejemplo, uno o más sujetos sospechosos o con PHA confirmado en comparación con uno o más sujetos sospechosos o sin PHA confirmado, o el valor medio de una cohorte de sujetos sospechosos o con PHA confirmado en comparación con el valor medio de una cohorte de sujetos sospechosos o sin PHA confirmado) según lo determinado en base a la AA2R es al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 % o 500 % más alto que el factor de discriminación para los mismos pares de datos o conjuntos de datos determinados en base a la ARR, en particular en base a la ARR de una prueba de cribado (es decir, la primera medición de la ARR, y/o la ARR antes de cualquier prueba de confirmación), y/o en base a la ARR de una prueba de confirmación (es decir, la segunda medición o más de la ARR, y/o la ARR después de cualquier prueba de cribado). En una realización, el factor de discriminación para uno o más pares de datos o conjuntos de datos dados (por ejemplo, uno o más sujetos con PHA sospechoso o confirmado en comparación con uno o más sujetos sin PHA sospechoso o confirmado, o el valor medio de una cohorte de sujetos con PHA sospechoso o confirmado en comparación con el valor medio de una cohorte de sujetos sin PHA sospechoso o confirmado) según lo determinado en base a la AA2R es al menos 50 por ciento, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces o diez veces más alto que el factor de discriminación para los mismos pares de datos o conjuntos de datos determinados en base a la ARR, en particular en base a la ARR de una prueba de cribado (es decir, la primera medición de la ARR, y/o la ARR antes de cualquier prueba de confirmación), y/o en base a la ARR de una prueba de confirmación (es decir, la segunda medición o más de la ARR, y/o la ARR después de cualquier prueba de cribado).

El término "sujeto sospechoso de PHA " se refiere a un sujeto sospechoso de sufrir PHA y que aún no ha sido diagnosticado como positivo por los procedimientos convencionales (por ejemplo, una primera prueba de cribado que mide la ARR, y al menos una prueba de confirmación que mide la ARR por una segunda o una tercera o más veces, opcionalmente antes y después de una SIT), o que no ha sido diagnosticado como positivo por los procedimientos de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, la medición de la AA2R que no requiere ninguna prueba de confirmación), o que ha sido diagnosticado previamente pero sin resultado claro y/o el diagnóstico previo que requiere confirmación adicional. El término "sujeto sin PHA sospechoso" se refiere a un sujeto sospechoso de no sufrir PHA y que aún no ha sido diagnosticado como negativo por los procedimientos convencionales (por ejemplo, una primera prueba de cribado que mide la ARR, y opcionalmente una o más pruebas de confirmación que miden la ARR una segunda o tercera o más veces, opcionalmente antes y después

de una SIT), o que aún no se ha diagnosticado como negativo por los procedimientos de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, la medición de la AA2R que no requiere ninguna prueba de confirmación), o que se ha diagnosticado previamente pero sin un resultado claro, y/o el diagnóstico previo que requiere confirmación adicional.

5 Una cohorte de pacientes podría estar sujeta a criterios de preselección (por ejemplo, presión arterial mínima, nivel mínimo de aldosterona, cierto tratamiento farmacológico), comparación previa de selectividad y/o sensibilidad entre las AA2R y ARR. Por ejemplo, algunos investigadores que realizan pruebas de cribado en base a la ARR requieren un nivel mínimo de aldosterona de 15 ng/dl para obtener un resultado de prueba de cribado positivo, lo que podría resultar en una sensibilidad y/o especificidad alteradas en comparación con una
10 cohorte de pacientes no preseleccionados.

En una realización, la especificidad del procedimiento de la invención en una cohorte de pacientes definida es igual o más alta que la especificidad de los procedimientos de la ARR clásicos en la misma cohorte de pacientes, en particular en base a la ARR de una prueba de cribado (es decir, la primera medición de la ARR y/o la ARR antes de cualquier prueba de confirmación). La especificidad se puede dar en porcentaje, en la que

15 especificidad [%] = $\frac{\text{número de verdaderos negativos}}{\text{número de verdaderos negativos} + \text{número de falsos positivos}} \cdot 100$
(número de verdaderos negativos + número de falsos positivos)

En una realización, la especificidad del procedimiento de la invención es más alta que la especificidad de los procedimientos de la ARR clásicos, en particular significativamente más alta que los procedimientos de la ARR clásicos. En una realización, la especificidad es más alta que el 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. En
20 una realización, la especificidad del procedimiento es al menos 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. En una realización, la especificidad del procedimiento es del 100%.

En una realización, la sensibilidad del procedimiento de la invención en una cohorte de pacientes definida es igual o más alta que la sensibilidad de los procedimientos de la ARR clásicos en la misma cohorte de pacientes, en particular en base a la ARR de una prueba de cribado (es decir, la primera medición de la ARR, y/o la ARR antes de cualquier prueba de confirmación).
25

La sensibilidad se puede dar en porcentaje, en la que

sensibilidad [%] = $\frac{\text{número de verdaderos positivos}}{\text{número de verdaderos positivos} + \text{número de falsos negativos}} \cdot 100$
(número de verdaderos positivos + número de falsos negativos)

30 En una realización, la sensibilidad del procedimiento de la invención es más alta que la sensibilidad de los procedimientos de la ARR clásicos, en particular significativamente más alta que los procedimientos de la ARR clásicos. En una realización, la sensibilidad del procedimiento es al menos 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. En una realización, la sensibilidad del procedimiento es más alto que el 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. En una realización, la sensibilidad del procedimiento es del 100 %.

35 En una realización, al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de todos los sujetos con PHA confirmados tienen una AA2R más alta que al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de todos los sujetos sin PHA confirmados. Con los procedimientos y kits de la presente invención, es posible diferenciar claramente entre sujetos con PHA y sin PHA, ya que el grado de superposición de la distribución del valor de la AA2R de los sujetos con PHA y sin PHA es sustancialmente más bajo que la superposición de los valores de la ARR de sujetos con PHA y sin PHA. En una realización, la superposición es
40 10 % o menos, 9 % o menos, 8 % o menos, 7 % o menos, 6 % o menos, 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos.

Los sujetos sospechosos de sufrir de PHA generalmente están bajo tratamiento antihipertensivo. Por ejemplo, el sujeto ha recibido y/o recibe una o más composiciones farmacéuticas (también denominadas en la presente memoria como fármacos) o tratamientos, en particular composiciones farmacéuticas antihipertensivas y/o
45 tratamientos, en el momento en que se realiza el diagnóstico de PHA. La interferencia de la prueba de la ARR con los tratamientos antihipertensivos representa un obstáculo bien conocido para el diagnóstico de PHA en pacientes hipertensos. Los pacientes hipertensos resistentes representan un grupo de alto riesgo para el PHA y por definición, se tratan con al menos tres fármacos antihipertensivos simultáneamente, mientras aún sufren de presión arterial patológicamente elevada. Se sabe que muchos de los fármacos antihipertensivos utilizados
50 clínicamente tienen un impacto en los niveles de renina y aldosterona, mientras que la renina generalmente se ve más afectada que la aldosterona, lo que da como resultado cambios impredecibles en los resultados de las pruebas de la ARR que conducen a decisiones de diagnóstico falsas negativas y falsas positivas (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9):3266-3281).

55 Un grupo ampliamente utilizado de agentes antihipertensivos en uso clínico es el grupo de bloqueadores de RAS. Los bloqueadores de RAS interfieren con el RAS para reducir el nivel de Ang II (por ejemplo, inhibidores de

renina, inhibidores de ACE) o bloquear la acción de Ang II en el receptor AT₁ (por ejemplo, los bloqueadores del receptor de angiotensina, ARBs). Además de los bloqueadores de RAS, los activadores de RAS pueden usarse como agentes antihipertensivos. Por ejemplo, ACE2 se puede administrar para tratar la hipertensión, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO2004/000367 y WO2008/151347.

- 5 Los fármacos y/o tratamientos que afectan, especialmente aumentan, la actividad de renina y/o la concentración de renina afectan, especialmente disminuyen, la ARR. El poder de diagnóstico de la ARR disminuye con dichos fármacos y/o tratamientos. El tratamiento de 5 voluntarios sanos con dosis únicas de diferentes agentes antihipertensivos (Ejemplo 2) dio como resultado un aumento altamente significativo de 3 a 10 veces en la concentración de renina plasmática activa (Figura 4). Estos cambios inducidos por fármacos en la concentración activa de renina afectaron profundamente la ARR en estos individuos.

10 La administración de una dosis única de un inhibidor de ACE (10 mg de Enalapril), un inhibidor de la renina (150 mg de Aliskiren) o un ARB (50 mg de Losartan) resultó en una disminución muy significativa y profunda de la ARR (Figura 5, panel superior), lo que resulta en una potencia diagnóstica fuertemente reducida de la ARR en presencia de estos fármacos antihipertensivos. Los valores bajos de ARR causados por tratamientos antihipertensivos conducen a resultados falsos negativos. En contraste con la ARR, la mayoría de los fármacos antihipertensivos no afectaron significativamente la AA2R, a excepción de los ARBs (Figura 5, panel inferior). La comparación de la AA2R antes y después de la administración del fármaco reveló que ni la administración de un inhibidor de ACE ni la administración de un inhibidor de la renina produjeron cambios significativos en la AA2R, mientras que la ARR disminuyó significativamente en respuesta al tratamiento farmacológico. El ARB, que impide el enlace de Ang II a los receptores AT₁, lo que resulta en la acumulación de Ang II junto con un aumento en la concentración de renina activa, fue el único fármaco que resultó en una disminución significativa de la AA2R, mientras que la ARR se ve significativamente afectada por cada fármaco antihipertensivo probado.

15 La actividad de la renina y/o la concentración de renina se controla a través de múltiples mecanismos reguladores fisiológicos. Cualquier fármaco que interfiera con dicho mecanismo regulatorio podría afectar la actividad y/o la concentración de la renina. Por ejemplo, los diuréticos son una clase común de fármacos antihipertensivos que reducen la presión arterial al mejorar la diuresis. La diuresis mejorada da como resultado un aumento en la actividad y/o concentración de renina. Por lo tanto, el tratamiento de sujetos con diuréticos disminuye la ARR. Ejemplos de diuréticos en uso clínico son furosemida, torsemida, hidroclorotiazida, azetazolamida, metazolamida, eplerenona, espironolactona, amilorida y triamtereno.

- 20 Los efectos sobre la actividad y/o concentración de la renina también pueden estar mediados indirectamente por un bloqueo de una o más etapas en la cascada de RAS que están corriente abajo de la renina.

25 Por ejemplo, el bloqueo de la conversión de Ang I a Ang II por inhibidores de ACE es relevante para la ARR ya que da como resultado un aumento de la actividad y/o concentración de renina a través de un mecanismo de compensación fisiológico. Este efecto sobre la renina y, por lo tanto, la ARR también puede ser el caso de otros fármacos que interfieren con las reacciones enzimáticas del RAS, como la conversión de Ang I a Ang 2-10 por aminopeptidasa, y/o la conversión de Ang I a Ang 1-9 por ACE2. En consecuencia, uno o más fármacos o tratamientos que afectan a una o más de estas etapas de RAS deteriora o deterioran el diagnóstico en base a la ARR y conduce o conducen a resultados falsos positivos y/o falsos negativos. Por lo tanto, un sujeto a ser diagnosticado con procedimientos en base a la ARR no puede ser tratado con uno o más de estos fármacos o tratamientos.

30 A diferencia de los procedimientos en base a la ARR, los procedimientos de la invención también se pueden aplicar a sujetos que son tratados con uno o más de dichos fármacos que afectan a los RAS y/o tratamientos como se describe anteriormente, por ejemplo, con uno o más fármacos o tratamientos que resultan en una disminución del poder de diagnóstico de la ARR (como, por ejemplo, los inhibidores de ACE, ACE2, los inhibidores de renina, etc.). En particular, los procedimientos de la invención pueden aplicarse también a sujetos que son tratados con agentes que afectan (especialmente aumentando) la actividad y/o concentración de renina, es decir, los procedimientos de la invención son independientes de tales tratamientos que afectan (especialmente aumentan) la actividad de la renina y/o concentración. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR, y dicho tratamiento no disminuye el poder de diagnóstico de la AA2R ni disminuye el poder de diagnóstico de la AA2R en menor medida.

35 En una realización, el sujeto está bajo tratamiento, por ejemplo, ha recibido y/o recibe una o más composiciones o tratamientos farmacéuticos. En una realización, el sujeto está bajo dicho tratamiento en el momento del diagnóstico, por ejemplo, en el momento en que se mide la AA2R y/o se toma la muestra del sujeto. En una realización, dicho tratamiento es un tratamiento de interferencia de RAS, por ejemplo, la administración de una o más composiciones farmacéuticas que interfieren con RAS o que afectan a RAS. En una realización, el sujeto está bajo tratamiento antihipertensivo.

Sin embargo, en una realización, el sujeto no se trata con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que afectan el enlace fisiológico entre Ang II y la secreción de aldosterona (en particular, la señalización a través de los receptores AT1), como por ejemplo, ARBs. Por consiguiente, en una realización de la invención, el sujeto no se trata con bloqueadores del receptor de angiotensina (ARBs). En una realización, el procedimiento es independiente de uno o más tratamientos antihipertensivos del sujeto, excepto para el tratamiento con bloqueadores de los receptores de angiotensina (ARBs).

En una realización, el sujeto está bajo tratamiento antihipertensivo, a excepción de los ARBs. En una realización, el sujeto está bajo tratamiento antihipertensivo, excepto para composiciones farmacéuticas que afectan el nivel de aldosterona, pero sin excluir los efectos mediados por Ang II y/o renina sobre el nivel de aldosterona. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que aumentan la concentración y/o actividad de renina. En una realización, el sujeto está bajo tratamiento antihipertensivo, excepto para los ARBs y excepto por las composiciones farmacéuticas que afectan el nivel de aldosterona, pero sin excluir las composiciones que causan efectos mediados por Ang II sobre el nivel de aldosterona.

En una realización, los términos "se trata/se tratan con" (o "no se trata/no se tratan con") o "está bajo tratamiento con" como se usa en la presente memoria se refieren a los sujetos (o pacientes) que se tratan con (o no se tratan con) uno o más fármacos y/o tratamientos respectivos en el momento del diagnóstico, por ejemplo, en el momento en que se mide la AA2R y/o se toma la muestra del sujeto. Dicho diagnóstico puede ser un diagnóstico de una sola etapa, como por ejemplo, la medición de la AA2R en un punto en el tiempo, o el primer diagnóstico o cualquier otro diagnóstico adicional, incluida la prueba de confirmación. En una realización adicional, el sujeto se trata (o no se trata) con dichos fármacos o tratamientos en el momento del diagnóstico y durante un cierto período de tiempo antes del diagnóstico. En una realización, dicho período de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y/o 14 días.

El término "afecta" como se usa en la presente memoria significará que un parámetro, como por ejemplo, una actividad, nivel o proporción es (o no es) afectada, alterada o cambiada, por ejemplo, aumentada o disminuida. En particular, el parámetro está (o no está) sustancialmente afectado. En una realización, el parámetro es (o no es) afectado más del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. En una realización, si un parámetro es afectado (o no es afectado) más o menos que otro, el parámetro es (o no es) al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % más afectado que el otro. En una realización, el parámetro es (o no es) incrementado más del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. En una realización, el parámetro es (o no es) disminuido más del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

Otra clase de fármacos o tratamientos antihipertensivos que afectan la ARR y/o la AA2R está representada por composiciones farmacéuticas o tratamientos que afectan (en particular, sustancialmente y/o afectan directamente) el nivel de aldosterona, por ejemplo, composiciones farmacéuticas que afectan la biosíntesis, la semivida y/o la degradación de aldosterona, lo que lleva a niveles de aldosterona plasmática alterados. Por lo tanto, dichos fármacos o tratamientos que alteran la ARR y/o la AA2R al afectar el nivel de aldosterona plasmático también pueden excluirse del tratamiento del sujeto a ser diagnosticado con los procedimientos de la invención. En particular, los fármacos o tratamientos que afectan la AA2R de manera que el poder de diagnóstico de la AA2R bajo dicho tratamiento es menor en comparación con el poder de diagnóstico de la ARR bajo el mismo tratamiento deben excluirse de los procedimientos de acuerdo con la invención. Por consiguiente, en una realización, el sujeto puede tratarse con uno o más fármacos o tratamientos antihipertensivos como se describe anteriormente, con la excepción de ARBs y/o fármacos que afectan la biosíntesis, la semivida y/o la degradación de la aldosterona.

Dado que los fármacos o tratamientos que afectan a Ang II (por ejemplo, inhibidores de ACE) pueden afectar el nivel de aldosterona, para evitar dudas, debe aclararse que dichos fármacos o tratamientos que disminuyen la aldosterona al disminuir el nivel de Ang II y, por lo tanto, disminuyen su acción sobre los receptores AT1 y resultan en una disminución de la secreción de aldosterona, no necesitan ser excluidos.

Por ejemplo, la administración terapéutica del inhibidor de ACE, Captopril conduce a una disminución en los niveles de Ang II, mientras que los niveles de renina aumentan. Por lo tanto, el tratamiento con inhibidores de ACE produce una disminución de los niveles de aldosterona y un aumento en la actividad y/o concentración de renina. Dichos tratamientos no disminuirían sustancialmente o incluso aumentarían el poder de diagnóstico de la AA2R, pero disminuirían el poder de diagnóstico de la ARR y, por lo tanto, no necesitan ser excluidos de los procedimientos de la invención y son de hecho realizaciones preferidas de la invención.

Solo aquellas composiciones y/o tratamientos farmacéuticos pueden excluirse de los procedimientos de acuerdo con la invención, que afectan o alteran la AA2R de manera que el poder de diagnóstico de la AA2R es menor en comparación con el poder de diagnóstico de la ARR bajo condiciones de tratamiento similares (o de una manera que el factor de discriminación para un par de datos determinado probado por la AA2R sea más bajo que el factor de discriminación para el par de datos similar probado por la ARR).

5 Por consiguiente, en una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR, pero no el poder de diagnóstico de la AA2R, o el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR y/o de la AA2R, pero de una manera que el poder de diagnóstico de la AA2R es aún mayor que el poder de diagnóstico de la ARR, lo que puede estar indicado por un factor de discriminación, especificidad y/o selectividad más alto.

10 El sujeto puede o no someterse a uno o más tratamientos, incluidos los tratamientos antihipertensivos (es decir, el sujeto puede estar bajo tratamiento, por ejemplo, tratamiento antihipertensivo) en el momento del diagnóstico y/o antes del diagnóstico. En caso de que el poder de diagnóstico bajo un tratamiento de este tipo sea menor para la AA2R en comparación con la ARR, es posible que el sujeto no se someta a uno o más de estos tratamientos, o que dichos tratamientos deban suspenderse y seguirse con una fase de aclarado de dicho tratamiento antes del diagnóstico en base a la AA2R, como se describe adicionalmente en la presente memoria.

15 En una realización, el sujeto a diagnosticar con los procedimientos de la invención puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos, excepto para aquellos tratamientos que disminuyen el poder de diagnóstico de la AA2R de modo que sea menor en comparación con el poder de diagnóstico de la ARR bajo el tratamiento similar. En una realización, el procedimiento es independiente de uno o más tratamientos (especialmente independientes de uno o más tratamientos antihipertensivos) del sujeto, excepto para el tratamiento con bloqueadores del receptor de angiotensina (ARBs) y/o fármacos que afectan la biosíntesis, semivida, y/o degradación de aldosterona.

20 En una realización, el sujeto a diagnosticar con los procedimientos de la invención puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que no afectan a la aldosterona y/o Ang II. En una realización, el sujeto puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que no afectan significativamente a la aldosterona y/o Ang II. En una realización, el sujeto puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que no afectan la AA2R. En una realización, el sujeto puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que no afectan significativamente la AA2R.

25 En una realización, el sujeto puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que afectan a uno o más de los parámetros dados de la AA2R (es decir, el nivel de Ang II y/o aldosterona) y/o la proporción de este (es decir, la AA2R) no más del 5 %, 10 %, 15 % o 20 %. Por ejemplo, el sujeto a diagnosticar con los procedimientos de la invención puede tratarse con uno o más tratamientos antihipertensivos (por ejemplo, con uno o más inhibidores de RAS) que, solos y/o en combinación, dan como resultado un factor de discriminación en base a la AA2R que es (aún) más alto que el factor de discriminación en base a la ARR.

30

El tratamiento con fármacos antihipertensivos podría incluso aumentar la AA2R, lo que podría provocar un cambio en el umbral de discriminación. En otra realización de la presente invención, el sujeto se trata con uno o más fármacos o tratamientos que aumentan la AA2R.

35 Como se describe en la presente memoria, una ventaja importante del procedimiento de la invención es que la AA2R es mucho menos propensa a la interferencia por el tratamiento antihipertensivo que la ARR. En otras palabras, la ARR se ve afectada (e incluso alterada significativamente) por muchos más fármacos y/o tratamientos antihipertensivos que la AA2R. Incluso si la AA2R pudiera verse afectada por un tratamiento antihipertensivo, los procedimientos de la invención proporcionan un poder de diagnóstico mejorado de la AA2R sobre la ARR bajo tratamiento antihipertensivo, como lo indica un factor de discriminación más alto. Solo aquellas composiciones farmacéuticas y/o tratamientos definidos que pueden excluirse de un diagnóstico en base a la AA2R (como se describe en las realizaciones especificadas anteriormente) pueden aclararse del sistema sanguíneo del sujeto antes del diagnóstico. En consecuencia, el sujeto podría suspender tales fármacos y/o tratamientos, o la una o más composiciones y/o tratamientos farmacéuticos pueden ser reemplazados por otras composiciones y/o tratamientos farmacéuticos adecuados, en particular otras composiciones y/o

40

45 tratamientos farmacéuticos antihipertensivos que no afectan (o no afectan significativamente) a la AA2R.

Para evitar dudas, si se refiere a un efecto de una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos, o a una o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos que afectan (o no afectan) un parámetro y/o proporción, significa que el efecto es causado (o no es causado) ya sea por una composición farmacéutica o tratamiento solo, o por la combinación de dos o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos, es decir, el uno o más composiciones farmacéuticas y/o tratamientos causan (o no causan) dicho efecto, ya sea solo o en combinación.

50

En una realización, el sujeto se trata con uno o más fármacos o tratamientos que alteran la ARR. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR, pero no disminuyen el poder de diagnóstico de la AA2R, o disminuyen el poder de diagnóstico de la AA2R en menor medida que la ARR. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que aumentan el poder de diagnóstico de la ARR, pero aumentan el poder de diagnóstico de la AA2R en mayor medida. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que aumentan el poder de diagnóstico de la AA2R. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas que dan como resultado un mayor poder de diagnóstico de la AA2R en comparación con el poder de diagnóstico de la ARR. En una realización, el sujeto se trata con una o más composiciones farmacéuticas seleccionadas de inhibidores de renina, inhibidores de ACE,

55

60

ACE2, diuréticos y/o bloqueadores de los canales de calcio, o combinaciones de estos. En una realización, el sujeto se trata con uno o más inhibidores de ACE.

En otra realización, el sujeto se trata con uno o más inhibidores de renina.

5 En una realización, los tratamientos y/o composiciones farmacéuticas afectan uno o más parámetros de la ARR (es decir, la concentración y/o actividad de la renina y/o el nivel de aldosterona) y/o la proporción de estos (es decir, la ARR) más del 5 %, 10 %, 15 % o 20 %. En una realización, los tratamientos y/o composiciones farmacéuticas afectan uno o más parámetros de la ARR (es decir, la concentración y/o actividad de la renina y/o el nivel de aldosterona) y/o la proporción de estos (es decir, la ARR) más del 5 %, 10 %, 15 % o 20 %, pero afecta a los parámetros dados de la AA2R (es decir, el nivel de Ang II y/o aldosterona) y/o la proporción de estos (es decir, la AA2R) no más de 5 %, 10 %, 15 % o 20 %. En una realización, el sujeto no se trata con uno o más fármacos o tratamientos que disminuyen el factor de discriminación de la AA2R en comparación con la ARR. En una realización, el sujeto se trata con uno o más fármacos o tratamientos que alteran la ARR, pero no la AA2R.

15 Un experto en la materia puede determinar fácilmente si un tratamiento afecta o no uno o ambos parámetros utilizados para el diagnóstico (por ejemplo, nivel de renina y/o actividad de renina, y/o nivel de aldosterona para el diagnóstico en base a la ARR, y nivel de Ang II y/o de aldosterona para el diagnóstico en base a la AA2R de acuerdo con la invención). Por ejemplo, para muchos tratamientos antihipertensivos en el mercado, el efecto o los efectos en el RAS y/o uno o más de sus componentes se describen en la literatura (ver, por ejemplo, la Tabla 4 en Funder et al., citada anteriormente). Además, el efecto o los efectos pueden determinarse con procedimientos estándar, por ejemplo, medir los niveles de uno o más parámetros en muestras biológicas antes y durante o después del tratamiento o comparar grupos de pacientes tratados de manera diferente utilizando procedimientos estadísticos. Alternativamente o además, tal efecto o efectos de un tratamiento puede determinarse mediante un análisis de huellas de RAS, es decir, la medición de nivel o niveles de uno o más componentes RAS, especialmente en un estado de equilibrio estable, como se describe anteriormente y en el documento WO 2013/182237.

25 El poder de diagnóstico se puede determinar como se describe en la presente memoria o en la técnica anterior. Por lo tanto, una persona experimentada puede determinar fácilmente el poder de diagnóstico de la ARR y la AA2R, y comparar ambos.

30 En una realización, el tratamiento comprende la administración de al menos una composición farmacéutica que afecta el sistema renina angiotensina (RAS), a excepción de los ARBs. En una realización, el tratamiento comprende la administración de al menos una composición farmacéutica que afecta el sistema renina angiotensina (RAS), excepto las composiciones farmacéuticas que afectan el nivel de aldosterona, pero sin excluir los efectos mediados por Ang II sobre el nivel de aldosterona. En una realización, el tratamiento comprende la administración de al menos una composición farmacéutica que afecta al sistema renina angiotensina (RAS), excepto los ARBs y excepto las composiciones farmacéuticas que afectan el nivel de aldosterona, pero sin excluir los efectos mediados por Ang II sobre el nivel de aldosterona. En una realización, la composición farmacéutica que afecta el sistema renina angiotensina (RAS) afecta directa o indirectamente (o interfiere con) el RAS. En una realización, la composición farmacéutica que afecta (o interfiere con) el sistema renina angiotensina (RAS) es una composición que afecta (o interfiere con) la expresión y/o actividad de la renina, ya sea directa o indirectamente. Dichos fármacos que interfieren con RAS pueden comprender uno o más inhibidores de ACE de terminal N o C, inhibidores de renina, inhibidores de aminopeptidasa y/u otros compuestos que afectan la expresión y/o secreción endógena de enzimas RAS en la circulación. En una realización, los fármacos que afectan a RAS pueden comprender lisinopril, capropril, aliskiren, amastatina, enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), endopeptidasa neutra, también llamada neprilisina (NEP), y/u otros compuestos que afectan la expresión y/o secreción de enzimas RAS endógenas, y/o combinaciones de estas. En una realización, el tratamiento también puede comprender una dieta específica, por ejemplo, una dieta baja en sal y/o una dieta DASH (enfoques dietéticos para detener la hipertensión). Sin embargo, al menos uno de los parámetros utilizados para el diagnóstico de PHA en base a la ARR, a menudo está influenciado por uno o más de tales tratamientos.

50 A diferencia de la ARR, la AA2R no se ve afectada por la mayoría de los tratamientos antihipertensivos, especialmente el tratamiento con bloqueadores RAS. Durante el tratamiento con bloqueadores RAS, la renina aumenta debido a un conocido mecanismo de retroalimentación reguladora inducido por la falta de Ang II y que conduce a la secreción de renina. La supresión de Ang II conduce además a una disminución de la secreción de aldosterona dependiente de la angiotensina, lo que hace que la AA2R permanezca estable, mientras que la ARR disminuye debido al aumento de la renina.

55 Por ejemplo, el tratamiento con inhibidores de ACE se asocia con un aumento en la actividad y concentración de la renina, lo que podríamos confirmar al comparar la PRA entre pacientes no tratados y pacientes bajo inhibidor de ACE (Figura 2, panel central). Debido a un aumento de la actividad y la concentración de renina en respuesta al tratamiento con inhibidores de ACE, la ARR no es adecuada para evaluar a los pacientes que se someten a dicho tratamiento, ya que la ARR disminuye fuertemente mientras la renina aumenta, lo que lleva a un mayor número de resultados de prueba falsos negativos y por lo tanto una disminución en la sensibilidad del ensayo.

60

Como las pruebas de cribado de PHA se realizan principalmente en pacientes hipertensos, la interferencia con fármacos antihipertensivos es muy frecuente y bien conocida (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. Septiembre de 2008, 93(9):3266-3281). Las interferencias farmacológicas explicadas anteriormente plantean la necesidad de pruebas de confirmación diseñadas para aumentar el rendimiento de la prueba, pero obviamente imponen un riesgo cardiovascular significativo para los pacientes, ya que la medicación antihipertensiva debe suspenderse durante varias semanas antes de la prueba de confirmación, lo que conduce a una hipertensión severa que podría causar eventos cardiovasculares fatales como derrame cerebral e insuficiencia cardíaca.

Una prueba de confirmación de PHA muy común es la prueba de infusión salina descrita anteriormente. La prueba de ARR se utiliza para confirmar el PHA bajo estas condiciones definidas, cuyo objetivo es aumentar el rendimiento del ensayo de la ARR y el poder de diagnóstico (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9):3266-3281).

Por ejemplo, los tratamientos habituales de los sujetos y los factores o tratamientos que afectan la ARR, es decir, el parámetro de diagnóstico actual, se describen en la guía de práctica clínica de Funder et al. 2008, citado anteriormente. Además, tanto el nivel de aldosterona como el nivel de renina pueden verse afectados por dicho tratamiento o tratamientos. Por lo tanto, la prueba ARR conduce a resultados falsos positivos y/o falsos negativos que resultan en tratamientos inapropiados. En muchos casos, los dos parámetros, es decir, el nivel de renina y el nivel de aldosterona, incluso se ven afectados a la inversa, lo que falsificaría extremadamente la proporción y, por lo tanto, el resultado diagnóstico. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención es independiente de tales tratamientos, excepto para las composiciones farmacéuticas que afectan el nivel de aldosterona, pero no excluye los efectos mediados por Ang II sobre el nivel de aldosterona, y excepto para el tratamiento con bloqueadores de los receptores de angiotensina (ARBs). Esta clase de fármacos antihipertensivos (ARBs) se enlaza directamente al receptor AT1, lo que evita la señalización de Ang II. El mecanismo de retroalimentación explicado anteriormente conduce a una mayor concentración y actividad de renina, lo que resulta en la acumulación de Ang II. Esto reduciría artificialmente la AA2R, que debe considerarse en futuras pruebas de PHA utilizando la AA2R. Sin embargo, un paciente en ARB puede cambiarse fácilmente a otro bloqueador RAS como un inhibidor de ACE antes de medir la AA2R. Alternativamente, el uno o más ARBs y/o una o más composiciones farmacéuticas que afectan el nivel de aldosterona, pero sin excluir los efectos mediados por Ang II sobre el nivel de aldosterona (como se describe anteriormente), pueden aclararse antes de aplicar el procedimiento de diagnóstico de la invención.

En una realización, se mide el nivel de estado de equilibrio estable de angiotensina II. El término "estado de equilibrio estable" (SSE) o "procedimiento de SSE" o "nivel de equilibrio" o "concentración de equilibrio" como se usa en la presente memoria significa la medición de al menos un producto de degradación peptídica (por ejemplo, Ang II) de una cascada proteolítica (por ejemplo, RAS) en una muestra biológica, especialmente una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre, en la que la muestra se incuba hasta alcanzar un estado de equilibrio estable para dicho al menos un producto de degradación peptídica involucrado en dicha cascada proteolítica y en la que dicho al menos un producto de degradación peptídica en una concentración de estado de equilibrio estable (o concentración de equilibrio) se cuantifica en la muestra. En particular, el término "estado de equilibrio estable" (SSE) como se usa en la presente memoria significa que la tasa de degradación global real de al menos un producto de degradación peptídica involucrado en la cascada proteolítica es igual a la tasa de formación global real de dicho producto de degradación peptídica, por lo tanto que conduce a una concentración estable de dicho producto de degradación peptídica, es decir, una concentración de péptido en estado de equilibrio estable que no varía sustancialmente durante un cierto período de tiempo, como se especifica más adelante. En dicho estado de equilibrio estable, la tasa de formación global real de un producto de degradación peptídica se define por la suma de las tasas de renovación reales de todas las enzimas involucradas en la formación de dicho producto de degradación peptídica, es decir, dicho producto de degradación peptídica es un producto directo de dicha enzima o enzimas. La tasa de degradación global real de un producto de degradación peptídica se define por la suma de las tasas de renovación reales de todas las enzimas involucradas en la degradación de dicho producto de degradación peptídica, es decir, dicho producto de degradación peptídica es un sustrato directo de dicha enzima o enzimas. El estado de equilibrio estable se describe adicionalmente en el documento WO 2013/182237.

El término "real" como se usa en la presente memoria significa la tasa de formación o degradación real (o efectiva) de un péptido, como Ang II, o la tasa de renovación real o efectiva de una enzima, como ACE, ACE2 y/o aminopeptidasa, bajo las condiciones presentes en la muestra.

El término "igual a", como se usa en la presente memoria, significa que la concentración de péptido resultante de cualquiera de tal tasa o tasas iguales de formación o degradación de dicho péptido (la "concentración de péptido de estado de equilibrio estable" o "nivel de péptido en estado de equilibrio estable"), o resultante de tales tasas de renovación iguales de al menos dos enzimas involucradas en la formación o degradación de dicho péptido (la "tasa de renovación de enzimas en estado de equilibrio estable"), no varía más del 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % durante un período de tiempo de al menos 30 minutos (min), 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos o 300 minutos. En consecuencia, las tasas de renovación globales reales de las enzimas implicadas en la degradación de dicho péptido están determinadas por las tasas de formación globales reales de sus péptido o

péptidos de sustrato, de modo que cualquier sustrato formado nueva o adicionalmente se degrada. Sin embargo, esto no significa necesariamente que la concentración neta de dicho péptido sea cero, pero la concentración neta como está presente en la muestra en estado de equilibrio estable no varía significativamente como se describió anteriormente.

- 5 Por consiguiente, en una realización de la invención, la concentración de dicho al menos un producto de degradación peptídica (por ejemplo, Ang II) de la cascada proteolítica (por ejemplo, el RAS) permanece dentro de un intervalo constante durante el período de tiempo del estado de equilibrio estable, a pesar de un flujo continuo de formación y degradación. En una realización de la invención, la concentración de dicho al menos un producto de degradación peptídica en estado de equilibrio estable no varía más del 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %,
10 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos, o 300 minutos. En una realización, la concentración de dicho al menos un producto de degradación peptídica en estado de equilibrio estable no varía más del 15 %, o no más del 10 %, en 60 minutos. Por consiguiente, dicho péptido no se acumula ni disminuye significativamente durante los períodos de tiempo especificados anteriormente.
- 15 En una realización, la muestra se incuba durante hasta 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos, o hasta 300 minutos, antes de que se cuantifique en la muestra el al menos un producto de degradación peptídica (en particular, Ang II) en estado de equilibrio estable. En otra realización, la muestra puede incubarse durante más de 6 horas (h), especialmente durante hasta 8 h, 12 h, 18 h, 24 h o hasta 48 h. Los períodos de tiempo de incubación adecuados dependen principalmente de la cascada proteolítica dada, de los analitos peptídicos a cuantificar, de la naturaleza de la muestra y de los parámetros de incubación. Dichos períodos de tiempo de incubación pueden ser determinados fácilmente por un experto en la materia. En una realización, el estado de equilibrio estable se conserva (o estabiliza o congela o apaga) después de la incubación. Los términos "conservado", "estabilizado", "congelado" y "apagado" como se usan en la presente memoria significarán la conservación de un estado bioquímico, por ejemplo, la conservación de los niveles de péptidos, por ejemplo, por inhibición de la degradación proteolítica. La estabilización de los niveles de péptidos de estado de equilibrio estable (o los niveles de péptidos in vivo) se puede realizar mediante la adición de uno o más inhibidores de la proteasa, especialmente mediante la adición de un cóctel inhibitor de la proteasa. Por consiguiente, se pueden agregar uno o más inhibidores de la proteasa después de la incubación hasta que se alcance un estado de equilibrio estable para al menos un producto de degradación peptídica (en particular, Ang II). Los inhibidores de proteasa adecuados o combinaciones de estos pueden ser seleccionados por un experto en la materia y pueden, por ejemplo, comprender una combinación de inhibidores enzimáticos específicos o no específicos, o una combinación de estos. El uno o más inhibidores de proteasa o el cóctel de inhibidores de proteasa aseguran que especialmente las etapas proteolíticas de la cascada que son de interés (es decir, las enzimas que forman y degradan el péptido a medir, es decir, Ang II), o cada enzima de la cascada proteolítica es completamente inhibida.
20
25
30
35

En una realización, cada etapa de la cascada proteolítica se inhibe, es decir, cada enzima involucrada en la cascada proteolítica se inhibe por al menos un componente del cóctel inhibitor de proteasa. En otra realización, el cóctel inhibitor de proteasa comprende al menos un inhibidor específico o no específico de cada clase de proteasas implicadas en la cascada proteolítica. El cóctel inhibitor de proteasa puede comprender uno o más inhibidores que inhiben una o más enzimas implicadas en la cascada proteolítica. Ejemplos de tales inhibidores del RAS son lisinopril (inhibidor de ACE) y aliskiren (inhibidor de renina). El cóctel inhibitor de proteasa también puede comprender uno o más inhibidores que inhiben uno o más grupos de enzimas implicados en la cascada proteolítica, como por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, inhibe las metaloproteasas). Además, el cóctel inhibitor de proteasa puede comprender uno o más inhibidores no específicos. En una realización, el cóctel inhibitor de proteasa comprende una combinación de al menos dos de las clases de inhibidores mencionadas anteriormente. En otra realización, el cóctel inhibitor de proteasa comprende uno o más inhibidores de la enzima de alimentación, especialmente inhibidores específicos de la enzima de alimentación.

Por ejemplo, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro inhibidores de proteasa se agregan a la muestra. En una realización, el cóctel inhibitor de proteasa comprende pepstatina A, 1,10-fenantrolina, EDTA, ácido p-hidroximercuri-benzoico y el péptido inhibitor de renina Z-Arg-Arg-Pro-Phe-His-Sta-Ile-His-Lys (Z-Arg)

Alternativamente, o además del uso de uno o más inhibidores de proteasa o un cóctel inhibitor de proteasa, el estado de equilibrio estable se puede conservar mediante la adición de uno o más agentes caotrópicos, como el yoduro de sodio, perclorato de sodio, perclorato de litio, cloruro de magnesio, tiocianato de guanidina (GTC), cloruro de guanidinio, fenol, propanol, butanol, etanol, dodecilsulfato de sodio, tiourea, urea u otros.

Alternativamente, o además del uso de uno o más inhibidores de proteasa o un cóctel inhibitor de proteasa, el estado de equilibrio estable puede conservarse por otros medios de inactivación física de las enzimas en la muestra, por ejemplo, desnaturalización de la enzima inducida por el calor, sal, pH, o detergente; o por enfriamiento, por ejemplo, colocar las muestras en hielo directamente después de la incubación. Para una o más de las etapas de procesamiento adicionales de las muestras, por ejemplo, la separación de plasma o suero y la separación por extracción en fase sólida (SPE; por ejemplo, para el agotamiento de la matriz y/o el

enriquecimiento de péptidos), también se puede seleccionar una temperatura ambiente acorde para garantizar que todas las enzimas en la muestra estén inactivas. Por ejemplo, cualquier pretratamiento de la muestra o procesamiento de la muestra antes del análisis de la muestra se puede hacer a 4 °C de temperatura ambiente (o inferior), al menos hasta la desnaturalización o inactivación completa de las enzimas involucradas en la cascada proteolítica (por ejemplo, hasta la elución de la columna o cartucho de SPE).

En contraste, los ensayos clásicos de renina en plasma (PRA) están dirigidos a la inhibición completa de las vías de degradación de la angiotensina I (Ang I) inmediatamente después de que se haya tomado la muestra, y la actividad enzimática se calcula en base a la tasa de acumulación del péptido formado por dicha enzima. Incluso si la inhibición de las rutas de degradación de Ang I puede ser incompleta en tales ensayos de PRA, todavía están lejos de cualquier estado de equilibrio estable de acuerdo con la invención, ya que la concentración neta de Ang I cambia significativamente con el tiempo. En el ensayo PRA como se describe, por ejemplo, en Bystrom et al. (Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569), la concentración de Ang I aumenta significativamente con el tiempo. Además, los ensayos de vanguardia buscan evaluar la actividad general del RAS midiendo la forma conformacional activada de la renina en muestras de plasma mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y procedimientos basados en radioinmunoensayo (RIA) (DRG Diagnostics, <http://www.drg-diagnostics.de/49-1-DRG+Renin+active+ELISA.html>). En contraste con las mediciones de SSE como se describió anteriormente, estos ensayos dependen fundamentalmente de la especificidad del anticuerpo usado y no permiten conclusiones sobre la concentración de los péptidos efectores en las muestras, que son responsables de los efectos fisiológicos del RAS. La razón de esto es que existen múltiples enzimas que afectan el nivel de péptidos efectores. Todos estos péptidos pueden analizarse simultáneamente mediante mediciones de SSE, mientras que los ensayos de vanguardia se centran en una sola actividad o concentración enzimática por muestra.

En una realización de la invención, en el estado de equilibrio estable, la tasa de renovación real de la enzima de alimentación es máxima, es decir, el sustrato de alimentación está presente en un gran exceso molar en comparación con la enzima de alimentación, y cualquier adición de sustrato de alimentación externo no aumenta la tasa de renovación real de la enzima de alimentación. Por consiguiente, la enzima de alimentación de una cascada proteolítica es la enzima, que es responsable de la reacción de conversión de alimentación, es decir, la etapa limitante de la tasa de la cascada proteolítica posterior (o el cuello de botella de la cascada proteolítica). Para la cascada proteolítica RAS bajo condiciones fisiológicas, la enzima de alimentación es la renina, que es responsable de la conversión de angiotensinógeno en angiotensina I. En los sistemas fisiológicos (por ejemplo, en el cuerpo, en muestras de sangre, plasma o suero), el angiotensinógeno como el sustrato para la renina está presente en el vasto exceso molar de la renina. Sin embargo, en una realización de la invención, una o más, o todas las demás enzimas de la cascada proteolítica RAS, tales como por ejemplo, aminopeptidasas (AP), especialmente aminopeptidasa A (APA) y/o aminopeptidasa N (APN), dipeptidil aminopeptidasas (DAP), carboxipeptidasas (especialmente ACE2), dipeptidilcarboxipeptidasas (especialmente ACE) y/o endopeptidasas (especialmente endopeptidasa neutra, también llamada neprilisina), están presentes en la muestra a concentraciones suficientes para degradar cualquier sustrato formado recientemente o adicionalmente y, por lo tanto, permiten el establecimiento de un estado de equilibrio estable para dichas enzimas y péptido o péptidos durante la incubación, es decir, sus tasas de renovación globales reales están determinadas por las tasas de formación globales reales de su péptido o péptidos de sustrato.

De acuerdo con la presente invención, el término "enzima de alimentación" significará una enzima con una tasa de renovación real máxima, es decir, con una tasa de renovación real que es la tasa de renovación máxima alcanzable para dicha enzima en la muestra. El término "tasa de renovación máxima alcanzable" significará la tasa de renovación de una enzima contenida en la muestra, que se puede lograr bajo las condiciones dadas en la muestra, si el péptido sustrato está (o estaría) presente en un gran exceso molar en comparación con la enzima (o una cantidad prácticamente inagotable) al menos hasta que se alcance el estado de equilibrio estable. Por consiguiente, la tasa de renovación real de la enzima de alimentación no se puede aumentar más mediante la adición de un sustrato externo, ya que el sustrato de alimentación ya está presente en un vasto exceso molar en comparación con la enzima de alimentación. Si, por ejemplo, cualquier péptido de sustrato externo (es decir, un péptido involucrado en la cascada proteolítica) o un análogo de dicho sustrato se agrega a una muestra antes o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable, esto puede, de acuerdo con la presente definición, resultar en un cambio de la etapa o etapas limitantes de la tasa de la cascada proteolítica y, por lo tanto, también de la enzima o enzimas de alimentación de la cascada proteolítica, si la cantidad de péptido sustrato agregado es suficiente para dar como resultado una máxima tasa de renovación alcanzable de al menos una enzima implicada en la degradación de dicho péptido sustrato (es decir, una enzima distinta de la enzima de alimentación bajo condiciones fisiológicas). Por ejemplo, si la cascada proteolítica bajo investigación es RAS, y si un gran exceso molar de un Ang II (o un análogo de este, por ejemplo, un Ang II que lleva una etiqueta de masa o cualquier modificación covalente, incluidos los intercambios de aminoácidos) en comparación con una o más o todas las enzimas involucradas en la degradación de Ang II se agregan a la muestra antes o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable, al menos una o incluso todas las enzimas involucradas en la degradación de Ang Ang II (por ejemplo, ACE2, AP y/o DAP) alcanzarían las tasas de renovación máximas alcanzables y, por lo tanto, se convertiría en la etapa o etapas limitantes de la tasa de alimentación para la reacción o reacciones proteolíticas posteriores de la cascada.

En una realización de la invención, puede añadirse enzima de alimentación a la muestra. La adición de enzima de alimentación aumenta el flujo pasante de la cascada de enzimas y, por lo tanto, conduce a niveles absolutos aumentados de péptidos, mientras que los niveles relativos (proporciones de péptidos) permanecen sin cambios. En consecuencia, los niveles de estado de equilibrio estable del uno o más péptidos aún reflejan la situación fisiológica, es decir, las actividades enzimáticas, sin embargo, los niveles globales de péptidos aumentan proporcionalmente. Esto sería útil, por ejemplo, si los niveles de péptidos medidos sin la adición de la enzima de alimentación estuvieran por debajo del límite de detección del procedimiento utilizado para cuantificar el péptido o péptidos. Opcionalmente, también se puede agregar sustrato de alimentación. Esto puede asegurar que el sustrato de alimentación esté y permanezca en exceso molar en comparación con la enzima de alimentación y que el sustrato de alimentación todavía esté presente en cantidades prácticamente inagotables que conduzcan a una tasa de renovación de la enzima de alimentación, que es estable durante un cierto tiempo que define el estado de equilibrio estable, incluso si se agrega la enzima de alimentación.

En una realización, la cascada proteolítica es el RAS, y el péptido a analizar es Ang II. En dicha realización, la tasa de renovación real de dicha enzima degradante de Ang II en el estado de equilibrio estable es igual a la tasa de renovación real de ACE, que es la enzima formadora de Ang II, si solo una vía de degradación enzimática de Ang II está "abierta" en la muestra, es decir, solo una enzima degradante de Ang II está activa. Si hay más de una enzima degradante de Ang II activa en la muestra, la suma de las tasas de renovación reales de dichas enzimas degradantes de Ang II activas (es decir, la tasa de degradación global real de Ang II) es igual a la tasa de renovación real de ACE (es decir, la tasa de formación de Ang II global real) en dicha realización.

Por consiguiente, se alcanza un estado de equilibrio estable para el péptido, por ejemplo, Ang II, y la enzima o enzimas relacionadas, es decir, la enzima o enzimas que forman o degradan dicho péptido (por ejemplo, Ang II). Como se describió anteriormente, se alcanza el estado de equilibrio estable, si la concentración neta del al menos un péptido (en particular Ang II), dos o más péptidos, o todos los péptidos involucrados en la cascada proteolítica, no varía más del 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % durante un período de tiempo de al menos 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos o 300 minutos. Dicho estado de equilibrio estable se alcanza después de la incubación de la muestra durante 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos o 300 minutos, o durante 8, 12, 18, 24 o 48 horas. El estado de equilibrio estable continúa durante al menos 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos o 300 minutos.

En una realización de la invención, en el estado de equilibrio estable, la tasa de degradación máxima alcanzable global de al menos un péptido implicado en la cascada proteolítica (por ejemplo, Ang II) es igual a o mayor que su tasa de formación global real. De acuerdo con la invención, la tasa de degradación máxima alcanzable de un péptido es la tasa de degradación global que podría lograrse bajo las condiciones dadas en presencia de un vasto exceso molar de dicho péptido en comparación con cada enzima que degrada dicho péptido (o una cantidad prácticamente inagotable de dicho péptido), es decir, por adición de péptido externo. Por consiguiente, la tasa de degradación máxima alcanzable de un péptido es la suma de las tasas de renovación máximas alcanzables de todas las enzimas involucradas en la degradación de dicho péptido.

En una realización, al comienzo del tiempo de incubación, la cantidad de todas las enzimas involucradas en la cascada proteolítica es superior a la cantidad de su sustrato o sustratos respectivos, excepto para la enzima de alimentación de la cascada proteolítica. En otra realización, la cantidad de dichas una o más enzimas o de todas las enzimas involucradas en la cascada proteolítica es superior a la cantidad de su respectivo sustrato o sustratos durante todo el período de tiempo de incubación, excepto para la enzima de alimentación de la cascada proteolítica.

En otra realización, las condiciones como se especificó anteriormente (es decir, que la cantidad de enzima es superior a la cantidad del sustrato respectivo, y/o que la tasa de formación de un péptido es igual a la tasa de degradación en estado de equilibrio estable) aplican al menos al uno o más péptidos a analizar (por ejemplo, Ang II), y/o la enzima o enzimas respectivas que forman o degradan dicho péptido o péptidos a analizar (por ejemplo, Ang II).

Por ejemplo, si el procedimiento SSE de la presente invención se usa para examinar un componente de la cascada proteolítica RAS, y el péptido a analizar es Ang II, esto significa que hasta que se alcance un estado de equilibrio estable, la tasa real de formación de Ang II por ACE es mayor que la suma de las tasas de degradación reales de todas las enzimas involucradas en la degradación de Ang II, incluidas, pero no limitadas a, ACE2, AP y/o DAP. En consecuencia, la concentración de Ang II aumenta, es decir, se acumula Ang II, hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable. Cuando se alcanza el estado de equilibrio estable, la tasa real de formación de Ang II es igual a la suma de las tasas de renovación reales de todas las enzimas involucradas en la degradación de Ang II (la tasa de degradación global real de Ang II).

Por consiguiente, en una realización del estado de equilibrio estable de la presente invención, al menos una reacción de degradación proteolítica tiene que estar activa o "abierta" para que se analice el péptido, por

ejemplo, Ang II, hasta un punto que permite que la tasa de degradación global real sea igual a la tasa de formación global real de dicho péptido, es decir, no es inhibida o "cerrada", por ejemplo, mediante el uso de uno o más inhibidores de la proteasa, en la medida en que la tasa de formación global real exceda la tasa de degradación global alcanzable real o máxima de dicho péptido.

5 En una realización, agentes quelantes, tales como por ejemplo, EDTA, etilenglicol ácido tetraacético (EG-TA), 8-hidroxiquinolina, fenantrolina y dimercaprol (también llamado British-anti-Lewisita o BAL), no se agregan antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable, especialmente no para la cascada RAS u otras cascadas proteolíticas donde están involucradas las metaloproteasas, ya que los agentes quelantes tienen un efecto inhibitorio sobre las metaloproteasas a través de la quelación de iones bivalentes.

10 En una realización, agentes caotrópicos, tales como, por ejemplo, yoduro de sodio, perclorato de sodio, perclorato de litio, cloruro de magnesio, tiocianato de guanidina (GTC), cloruro de guanidinio, fenol, propanol, butanol, etanol, dodecilsulfato de sodio, tiourea, urea y/u otros, no se agregan antes y/o durante la incubación hasta alcanzar un estado de equilibrio estable.

15 En una realización, el estado de equilibrio estable se alcanza bajo condiciones fisiológicas para dicha cascada proteolítica, lo que significa que los componentes de la cascada proteolítica (enzimas y péptidos sustrato o producto), sus cantidades totales y/o relativas como están presentes en la muestra biológica como se toman del cuerpo, así como la matriz con respecto a la composición y/o el pH de la muestra, no se modifican o no se modifican sustancialmente antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable.

20 En una realización, las concentraciones de las enzimas y/o péptidos implicados en la cascada proteolítica presente en la muestra biológica como se toma del cuerpo no se modifican antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable.

25 En otra realización, sustratos o análogos de sustrato de cualquier enzima o enzimas involucradas en la cascada proteolítica, tal como, por ejemplo, los estándares internos o estándares de degradación, ya sea en su forma nativa o modificados por etiquetado (por ejemplo, etiquetado isotópico y/o fluorescente, y/o modificaciones de aminoácidos o intercambios de al menos un aminoácido), no se agregan antes y/o durante la incubación hasta alcanzar un estado de equilibrio estable. En una realización de la presente invención, la cascada proteolítica es el RAS, y no se agregan ni el angiotensinógeno, angiotensina I y/o Ang II, ni ningún análogo de estos, antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable.

30 En otra realización, otras sustancias o reactivos, tales como por ejemplo, las sustancias tampón (Tris, PBS, MES, HEPES, citrato, borato, carbonato o hidrogenocarbonato (o bicarbonato) y/u otras sustancias tampón o soluciones tampón respectivas no se agregan antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable.

35 En otra realización más, sustancias o reactivos, tales como, por ejemplo, EDTA, EGTA, PMSF, AEBSF, BSA, ácido maleico, anhídrido maleico, ácido fórmico y/o agua (en cualquier forma, por ejemplo, desionizada y/o destilada, etc.) no se agregan antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable.

Sin embargo, y no obstante lo anterior, uno o más de los inhibidores de la proteasa, agentes quelantes, agentes caotrópicos, sustratos, estándares, BSA, tampones y/u otras sustancias o reactivos mencionados anteriormente se pueden agregar una vez que se alcance el estado de equilibrio estable y, opcionalmente, apagado.

40 Especialmente, uno o más estándares, por ejemplo, estándares internos y/o estándares de degradación, se pueden agregar una vez que se alcanza y se congela un estado de equilibrio estable. Los estándares son, por ejemplo, péptidos de la cascada proteolítica, que se modifican mediante etiquetado en masa y/o etiquetado químico (por ejemplo, etiquetado isotópico y/o fluorescente, y/o modificaciones de aminoácidos, y/o el uso de etiquetas en masa, y/o intercambios de al menos un aminoácido). Por consiguiente, los estándares internos son

45 estándares internos etiquetados con isótopos estables, por ejemplo, divulgado en el documento WO 03/016861 A. En una realización, la muestra biológica se incuba como se toma del sujeto (ex vivo), es decir, no son modificados la matriz de la muestra y/o las concentraciones de los componentes de la cascada proteolítica a analizar, pero opcionalmente se procesa adicionalmente (por ejemplo, para obtener plasma o suero), antes o después de alcanzar y estabilizar un estado de equilibrio estable. Opcionalmente, los anticoagulantes, es decir, sustancias que evitan la coagulación (evitan que la sangre se coagule), se pueden agregar a la muestra biológica

50 antes y/o durante la incubación hasta alcanzar un estado de equilibrio estable. Sin embargo, tales anticoagulantes no deberían afectar sustancialmente a las proteasas de la cascada proteolítica a analizar. Un anticoagulante adecuado para uso en el procedimiento de SSE de acuerdo con la presente invención es la heparina.

55 Antes del análisis, las muestras pueden pretratarse o procesarse adicionalmente, por ejemplo, por separación de plasma o suero (por ejemplo, por centrifugación o activación de la coagulación seguida de centrifugación), y/o purificación por extracción en fase sólida (SPE), por ejemplo, para el agotamiento de la matriz y/o el enriquecimiento de péptidos. Por consiguiente, la extracción en fase sólida se puede llevar a cabo con un

material de cromatografía de fase inversa, un material de cromatografía de interacción hidrófoba, un material de intercambio iónico, material de cromatografía de afinidad, por ejemplo, un material de cromatografía de fase inversa, especialmente un material C18, C8 o C6H5 (fenilo).

5 En una realización, el uno o más analitos (por ejemplo, Ang II) se concentran a sequedad después de la elución de la superficie sólida y se pueden reconstituir en una cromatografía líquida de alta presión (también llamada cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC) disolvente compatible, lo que significa que la composición del disolvente no interfiere con el enlace de uno o más analitos a la columna de HPLC acoplada a MS. El disolvente de reconstitución es, por ejemplo, un disolvente acuoso que puede complementarse con aditivos que incluyen propanol, butanol, 2-butanol, pentanol, 2-propanol, acetona, metil etil cetona, acetonitrilo, metanol, etanol, ácidos
10 o bases para mejorar la solubilidad de analitos y/o facilitar el enlace de analitos a la columna de HPLC.

En otra realización, los procedimientos de SSE de acuerdo con la invención comprenden las etapas: proporcionar una muestra tratada con un anticoagulante; opcionalmente, procesar adicionalmente la muestra para obtener una muestra de plasma o suero; incubar la muestra hasta alcanzar un estado de equilibrio estable para al menos un producto de degradación peptídica involucrado en la cascada proteolítica; conservar dicho estado de equilibrio estable; opcionalmente, agregar uno o más estándares internos una vez que se conserva el estado de equilibrio estable; realizar una extracción en fase sólida con la muestra; y analizar la muestra. La separación de plasma o suero puede realizarse antes o después de la etapa de incubación hasta que se alcance un estado de equilibrio estable (y, opcionalmente, se estabilice), dependiendo de si el estado de equilibrio estable se investigará en plasma, suero o sangre total.

20 El análisis del al menos un producto de degradación peptídico, opcionalmente en una concentración de estado de equilibrio estable, o el nivel de aldosterona se puede realizar, por ejemplo, por espectrometría de masa (MS); por cromatografía líquida, tal como cromatografía líquida de alta presión (también llamada cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC); especialmente por cromatografía líquida, ionización por electroaspersión, espectrometría de masas (LC-MS) y/o cromatografía líquida, espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Por ejemplo, Cui et al. (Anal Biochem. 369(2007), 27-33) divulga procedimientos de cromatografía líquida, ionización por electroaspersión, espectrometría de masa y cromatografía líquida de espectrometría de masas en tándem para
25 cuantificar péptidos de angiotensina. Para cada péptido o analito y los estándares internos correspondientes, se pueden medir diferentes transiciones de masa. El rendimiento del procedimiento puede ser monitoreado usando muestras de control de calidad.

30 Dichas muestras de control de calidad pueden incluir, por ejemplo, muestras biológicas con concentraciones de analito predefinidas, así como muestras sintéticas que comprenden una mezcla de concentraciones predefinidas de péptidos sintéticos. Por ejemplo, la muestra de control de calidad puede ser una muestra de sangre, plasma o suero agrupada o una muestra de homogeneizado de tejido agrupado con concentraciones predefinidas de uno o más péptidos. Las concentraciones de péptidos de angiotensina (por ejemplo, la concentración de Ang II) pueden calcularse relacionando las señales de péptidos endógenos con las señales estándar internas, siempre que las
35 señales integradas logren una proporción de señal a ruido superior a 10.

Además, el análisis se puede realizar mediante un ensayo radioinmune (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligada a enzima (ELISA). Opcionalmente, se puede realizar una etapa de purificación por HPLC antes de la cuantificación en base a la RIA o ELISA de productos de degradación peptídica de la cascada proteolítica.

40 En una realización, el pretratamiento de la muestra, procesamiento de la muestra y/o el análisis de las muestras pueden realizarse en un formato de pocillos múltiples, por ejemplo, en placas de 96 pocillos.

Una concentración de estado de equilibrio estable de un péptido (por ejemplo, Ang II) en ese contexto significa que su tasa de formación es igual a su tasa de degradación que conduce a una concentración de péptido (por ejemplo, Ang II), que no cambia sustancialmente o significativamente con el tiempo para un cierto período de tiempo, y que depende en gran medida de las afinidades de las enzimas a sus sustratos bajo las condiciones dadas en lugar de las tasas máximas de conversión de enzimas, como se describió anteriormente. Dado que la presente invención trata con sistemas biológicos, está claro que el término "estado de equilibrio estable" no puede considerarse como un punto único que debe alcanzarse, sino más bien como una región diana cinética de concentraciones de péptidos, que no cambian significativamente con el tiempo para un cierto período de tiempo.
45 Los períodos de tiempo más precisos hasta que se alcanzan tales concentraciones de estado de equilibrio estable dependen principalmente de la cascada proteolítica dada, de los analitos peptídicos que deben cuantificarse, de la naturaleza de la muestra y de los parámetros de incubación. Esto se puede determinar fácilmente para cada cascada. En general, la "ventana de estado de equilibrio estable" en la que se puede realizar la cuantificación de acuerdo con la presente invención es bastante grande, al menos para algunas de las cascadas proteolíticas, especialmente aquellas en la sangre. Por lo general, el estado de equilibrio estable se alcanza después de un cierto tiempo de incubación, que se determina empíricamente (por ejemplo, 30 minutos para el sistema RAS) y luego permanece estable durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, 6 horas (h) para el sistema RAS). Luego, el estado de equilibrio estable se ve alterado por efectos tales como la degradación e inactivación de las enzimas involucradas o la falta de sustrato de alimentación en la muestra. El
55 tiempo de estabilidad (ts) en base a la concentración del sustrato de alimentación para una cascada dada se
60

5 puede calcular dividiendo la concentración del sustrato de alimentación (o péptido precursor de alimentación) (c_f) reducida por una enzima y una constante específica de la muestra que define la concentración mínima de sustrato para lograr la tasa de renovación máxima de la enzima de alimentación en la muestra (c_{\min}), por la tasa de renovación de la enzima de alimentación de la cascada, definiendo así la tasa de alimentación (V_f) de la cascada.

$$t_s = (C_f - C_{\min})/V_f$$

t_s tiempo de estabilidad [h] en base a la concentración del sustrato de alimentación

C_f concentración de sustrato de alimentación [mol/l]

10 C_{\min} concentración mínima de sustrato específica de la muestra para lograr la tasa de renovación máxima de la enzima de alimentación en la muestra [mol/l]

V_f tasa de alimentación de la cascada [[mol/l]/[h]]

y

$$C_{\min} = f \cdot C_E$$

f factor de exceso

15 C_E concentración de enzima de alimentación

20 Por ejemplo, la aplicación de estas fórmulas anteriores en el RAS, donde la conversión de alimentación se lleva a cabo por renina, produce una concentración calculada de sustrato de alimentación en base al tiempo de estabilidad del estado de equilibrio estable de RAS de aproximadamente 60 a 200 horas en base a diferentes valores publicados para PRA (actividad de renina en plasma, PRC (concentración de renina en plasma), ver por ejemplo [Nishiyama et al. 2010, y Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569], y aplicar una concentración de AGT de, por ejemplo, 70 $\mu\text{g/ml}$ de plasma y un factor de exceso de, por ejemplo, 1.000. Por supuesto, dicho tiempo de estabilidad en base a la concentración de sustrato de alimentación calculado debería servir solo como un punto de referencia aproximado y teórico, ya que el tiempo real de estabilidad del estado de equilibrio estable puede diferir significativamente en las muestras.

25 En contraste con los procedimientos de vanguardia, donde los inhibidores se utilizan para estabilizar inmediatamente los péptidos producidos por ciertas enzimas con un éxito limitado [Bystrom et al., Clin. Chem 56(2010), 1561-1569], de acuerdo con la presente invención, se permite que la muestra alcance una actividad enzimática definida como estado de equilibrio estable para al menos un péptido involucrado en la cascada proteolítica, por ejemplo, Ang II. Este enfoque innovador permite una evaluación altamente reproducible de Ang II en la matriz de muestra fisiológica mientras integra las actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo de Ang II. Otra ventaja con respecto a las tecnologías de vanguardia, es que las concentraciones de sustrato en el ensayo de acuerdo con la presente invención generalmente permanecen por debajo de la concentración de enzimas metabolizantes (excepto la de la enzima de alimentación), teniendo en cuenta la afinidad de la enzima para cada uno de los sustratos bajo las condiciones dadas en la muestra (por ejemplo, condiciones fisiológicas) en contraste con los ensayos de actividad enzimática in vitro, donde esta importante característica se descuida con el propósito de simplificación mediante el uso de cantidades excesivas de sustrato.

30 Específicamente para las muestras de sangre, es importante para alcanzar el estado de equilibrio estable para al menos un péptido involucrado en la cascada proteolítica (por ejemplo, Ang II), que las proteasas de la cascada proteolítica que se observan con el presente procedimiento SSE no se inhiban por adición de inhibidores de proteasa a la muestra, al menos no en una extensión que no permita que al menos una enzima implicada en la degradación de dicho al menos un péptido trabaje hasta que se alcance el estado estacionario para dicho al menos un péptido, es decir, al menos una enzima de degradación de dicho péptido o péptidos tiene que estar activa en una extensión para permitir el estado de equilibrio estable para dicho péptido o péptidos. Por lo tanto, en una realización, los inhibidores de proteasa no se agregan a la muestra hasta cierto punto, de modo que las actividades de las proteasas involucradas en la formación y degradación del al menos un péptido a analizar (por ejemplo, Ang II) se inhiben significativamente antes y/o durante la incubación hasta alcanzar un estado de equilibrio estable. De acuerdo con dicha realización, las muestras no se combinan con tales inhibidores de proteasa o, si dichos inhibidores ya se han agregado, dichos inhibidores se inhiben (en su función inhibidora de proteasa) o se eliminan antes y/o durante la incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable. Por supuesto, los inhibidores que no afectan a las proteasas de la cascada proteolítica relevante que deben estudiarse mediante el procedimiento SSE de acuerdo con la presente invención, pero que inhiben otras actividades proteolíticas (por ejemplo, inhibidores de la coagulación de la sangre si se estudia el RAS) pueden agregarse a la muestra, porque esto no afectaría la capacidad de la cascada proteolítica relevante (es decir, la

cascada a analizar, por ejemplo, el RAS) para alcanzar un estado de equilibrio estable para al menos un péptido de la cascada.

Es ventajoso cuantificar el uno o más productos de degradación proteolítica (por ejemplo, Ang II) en el estado de equilibrio estable. Esto es esencialmente diferente de los análisis de la técnica anterior, que generalmente aplican la cuantificación de analitos en un estado de la cascada proteolítica estabilizada inmediatamente después de que las muestras (es decir, muestras de sangre) se toman de los sujetos, es decir, no en un estado de equilibrio estable. Normalmente, tales muestras de la técnica anterior se han tratado con inhibidores de proteasa inmediatamente después de tomar las muestras para inhibir cambios no deseados dependientes de enzimas en la cascada. Sin embargo, el procedimiento SSE utiliza tales cambios dependientes de enzimas para analizar el estado fisiológico o bioquímico del sujeto con respecto a la cascada proteolítica al permitir específicamente que las proteasas de dicha cascada bajo investigación realicen su actividad proteolítica hasta que se alcance un estado de equilibrio estable. Esto generalmente conducirá a un cambio en la cantidad y composición de los productos de degradación peptídica en la cascada proteolítica bajo investigación en comparación con la muestra que se estabilizó inmediatamente después de tomar la muestra del sujeto.

La actividad proteolítica específica de la muestra conduce a un estado de equilibrio estable que es mucho más indicativo del estado bioquímico del sujeto con respecto a esta cascada que la muestra estabilizada inmediatamente (sin la etapa de incubación hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable).

Como ya se indicó anteriormente, el estado de equilibrio estable de acuerdo con la presente invención no es un punto único, determinado y aislado cuantitativamente con exactitud, sino un estado donde cambios en las proporciones relativas se han reducido sustancialmente en la muestra. Por lo general, tal estado de equilibrio estable puede alcanzarse aplicando las condiciones de incubación habituales para las muestras dadas y la cascada bajo investigación. Como se especificó anteriormente, la muestra puede incubarse durante hasta 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos o 300 minutos. Para el sistema de RAS y/o bradiquinina, las muestras se pueden incubar durante al menos 30 minutos hasta 300 minutos, o durante al menos 30 minutos hasta 180 minutos, o durante al menos 30 minutos hasta 120 minutos, o durante al menos 30 minutos hasta 90 minutos, o durante al menos 30 minutos hasta 60 minutos. Las temperaturas de incubación adecuadas son las presentes en el sistema fisiológico o aquellas en las que las proteasas de la cascada proteolítica bajo investigación tienen su temperatura de acción óptima, por ejemplo, a una temperatura de 30 a 50 °C, de 35 a 40 °C, o especialmente de aproximadamente 37 °C (específicamente para muestras de sangre humana o muestras derivadas de sangre).

Dado que el procedimiento SSE de acuerdo con la presente invención aplica las actividades proteolíticas contenidas en la muestra, la una o más muestras, especialmente las muestras de sangre deben estar libres de inhibidores de proteasa agregados para la cascada proteolítica antes de que se alcance el estado de equilibrio estable.

Dichos inhibidores de proteasa pueden agregarse después de la incubación hasta que se alcance y se establezca un estado de equilibrio estable. Esto garantiza que la concentración o concentraciones de péptido (en particular, la concentración de Ang II) que refleja el estado de equilibrio estable todavía está/estén presentes durante la etapa de cuantificación (aunque el estado de equilibrio estable generalmente es estable durante un cierto período de tiempo, esto proporciona seguridad de calidad adicional para el procedimiento SSE).

El procedimiento SSE depende de una cuantificación exacta y precisa de los productos de degradación peptídica. Dado que muchas muestras, especialmente muestras de sangre, contienen proteínas, sales, ácidos, bases, lípidos, fosfolípidos u otros componentes, que pueden perturbar la cuantificación de péptidos; se pueden aplicar procedimientos para el pretratamiento de las muestras antes de la cuantificación.

En una realización, el sujeto es un sujeto que padece de hipertensión, y/o es resistente al tratamiento antihipertensivo, y/o se sospecha que padece PHA, y/o necesita un diagnóstico de PHA positivo o negativo. En una realización, el sujeto es un humano. En una realización, el sujeto es un animal, por ejemplo, un gato, perro, caballo, rata, ratón, conejo, cerdo y/o ganado.

Como se describió anteriormente, los procedimientos de la técnica anterior generalmente comprenden una fase de cribado, en la que la ARR se determina una vez, seguida de una prueba de confirmación, en la que la ARR o la aldosterona sola se determina al menos una segunda vez hasta que el PHA pueda diagnosticarse con suficiente sensibilidad y especificidad. El motivo de esta estrategia es la frecuente aparición de resultados falsos positivos. La prueba de confirmación de infusión salina descrita anteriormente incluso comprendería la determinación de la ARR tres veces (una vez en el cribado, una segunda vez en la prueba de confirmación antes de la infusión de solución salina, y una tercera vez después de la infusión de solución salina). En contraste, los procedimientos de la presente invención permiten un diagnóstico en base a una prueba o etapa, por ejemplo, la medición de la AA2R solo una vez.

Por consiguiente, en una realización, el procedimiento es un diagnóstico de una sola etapa. En una realización, el diagnóstico comprende solo una medida de la AA2R (en un punto de tiempo determinado). En una realización, el nivel de angiotensina II y/o el nivel de aldosterona se miden solo una vez.

5 En una realización, dicho diagnóstico de una sola etapa conduce a un diagnóstico confirmado. En una realización, dicho diagnóstico de una sola etapa no requiere pruebas de confirmación, como por ejemplo, cualquier segunda o más mediciones de la AA2R u otros parámetros. En una realización, no se requiere prueba de infusión salina.

10 En una realización, la muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre. Por ejemplo, la muestra de sangre o muestra derivada de sangre es sangre completa, suero, plasma con EDTA, plasma con heparina, plasma con citrato, sangre con heparina, sangre con EDTA o sangre con citrato. En una realización, al menos uno de los niveles se mide por espectrometría de masas. En una realización, al menos uno de los niveles se mide mediante procedimientos de cuantificación en base a anticuerpos, como por ejemplo, ELISA. En una realización, ambos niveles se miden por espectrometría de masas. En una realización, ambos niveles se miden por procedimientos de cuantificación en base a anticuerpos. Esto se puede hacer fácilmente, ya
15 que los kits para ambos analitos individuales están disponibles comercialmente. Sin embargo, la espectrometría de masas tiene ventajas significativas sobre los procedimientos de cuantificación en base a anticuerpos con respecto a la selectividad y reproducibilidad.

En otro aspecto, se describe un kit para diagnosticar PHA, que comprende un estándar de angiotensina II y un estándar de aldosterona.

20 En una realización, el kit puede comprender además un manual, uno o más disolventes, uno o más detergentes, y/o uno o más cartuchos de extracción en fase sólida.

En una realización, el manual comprende una descripción del procedimiento de acuerdo con la invención, en particular, una descripción de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente del procedimiento. En una realización, el kit comprende un estándar de angiotensina II marcado con isótopos y/o un estándar de aldosterona marcado con isótopos. En una realización, el kit comprende un anticuerpo de angiotensina II y/o un anticuerpo de aldosterona.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medición de la AA2R en plasma de pacientes hipertensos.

Prueba de infusión salina (SIT) y toma de muestras

30 Un paciente sin PHA y un paciente con PHA fueron sometidos a SIT. Los pacientes se sometieron a SIT de acuerdo con las pautas de la sociedad endocrina (John W. Funder et al.; J Clin Endocrinol Metab. September 2008, 93(9):3266-3281). En breve, se administraron dos litros de solución salina al 0,9% al paciente en el transcurso de 4 horas (prueba de infusión salina, SIT). Se tomaron muestras de sangre con EDTA y heparina antes (pre SIT) y después (post SIT) de la infusión salina de 4 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron en
35 una centrifuga enfriada a 3.000 g durante 10 minutos y se congelaron a -80 °C hasta el análisis por espectrometría de masas.

Medición de los niveles de equilibrio de Ang II

40 Los niveles de equilibrio de Ang II se determinaron mediante la cuantificación de los niveles de péptido de angiotensina en estado estacionario en muestras equilibradas de plasma con heparina. Por lo tanto, las muestras de plasma con heparina descongeladas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en un baño de agua. Después del equilibrado, los niveles de péptido de angiotensina en plasma se estabilizaron mediante la adición de inhibidores de proteasa y los niveles de péptido en equilibrio se cuantificaron posteriormente por espectrometría de masas. Por lo tanto, se añadió Ang II marcado con isótopos estables a las muestras de plasma estabilizadas a una concentración de 200 pg/ml para la estandarización interna. Tras la extracción en fase sólida en base a
45 C18, las muestras se sometieron a un análisis de espectrometría de masas utilizando una columna analítica de fase inversa (Acquity UPLC® C18, Waters) que funciona en línea con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo XEVO TQ-S (Waters) en modo MRM. Se midieron dos transiciones de masa diferentes por analito y estándar y las concentraciones se calcularon relacionando señales endógenas con señales estándar internas considerando los factores de respuesta correspondientes determinados por las curvas de calibración en plasma humano de control.
50

Medición de los niveles plasmáticos de aldosterona

Se añadió aldosterona marcada con isótopos estables a las muestras de plasma estabilizadas a una concentración de 500 pg/ml para la estandarización interna. Tras la extracción en fase sólida en base a C18, las muestras se sometieron a un análisis de espectrometría de masas utilizando una columna analítica de fase
55 inversa (Acquity UPLC® C18, Waters) que funciona en línea con un espectrómetro de masas de triple

cuadripolo XEVO TQ-S (Waters) en modo MRM. Se midieron dos transiciones de masa diferentes por analito y estándar y las concentraciones se calcularon relacionando señales endógenas con señales estándar internas considerando los factores de respuesta correspondientes determinados por las curvas de calibración en plasma en blanco humano.

5 Cálculo

Las concentraciones obtenidas de aldosterona se dividieron por las concentraciones obtenidas para Ang II en cada muestra de plasma.

Ejemplo 2: Medición de la AA2R en voluntarios sanos que reciben diferentes tratamientos antihipertensivos.

10 Tratamientos y recolección de muestras

Se administraron dosis únicas de tres fármacos antihipertensivos diferentes a 5 voluntarios sanos en 3 días de tratamiento diferentes, separados por una semana. 4 horas después de la administración de una dosis única de 10 mg de Enalapril (inhibidor de ACE), 50 mg de Losartan (ARB) o 150 mg de Aliskiren (inhibidor de renina), se recolectó sangre en heparina mediante punción venosa y el plasma se separó por centrifugación. Las muestras fueron congeladas a -80 °C hasta el análisis.

Medición de los niveles de equilibrio de Ang II

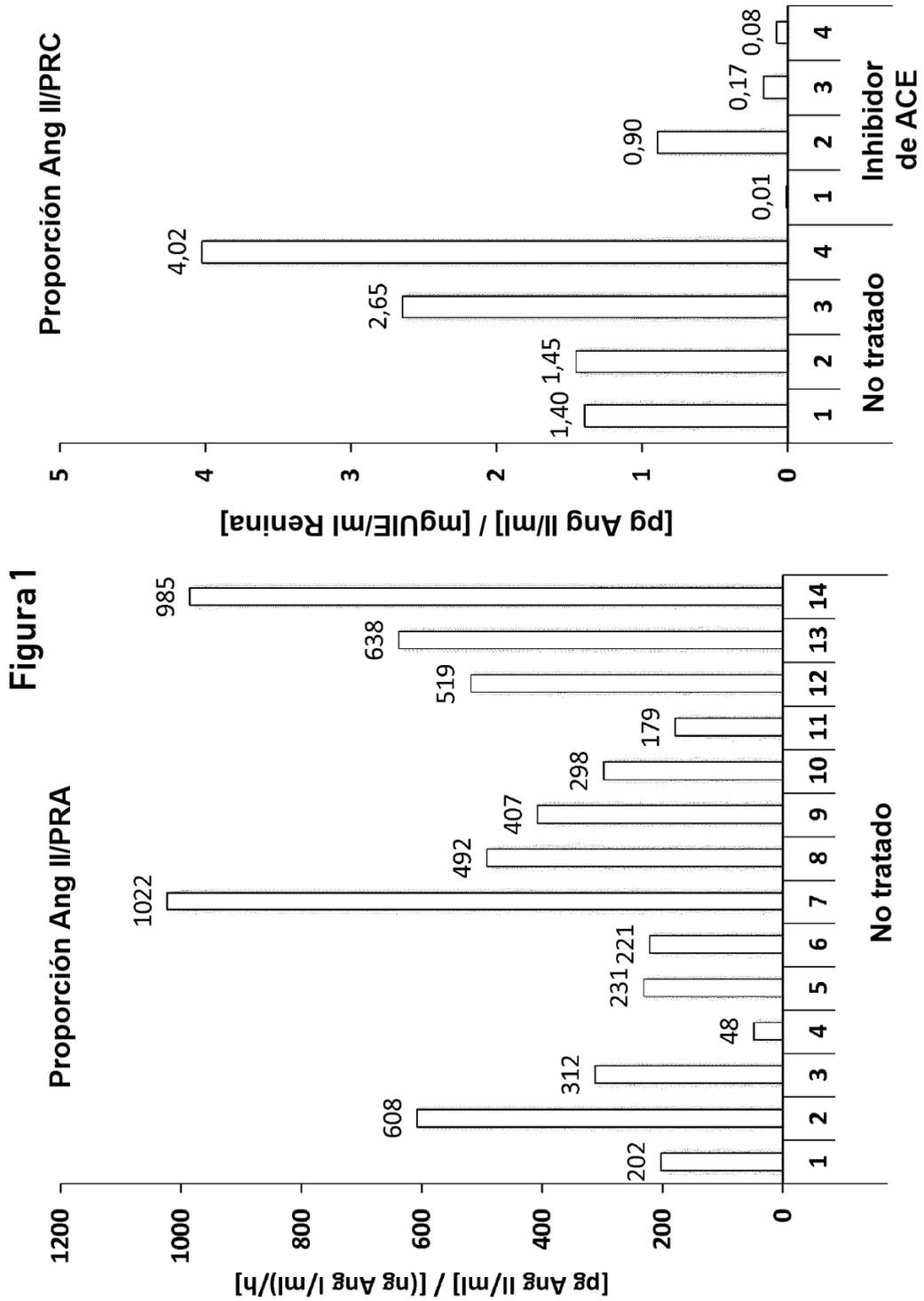
Los niveles de equilibrio de Ang II se determinaron mediante la cuantificación de los niveles de péptido de angiotensina en estado estacionario en muestras de plasma en heparina equilibradas. Por lo tanto, las muestras de plasma en heparina descongeladas se incubaron durante 60 minutos a 37 °C en un baño de agua. Después del equilibrado, los niveles de péptido de angiotensina en plasma se estabilizaron mediante la adición de inhibidores de proteasa y los niveles de péptido en equilibrio se cuantificaron posteriormente por espectrometría de masas. Por lo tanto, se añadió Ang II marcado con isótopos estables a las muestras de plasma estabilizadas a una concentración de 200 pg/ml para la estandarización interna. Tras la extracción en fase sólida en base a C18, las muestras se sometieron a un análisis de espectrometría de masas utilizando una columna analítica de fase inversa (Acquity UPLC® C18, Waters) que funciona en línea con un espectrómetro de masas de triple cuadripolo XEVO TQ-S (Waters) en modo MRM. Se midieron dos transiciones de masa diferentes por analito y estándar y las concentraciones se calcularon relacionando señales endógenas con señales estándar internas considerando los factores de respuesta correspondientes determinados por las curvas de calibración en plasma blanco humano.

30 Medición de los niveles plasmáticos de aldosterona

Se añadió aldosterona marcada con isótopos estables a las muestras de plasma estabilizadas a una concentración de 500 pg/ml para la estandarización interna. Tras la extracción en fase sólida en base a C18, las muestras se sometieron a un análisis de espectrometría de masas utilizando una columna analítica de fase inversa (Acquity UPLC® C18, Waters) que funciona en línea con un espectrómetro de masas de triple cuadripolo XEVO TQ-S (Waters) en modo MRM. Se midieron dos transiciones de masa diferentes por analito y estándar y las concentraciones se calcularon relacionando señales endógenas con señales estándar internas considerando los factores de respuesta correspondientes determinados por las curvas de calibración en plasma blanco humano.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario en un sujeto, que comprende medir el nivel de aldosterona y el nivel de angiotensina II (Ang II) en una muestra biológica del sujeto, en el que la muestra se incuba hasta que se alcanza un estado de equilibrio estable para angiotensina II, en el que la tasa de degradación global real de angiotensina II es igual a la tasa de formación global real de angiotensina II, el nivel de angiotensina II se mide en el estado de equilibrio estable y se calcula la proporción entre el nivel de aldosterona y el nivel de Ang II (proporción de aldosterona a angiotensina II, AA2R).
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una AA2R alta en comparación con la AA2R de uno o más sujetos sin PHA confirmado indica hiperaldosteronismo primario y/o una AA2R baja en comparación con la AA2R de uno o más sujetos con PHA confirmado no indica hiperaldosteronismo primario.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la proporción de valores entre uno o más sujetos con PHA positivo confirmado y uno o más sujetos con PHA negativo confirmado (el factor de discriminación) en base a la AA2R es más alto que entre los mismos conjuntos de datos en base a la ARR.
- 15 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la especificidad y/o la sensibilidad del procedimiento es más alto que la especificidad y/o la sensibilidad de la ARR en la misma cohorte de pacientes.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es de un sujeto bajo tratamiento antihipertensivo.
- 20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es de un sujeto tratado con una o más composiciones farmacéuticas que aumentan la concentración y/o actividad de renina.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es de un sujeto tratado con una o más composiciones farmacéuticas que disminuyen el poder de diagnóstico de la ARR.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la muestra es de un sujeto tratado con una o más composiciones farmacéuticas seleccionadas de inhibidores de renina, inhibidores de ACE, ACE2, diuréticos y/o bloqueadores de los canales de calcio.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la proporción indica que el tratamiento no disminuye el poder de diagnóstico de la AA2R, o disminuye el poder de diagnóstico de la AA2R en menor medida.
- 30 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto no se trata con bloqueadores del receptor de angiotensina (ARBs).
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento es un diagnóstico de una sola etapa y no requiere ninguna prueba de confirmación.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre.
- 35 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de los niveles se mide por espectrometría de masas; y/o en el que al menos uno de los niveles se mide por procedimientos de cuantificación basados en anticuerpos.



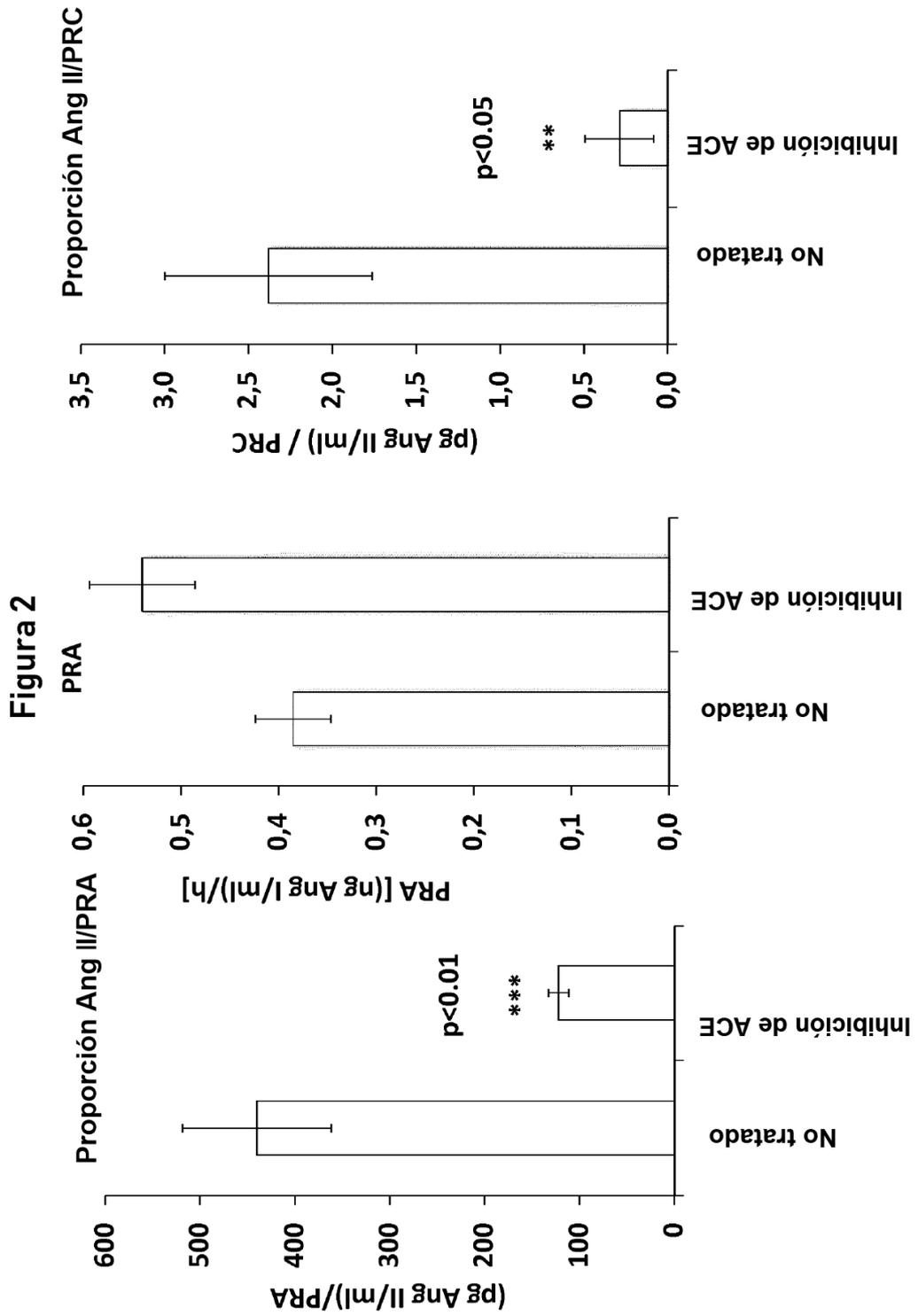


Figura 3

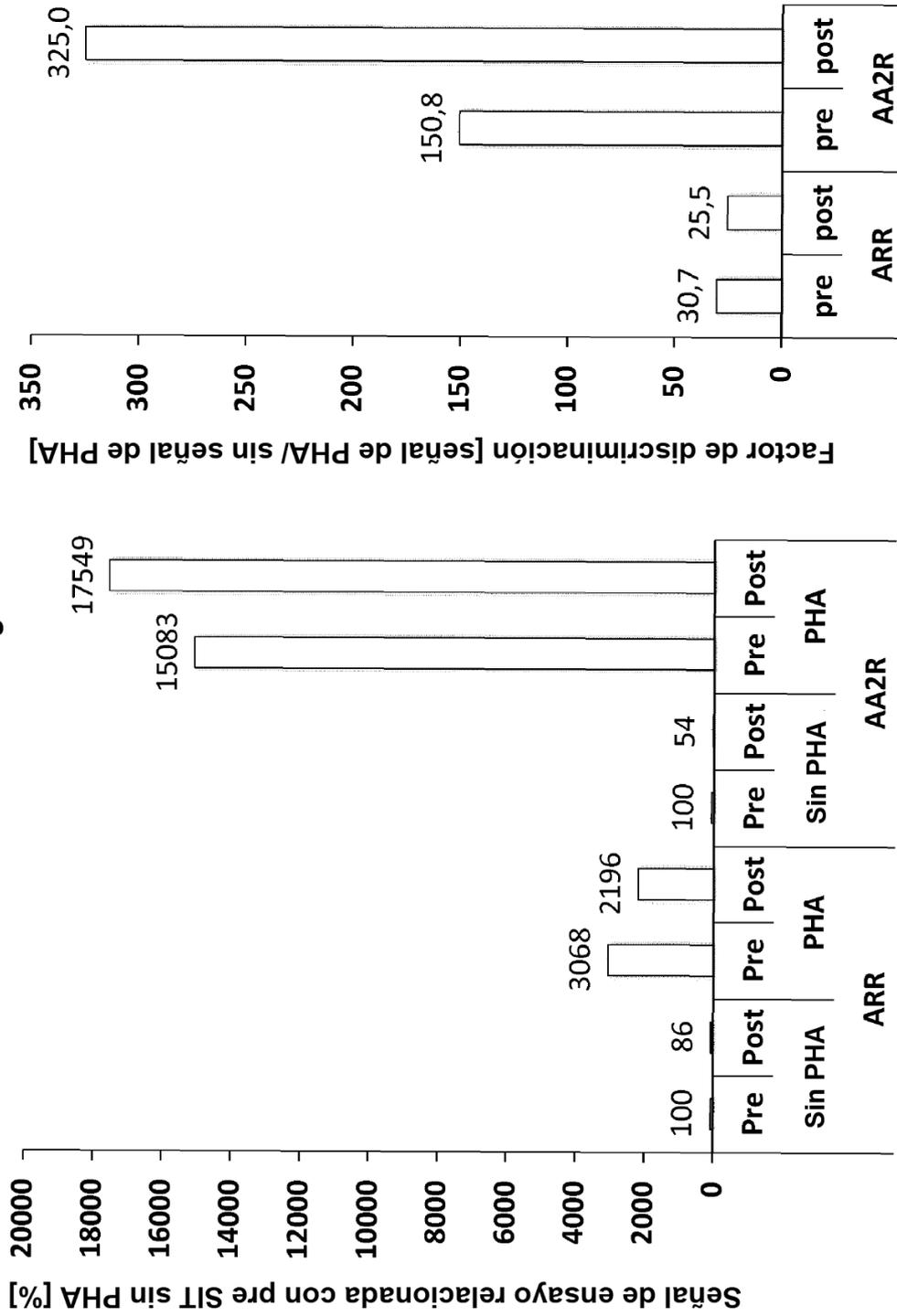


Figura 4

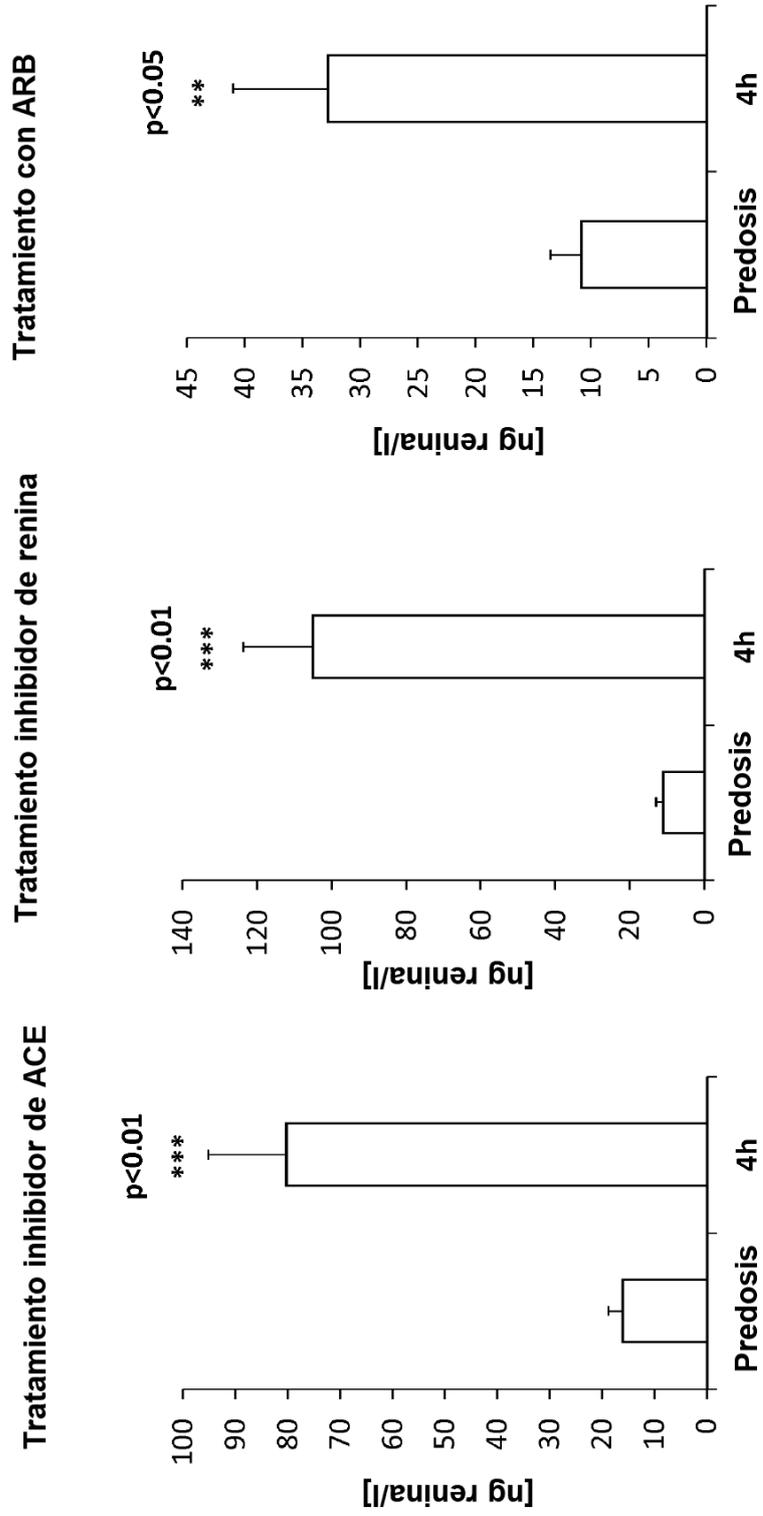


Figura 5

