

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 897**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013** **E 13168263 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** **EP 2664920**

54 Título: **Ensayo de inhibición basado en dilución**

30 Prioridad:

18.05.2012 HU 1200299

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

21.05.2020

73 Titular/es:

DEBRECENI EGYETEM (100.0%)

Egyetem tér 1

4032 Debrecen, HU

72 Inventor/es:

TÓTH, ATTILA;

FAGYAS, MIKLÓS;

PAPP, ZOLTÁN y

ÉDES, ISTVÁN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 761 897 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

Ensayo de inhibición basado en dilución

5 Campo de la invención

La descripción proporciona un proceso para evaluar el nivel de inhibición reversible de una enzima por un inhibidor, en particular en el campo de la evaluación de la eficacia de un tratamiento médico. Se probó la eficacia de un fármaco inhibidor enzimático reversible antihipertensivo. En particular, el método se probó en terapia con inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (iECA). La descripción también se refiere a usos de sustratos enzimáticos y kits para la evaluación del nivel de inhibición, así como un aparato diseñado para su uso en un proceso de la presente descripción.

15 Antecedentes de la técnica

Evidentemente, se ha planteado en la técnica el problema de evaluar la eficiencia o eficacia de las terapias con inhibidores enzimáticos. En estos métodos, en primer lugar, se establece una condición específica del experimento, en donde normalmente la actividad enzimática del paciente tratado se compara con el nivel de actividad "normal" de un grupo de control sano o un grupo control en donde la terapia es eficaz. Sin embargo, este método tradicional plantea varios problemas. Por ejemplo, puede ser necesario un grupo de sujetos de control, mientras que dichos sujetos necesariamente tienen diferentes propiedades fisiopatológicas (es decir, no padecen la misma enfermedad) y pueden mostrar variabilidad individual.

Otro problema que surge con frecuencia está relacionado con el cumplimiento del paciente. De manera específica, para supervisar un tratamiento se deben tomar varias muestras a lo largo del tiempo. Sin embargo, muchos pacientes no están dispuestos a visitar regularmente a un médico, lo que hace que esta evaluación sea muy poco fiable.

Por otra parte, la medición directa de la actividad está sujeta a propiedades individuales, incluyendo la variación genética que, sin embargo, no indica la eficacia de una terapia con inhibidores e incluso puede no estar relacionada. (Figura 8).

Otro método para supervisar si un tratamiento con una enzima es exitoso proviene de la determinación del nivel del inhibidor en el líquido corporal obtenido o proporcionado. Sin embargo, aunque este experimento informa sobre el nivel sanguíneo del fármaco, omite observar su acción real en el cuerpo. Pueden surgir problemas adicionales de la purificación preliminar, su disponibilidad para la enzima y que los métodos analíticos exactos son caros con respecto a tiempo y costes.

También pueden surgir problemas similares en todos los casos cuando se evalúa la eficacia de la inhibición de una enzima. Se han hecho varios intentos en la técnica para superar estas y otras dificultades similares.

En el documento US20040081957A1, se mide la cantidad de un inhibidor de la proteasa del VIH en su complejo con un conjugado. El ensayo se basa en la competencia del inhibidor conjugado y el inhibidor que se va a medir.

Fyhrquist F *et al.* han desarrollado un ensayo de unión a inhibidor para la medición del nivel de enzima convertidora de angiotensina usando un análogo de enalapril, el compuesto 351A que conserva la estabilidad de la sustancia original después de marcarse con ¹²⁵I. El nivel de la ECA se evalúa leyendo el recuento de radioactividad después de la unión del inhibidor y las diluciones se usan solo para tomar una curva patrón de referencia [Fyhrquist F. *et al.* "Inhibitor Binding Assay for Angiotensin-Converting Enzyme" Clin Chemistry, 1984 30(5) 696-700].

Grönhagen-Riska *et al.* usaron este ensayo de unión a inhibidor, basado en la unión específica de la ECA con un inhibidor radiomarcado, para desarrollar ensayos competitivos de unión a inhibidor para inhibidores de la ECA [Grönhagen-Riska C. *et al.* "Competitive inhibitor binding assay (CIBA) of ACE inhibitors", Acta. Med. Scand. Suppl., 1986, 714, 43-47.]. En este ensayo, se mide el nivel en suero de un inhibidor de la ECA añadiendo ECA a la muestra y la dilución se usa para minimizar el efecto de la actividad endógena de la ECA. En este ensayo no se usa dilución, sino otro inhibidor para medir la unión a inhibidor y todas las muestras de prueba se diluyen en la misma medida (mismo factor). Por otra parte, estos ensayos no son cinéticos (actividad enzimática) y no son adecuados para medir la actividad enzimática de la ECA.

En el documento WO2001085985A1, se mide la actividad de enzimas con especificidades de sustrato solapantes usando muestras de diluciones variables. Aunque puede evaluarse la eficacia de un tratamiento, se tomarán varias muestras en varios puntos temporales de los pacientes.

Aunque en el documento US6090570A se aplica dilución por un reactivo, se complementa un factor potencialmente defectuoso y se añade una variante eficaz que se une como un cofactor a la enzima para enmascarar el error genético.

En el documento WO2003025561A1, la relación de concentración de sangre-plasma y la relación de unión a proteínas

plasmáticas se miden simultáneamente en muestras de sangre diluidas de manera diferente. El método, sin embargo, es bastante complejo y parece que no se examina ningún par de inhibidores enzimáticos específicos.

5 En el documento PCT/US2001/045643 se describe un método para determinar el nivel de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina y la asociación del nivel de inhibición con la aparición de angioedema. El método es diferente de un simple ensayo basado en dilución.

10 En el documento EP02728295 se describe que la presencia de inhibidores puede mostrarse mediante una actividad mieloperoxidasa. Esta aplicación, sin embargo, no está relacionada con la presente invención.

15 Se describe un método para caracterizar una relación de inhibidor y enzima y caracterizarla mediante la determinación de la constante de inhibición, por ejemplo, en "Enzyme and transporter based drug-drug interactions" editado por K. Sandy Pang, A. David Rodrigues, Raimund M. Peter, Publicado por Springer, Nueva York, 2010, ISBN: 978-1-4419-0839-1. Véase página 188 y referencias citadas en la misma. En esta metodología, sin embargo, se han proporcionado constantes de inhibidor para el citocromo P 450 y se caracteriza la unión de los inhibidores. El método no se ha usado para la estimación del nivel del inhibidor en la muestra o la eficacia en la inhibición.

20 Lieberman *et al.* usaron un método espectrofotométrico para ensayar la ECA en suero y descubrieron que una dilución en suero con solución salina a 1:8 era aconsejable para una determinación precisa de la actividad enzimática para eliminar el aspecto no lineal del ensayo y el efecto de un inhibidor endógeno. Este nivel de dilución aumentó la actividad de la ECA en suero calculada en un factor de 1,5 a 3. Los autores señalan que las diluciones mayores de 1:8 aumentan en gran medida cualquier error que se produzca durante el ensayo y se consideran innecesarias [Lieberman J. y Sastre A. Chest 1986; 90: 869-75.].

25 En los métodos tradicionales basados en dilución para la determinación de la inhibición de una enzima, solo se cambia la concentración del inhibidor, mientras que en el presente método se diluyen tanto el inhibidor como la enzima.

30 Por tanto, todavía existe la necesidad de usar un método rápido y fiable para evaluar el nivel de inhibición reversible de una enzima por un inhibidor en un método de "muestra única" para evaluar la eficacia de las terapias con inhibidores enzimáticos en particular para aumentar la eficacia de las terapias basadas en medicamentos inhibidores enzimáticos.

35 Los presentes inventores han descubierto que la eficacia de una terapia con inhibidores enzimáticos puede evaluarse con una alta fiabilidad si se aplican factores de dilución suficientemente diferentes en un ensayo de actividad enzimática en partes alícuotas de una muestra tomada de un sujeto sometido a terapia.

Breve descripción de la invención

40 La invención se refiere a un proceso *in vitro* para evaluar la eficacia de la inhibición enzimática en la terapia con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en un sujeto que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de sangre o una muestra obtenida de sangre de un sujeto tratado con un inhibidor de la ECA;
- (b) tomar al menos dos partes alícuotas de la muestra;
- (c) diluir dichas partes alícuotas en diferentes factores de dilución,
- 45 (d) medir la actividad de la ECA en las muestras de dilución;
- (e) definir un factor de dilución alto donde el efecto del inhibidor de la ECA se vuelve insignificante, en donde dicho factor de dilución es al menos 50, preferentemente al menos 100;
- (f) definir un factor de dilución de referencia bajo, siendo dicho factor de dilución como máximo 10;
- (g) multiplicar los valores de actividad medidos en cada una de las muestras diluidas por el factor de dilución respectivo para obtener valores de actividad de la ECA calculados para cada muestra de dilución,
- 50 (h) obtener el nivel de inhibición de la ECA en la muestra original comparando los valores de actividad enzimática determinados en dichos factores de dilución bajos y altos en dichas muestras de dilución,
- (i) valorar la eficacia del tratamiento médico por el inhibidor de la ECA en dicho sujeto evaluando el nivel calculado de inhibición de la ECA, en donde una inhibición enzimática baja es una indicación de una terapia ineficaz y en donde una inhibición enzimática alta es una indicación de una terapia eficaz.

60 Preferentemente, el factor de dilución alto, en donde el efecto del inhibidor de la ECA es insignificante, es al menos 100 o al menos 200, preferentemente al menos 300 o al menos 350 o muy preferentemente al menos 400, y en donde el factor de dilución de referencia bajo es como máximo 20 o como máximo 10 o muy preferentemente como máximo 5 o como máximo 4, y/o la relación de factores de dilución es, por tanto, al menos 10 o preferentemente al menos 30 o al menos 70 o al menos al menos 100.

65 En una realización preferida, en la etapa (i) la inhibición enzimática se considera insuficiente en un sujeto que tiene un nivel de inhibición, proporcionado en porcentaje, inferior al 90 % y eficaz en un sujeto que tiene un nivel de inhibición de al menos 90 %, evaluando de este modo la eficacia de dicha terapia con inhibidor de la ECA en dicho sujeto.

Definiciones

5 Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un/a" y, si el contexto lo permite, "el" incluyen también formas plurales a menos que el contexto indique otra cosa.

"Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" con respecto al estado natural. Si una molécula o composición aparece en la naturaleza, se ha "aislado" si se ha cambiado y/o retirado de su ambiente original.

10 Debe interpretarse aquí que el término "comprende" o "comprendiendo" o "incluyendo" tiene un significado no exhaustivo y permite la adición o implicación de características o etapas del método o componentes adicionales a cualquier cosa que comprenda las características o etapas del método o componentes enumerados.

15 La expresión "que consiste esencialmente en" o "que comprende sustancialmente" debe entenderse como consistente en características o etapas del método o componentes obligatorios enumerados en una lista, por ejemplo, en una reivindicación, permitiendo al mismo tiempo contener adicionalmente otras características o etapas del método o componentes que no son afectan materialmente a las características esenciales del uso, método, composición u otra materia objeto. Debe entenderse que "comprende" o "comprendiendo" o "incluyendo" puede reemplazarse en el presente documento por "que consiste esencialmente en" o "que comprende sustancialmente" si fuera necesario sin la adición de materia nueva.

20 La expresión "fuente única" o muestras de una "fuente única" debe entenderse en el presente documento como que existe o ha existido una composición de materia a partir de la cual dichas muestras son o han sido tomadas o dichas muestras han sido preparadas u obtenidas a partir de muestras tomadas de dicha composición de materia, preferentemente esencialmente al mismo tiempo. Preferentemente, las muestras de una sola fuente tienen una composición esencialmente idéntica.

25 "Esencialmente al mismo tiempo" debe entenderse en el presente documento como lo suficientemente cercano en el tiempo para que la composición de la fuente única no haya cambiado esencialmente, es decir, todavía sea esencialmente idéntica.

30 "Composición esencialmente idéntica" de dos muestras, por ejemplo, dos muestras tomadas de una composición de materia en diferentes puntos temporales, significa que la composición de las mismas es suficientemente idéntica para realizar mediciones comparables de manera fiable en o a partir de las dos muestras.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Respuesta a la concentración para captopril en la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) de suero humano.

40 Las concentraciones crecientes de captopril antagonizaron la actividad de la ECA de suero humano de forma no lineal. El objetivo clínico del uso de inhibidores enzimáticos (tales como el inhibidor de la ECA captopril) es lograr un alto nivel de inhibición enzimática. Sin embargo, la dosis de los fármacos inhibidores enzimáticos está limitada por la aparición de efectos secundarios. Por lo tanto, la concentración de inhibidor (tal como ECA en este caso particular) se encuentra más probablemente en el nivel submáximo (marcado por el nivel intermedio en la figura) en la práctica clínica. Este intervalo se caracteriza por el hecho de que pequeños cambios en la concentración del inhibidor pueden provocar grandes diferencias en los efectos reales del inhibidor. Tomando el ejemplo que se muestra en la figura, se puede calcular que el nivel de inhibición de la ECA disminuye del 68 % al 30 % cuando la concentración de captopril disminuye de 30 nM a 3 nM (dilución de 10 veces), respectivamente.

Figura 2. Efecto de la dilución sobre la actividad de la ECA recombinante inhibida.

50 Se mezcló ECA recombinante con el inhibidor de la ECA captopril (0,1 nM, 10 nM y 100 nM, las concentraciones están indicadas), después se midió la actividad de la ECA en las soluciones sin diluir (1 vez) y diluidas (hasta 16 veces). Hubo pocos efectos de la dilución cuando la actividad de la ECA fue inhibida por una baja eficacia (por ejemplo, a 0,1 nM). Sin embargo, se observó un aumento robusto de la actividad de la ECA tras la dilución cuando captopril estaba presente en una concentración clínicamente más relevante (10 nM). Finalmente, el aumento robusto en la actividad de la ECA solo se observó a factores de dilución mayores (por ejemplo, 16 veces) en el caso de una dosis alta de captopril (100 nM).

Figura 3. Efecto teórico de la dilución del suero sobre la inhibición de la ECA humana por captopril.

60 La ecuación 1 describe un modelo general de inhibición enzimática reversible, en el que las actividades enzimáticas reales dependen del factor de dilución usado para generar muestras de reacción. Los valores teóricos de la actividad enzimática se calcularon a valores de dilución supuestos en el intervalo de 1 - 512. La concentración inicial de captopril se definió en un intervalo de 0 - 1000 nM (representado por los diferentes símbolos). La concentración en suero de la ECA se estimó basándose en los datos medidos presentados en la Figura 10. Los datos se ajustaron según la ecuación 1. La figura sugiere que el aumento de la actividad enzimática depende del factor de dilución, que puede definirse basándose en las propiedades predeterminadas (conocidas) (por ejemplo, K_i y cooperatividad) de la interacción enzima-inhibidor. En particular, el nivel de inhibición puede estimarse comparando valores de actividad enzimática a factores de dilución bajos (la enzima está en su forma unida al

inhibidor) y altos (la enzima está predominantemente en su forma libre y activa). El nivel de inhibición puede estimarse cuando la actividad enzimática determinada a un factor de dilución bajo se compara con la actividad enzimática a factores de dilución altos.

Figura 4. Inhibición calculada de la ECA en suero en pacientes hipertensos.

La aplicabilidad de los procesos reivindicados en la presente solicitud se demostró usando la enzima convertidora de angiotensina y pacientes tratados con sus inhibidores. La actividad de la ECA en suero se probó en muestras de sangre humana. Participaron pacientes hipertensos. Algunos de los pacientes estaban tomando inhibidores de la ECA (etiquetados con + inhibidor de la ECA), mientras que a otros pacientes no se les recetó inhibidor de la ECA (etiquetados como Control). Los símbolos representan la inhibición calculada de la ECA en suero que se muestra en pacientes individuales sin (control) y con terapia con inhibidor de la ECA. Los símbolos representan la media de las determinaciones y las barras muestran la desviación típica. Es evidente que hay algunos pacientes del grupo tratado con actividades de la ECA similares a las de los pacientes tratados, pero también es evidente que la mayoría de los pacientes a los que se habían recetado inhibidores de la ECA tenían actividades enzimáticas menores.

Figura 5. Diferentes niveles de inhibición de la ECA en suero en pacientes.

Cuando se evaluó el nivel de inhibición de la ECA mediante el método descrito en la presente solicitud, surgió un hallazgo sorprendente. Los pacientes no tratados mostraron una inhibición significativa (aproximadamente 75 %) sin tomar inhibidores de la ECA. Esto sugirió la presencia de un inhibidor reversible endógeno. Por otro lado, los pacientes con terapia con inhibidor de la ECA tendieron a tener un nivel mucho mayor de inhibición de la ECA. Los datos se han representado como una distribución de frecuencia (histograma). La línea representa el valor arbitrario elegido (90 %) que representa hipotéticamente el umbral para una terapia eficaz con inhibidor de la ECA.

Figura 6. La inhibición de la ECA determinada por el método de dilución se correlaciona con la diana clínica respectiva del tratamiento (tensión arterial).

La inhibición de la ECA se evaluó realizando el proceso descrito en la presente solicitud. La actividad de la ECA se determinó a diluciones de 4 y 400 veces de muestras de suero, además de la medición de la tensión arterial. La inhibición aparente de la ECA se calculó por la relación de los valores con diluciones de 400 veces y 4 veces. Se muestra la tensión arterial media de los pacientes con inhibición aparente de la ECA por debajo ($n=68$) o por encima ($n=318$) de 90 %. Las barras representan la media y el error típico de la media, mientras que los asteriscos representan la diferencia significativa entre los dos grupos ($p=0,003$). Se encontró que los pacientes con inhibición de la ECA aparentemente insuficiente tenían valores de tensión arterial mayores, lo que sugiere que la invención puede usarse eficazmente para estimar la eficacia clínica del tratamiento dirigido a una enzima con inhibidores reversibles.

Figura 7. Aumento de la actividad de la ECA exógena tras la dilución de los sueros.

El proceso descrito en la presente solicitud sugiere que los factores de dilución deseados pueden predeterminarse teniendo en cuenta la K_i predeterminada de un inhibidor y la respuesta de concentración del inhibidor sobre la actividad de una enzima. Se midió la actividad de la ECA exógena para determinar la inhibición de la ECA en los sueros de un paciente con tratamiento con inhibidor de la ECA. Los datos representan los resultados de 3 determinaciones (media \pm DT). Los resultados sugieren que la actividad de la ECA inhibida puede aumentar significativamente tras la dilución. En particular, la actividad de la ECA fue de aproximadamente 1 UA/ml sin dilución y aumentó a más de 100 UA/mg tras dilución alta (128 veces).

Figura 8. Diferencias en los conceptos de determinación de actividades enzimáticas

La eficacia de un tratamiento con inhibidor enzimático se caracteriza tradicionalmente por comparar las actividades enzimáticas de un grupo tratado (donde se espera la inhibición) con una población de control, donde no se espera inhibición. Después se establece un intervalo de referencia para la enzima basado en su actividad en la población de control y los valores de actividad enzimática se relacionan con este rango de referencia. Sin embargo, las personas no tratadas tienden a ser diferentes de los pacientes con una determinada enfermedad y la actividad de una enzima puede cambiar con la progresión de la enfermedad. Aquí los inventores compararon dos grupos de pacientes hipertensos según su medicación, el grupo control se definió como pacientes sin fármaco inhibidor de la ECA recetado (153 pacientes) mientras que el grupo tratado contenía individuos con inhibidor de la ECA recetado (387 pacientes). Resultó evidente que se encontró una variación significativa (una amplitud aproximada de 4 veces) en la actividad de la ECA del grupo de control sin tratar. Además, hubo un solapamiento del 20 % entre estos grupos, lo que hace muy incierto si el paciente tuvo una actividad basal de la ECA relativamente alta que se inhibió con éxito o el paciente tuvo inhibición insuficiente de la ECA.

Figura 9. Validación de la eficacia clínica de la invención descrita

Se contactó con los pacientes en los que la inhibición de la ECA fue inferior al 90 %, determinado a partir de muestras de sangre individuales según la presente invención. Se pidió a los pacientes que prestaran especial atención a su medicación, en particular para administrar adecuadamente el inhibidor de la ECA recetado y regresar para una segunda visita. En algunos casos, los pacientes tenían inhibición enzimática superior al 90 % en esta segunda visita. Se encontró una fuerte relación cuando su nivel de tensión arterial determinado estaba relacionado con la eficacia bioquímica definida de la medicación. En particular, la tensión arterial fue menor cuando la inhibición de la ECA fue superior al 90 %, en comparación con la tensión arterial de los mismos pacientes cuando la inhibición de la ECA fue inferior al 90 %. Se muestran los valores promedio (media \pm ETM).

Figura 10. Discordancia en la expresión y actividad de la ECA

La expresión de la ECA en suero se determinó mediante un ensayo ELISA, mientras que la actividad ECA en suero se determinó por hidrólisis de FAPGG en las mismas muestras. En paralelo, también se determinó el genotipo del paciente. Los pacientes con genotipo DD tenían una expresión de la ECA aproximadamente 58 % mayor en los

sueros en comparación con los pacientes con genotipo II, mientras que su actividad de la ECA en suero se vio significativamente menos afectada por el genotipo.

Figura 11. Indicaciones de un inhibidor endógeno

La discordancia entre la expresión y la actividad de la ECA puede estar relacionada con un método inapropiado para detectar ligeros cambios en la actividad de la ECA. La actividad de la ECA se midió mediante el sustrato artificial (FAPGG) y mediante el sustrato endógeno angiotensina 1. Se encontró una fuerte correlación entre las actividades determinadas por estos sustratos, lo que sugiere que la medición de la actividad basada en la hidrólisis de FAPGG fue apropiada. A continuación, se probó el efecto de la dilución sobre la actividad enzimática. Se encontró que la actividad calculada de la ECA en suero aumenta en paralelo con la dilución de una manera no lineal, en contraste con la actividad de la ECA cuando la enzima recombinante se probó sin componentes presentes en el suero. Esta observación sugirió que un inhibidor endógeno está presente en el suero, de acuerdo con las reivindicaciones de la presente solicitud.

Figura 12. Masa molecular del inhibidor endógeno de la ECA en el suero

Se filtraron muestras de suero de individuos sanos sin tratar a través de filtros que eran impermeables para proteínas superiores a 50 kDa o superiores a 100 kDa. No hubo ningún efecto de filtración a través del filtro de 50 kDa, pero la filtración a través del filtro de 100 kDa dio como resultado un cambio significativo en las actividades enzimáticas tras aumentar las diluciones. En particular, hubo una actividad significativamente mayor en las muestras filtradas (por ejemplo, filtro de 100 kDa) a bajas diluciones.

Figura 13. Inhibición de la ECA en suero por albúmina de suero

Los esfuerzos para identificar el inhibidor endógeno con una masa molecular de menos de 100 kDa y más de 50 kDa produjeron pruebas de una interacción directa entre la ECA de suero y la albúmina de suero. Primero se probó el efecto de la albúmina de suero sobre la ECA recombinante. Las concentraciones crecientes de albúmina de suero humano inhibieron la actividad de la ECA recombinante de una manera dependiente de la dosis, con un valor de K_i de 9,6 mg/ml. Teniendo en cuenta que el contenido de albúmina de los sueros humanos está en el intervalo de 40-60 mg/ml, la inhibición fisiológica de la ECA en suero puede explicarse por la presencia de la albúmina de suero. Para ensayar esta hipótesis, ECA se purificó de sueros humanos y se probaron los efectos de la albúmina de suero humano. La albúmina de suero humano inhibió la ECA de suero humano purificada de manera similar a la de la ECA recombinante. Finalmente, la descripción actual reivindica que la presencia de un inhibidor puede detectarse mediante la adición de enzima exógena a la mezcla de reacción. Esta reivindicación se probó realizando diluciones en serie de una muestra que contiene la ECA recombinante y la albúmina de suero humano. Se encontró un aumento robusto en las actividades de la ECA calculadas incluso en intervalos de dilución bajos (por ejemplo, a dilución de 2 veces y 8 veces).

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han creado un método rápido y sencillo para evaluar la eficacia de la inhibición de una enzima en una muestra apropiada. Según el presente método, no es necesario tomar una serie de muestras o tomar muestras múltiples veces y se realiza determinación a partir de una sola muestra tomada preferentemente de un paciente en una sola ocasión. Esto permite, por ejemplo, la evaluación de la eficacia de terapias con inhibidores enzimáticos, incluso sin supervisar el nivel de inhibidor en el paciente tomando muestras en múltiples ocasiones.

La relación de concentración-respuesta entre inhibidores y enzimas se caracteriza por una curva sigmoidea de concentración-respuesta, tal como se muestra en la Fig. 1, que representa las mediciones de los inventores. La figura muestra las fases importantes de la inhibición enzimática, relevantes para la presente invención: la inhibición es máxima en condiciones de saturación (cada molécula enzimática está unida a un inhibidor); se puede observar un nivel intermedio de inhibición en el caso de concentraciones menores de inhibidor; mientras que el inhibidor se vuelve ineficaz en caso de concentraciones aún menores (actividad enzimática máxima inalterada). Los efectos clínicos de los fármacos son habitualmente intermedios, por ejemplo, la inhibición de la diana es significativa, pero el nivel de antagonismo no alcanza la inhibición completa.

La base teórica de la observación es que la estabilidad de cualquier complejo de inhibidor-enzima reversible puede caracterizarse por una constante (K_i), mientras que las concentraciones reales de la enzima libre (E), el inhibidor libre (I) y el complejo de enzima-inhibidor (EI) se pueden calcular de la siguiente manera (ecuación 1):

$$K_i = (E \cdot I) / EI \quad (1)$$

También se puede calcular la relación de las concentraciones de la enzima inhibida (EI) a la concentración total de la enzima (E + EI), que representa el nivel real de inhibición (Inh) (ecuación 2):

$$Inh = EI / (E + EI) \quad (2)$$

La base de la presente invención es que parece ser teóricamente posible estimar la actividad enzimática máxima de una muestra aplicando una dilución suficientemente alta. En estas condiciones (alta dilución), las concentraciones de los complejos de enzima-inhibidor (EI) pueden ser insignificantes en comparación con la concentración de la enzima libre ($EI \ll E$). Tomando el ejemplo de un inhibidor reversible: si se miden las actividades enzimáticas en al menos dos diluciones de la misma muestra, entonces la muestra más concentrada proporciona la actividad enzimática inhibida

(Einh), mientras que la actividad enzimática determinada tras una dilución mayor de la misma muestra puede representar la actividad enzimática en condiciones en las que el inhibidor se disocia de la enzima, desenmascarando de este modo su actividad, que es similar a las que hay en ausencia del inhibidor (tal como cuando el mismo paciente no hubiera tomado su medicación). Como consecuencia, la actividad enzimática máxima de la muestra (Emáx, cuando E>>EI) puede estimarse en función de los valores determinados en condiciones diluidas (en estas condiciones, la mayoría de la enzima está presente en su forma activa (disociada)), mientras que el nivel real de inhibición enzimática (cuando está presente concentración significativa de EI) puede estimarse en la muestra menos diluida (en estas condiciones, una proporción significativa de la enzima está presente en su forma inhibida (complejo de enzima-inhibidor)).

Por lo tanto, el nivel real de inhibición reversible (Inh) dentro de una sola muestra puede estimarse según la ecuación 3:

$$\text{Inh} = \text{Einh}/\text{Emáx} \quad (3)$$

Los factores de dilución baja y alta se pueden determinar, por ejemplo, de la siguiente manera.

El factor de dilución alto se establece preferentemente en un valor en el que el efecto del inhibidor reversible se vuelve insignificante.

Para estimar el factor de dilución necesario, se prueban los efectos de un inhibidor seleccionado. En particular, se puede tomar la curva de concentración-respuesta para dicho inhibidor. Al ajustar los datos con un ajuste no lineal (curva) en función de la ecuación 1, se puede obtener la constante de estabilidad para la enzima.

Otros factores son las concentraciones apropiadas de la enzima y el inhibidor. La concentración de inhibidor se ve afectada por la cantidad de fármaco inhibidor enzimático en la muestra, así como el metabolismo del fármaco, interacciones fármaco-fármaco. Sin embargo, las concentraciones de inhibidores todavía están habitualmente limitadas con respecto a la concentración máxima, debido a la disponibilidad limitada de las píldoras que contienen el fármaco y efectos secundarios potenciales. Por tanto, se pueden estimar las concentraciones máximas de fármaco. La concentración de enzima se puede obtener experimentalmente.

Habiendo determinado algunos de los valores mencionados en las ecuaciones anteriores, es posible construir modelos para los efectos de la dilución. Por ejemplo, la ecuación 1 puede usarse para calcular los efectos de las diluciones sobre la actividad enzimática. Se pueden obtener valores para la actividad enzimática calculada [% de enzima activa (E) relacionada con la concentración total de enzima (E+EI)] en función del factor de dilución (que afecta a las concentraciones de los componentes de la solución (E, EI, I) a diferentes concentraciones iniciales de inhibidor, que abarcan el intervalo fisiológico completo (0,1 - 1000 nM) (Fig. 3).

De este modo, se pueden determinar los factores de dilución apropiados.

Por tanto, preferentemente, el factor de dilución alto en el caso de una muestra en la que la forma unida a inhibidor es insignificante es al menos 20 o al menos 30 o al menos 50 o al menos 100 o al menos 200, preferentemente al menos 300 o al menos 350 o muy preferentemente al menos 400.

Por tanto, preferentemente el factor de dilución bajo en el caso de una muestra en la que la forma activa se considera insignificante es como máximo 20 o como máximo 10 o muy preferentemente como máximo 5 o como máximo 4.

La relación de factores de dilución es por tanto al menos 10 o preferentemente al menos 30 o al menos 70 o al menos 100.

Con respecto a la invención, es fundamental usar tanta dilución como sea posible para estimar las actividades enzimáticas no inhibidas (máximas). Según la experiencia de los inventores, la inhibición puede estimarse con mucha precisión mediante valores a diluciones 1 y 512 veces (Tabla 1).

El presente proceso es una forma alternativa para determinar el nivel de inhibición reversible en muestras experimentales. La principal ventaja de este proceso es que puede usarse para evaluar directamente el nivel de inhibición reversible en una sola muestra, sin la necesidad de comparar los valores con ninguna otra muestra. Puede desearse evaluar directamente el nivel de inhibición reversible cuando no está disponible un control adecuado o son necesarios valores de inhibición exactos de una sola muestra. Estas aplicaciones pueden incluir pruebas de la eficacia de un medicamento que se dirige a inhibir una enzima mediante la administración de un inhibidor reversible de dicha enzima al nivel bioquímico. Los presentes inventores han ilustrado el método del proceso según la descripción del sistema de renina-angiotensina-aldosterona, en una configuración clínica, donde se ha evaluado la eficacia de la terapia con inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una metaloendopeptidasa de zinc que cataliza la conversión de angiotensina I a angiotensina II y participa en el metabolismo de otros péptidos como bradiquinina [Corvol P, Michaud

A, Soubrier F, Williams TA. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl* 1995;13:S3-10.]. ECA tiene dos isoenzimas: una forma somática y una testicular [Hubert C *et al.* *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-83.]. La secretasa de la ECA libera la forma somática de la ECA a la circulación [Oppong SY *et al.* *Biochem J* 1993; 292 (Pt 2): 597-603., Wei L *et al.* *J Biol Chem* 1991; 266: 5540-6.]. ECA es un miembro del sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), que es un regulador importante de la tensión arterial y la homeostasis del agua salada [Pfeffer MA *et al.* *N Engl J Med* 1992; 327:669-77].

Los inhibidores de la ECA representan uno de los moduladores terapéuticos más eficaces y habitualmente usados de RAAS. Los inhibidores de la ECA redujeron significativamente la mortalidad en miles de pacientes en diversas patologías cardiovasculares. En particular, los inhibidores de la ECA, según varios megaensayos, reducen el riesgo de muerte cardiovascular, infarto de miocardio no letal o paro cardíaco en enfermedad cardíaca coronaria estable [Fox KM. *Lancet* 2003; 362: 782-8.], mejoran el pronóstico [ensayo GISSI-3. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 337-44.] y reducen la mortalidad a las 5 semanas [ensayo ISIS-4, *Lancet* 1995; 345: 669-85.] después de infarto de miocardio. Estos fármacos reducen la mortalidad por insuficiencia cardíaca [Cohn JN, *et al.* *N Engl J Med* 1991; 325: 303-10.] e inhiben la remodelación ventricular izquierda [Greenberg B *et al.* *Circulation* 1995; 91: 2573-81.]. Los inhibidores de la ECA retardan la manifestación de la hipertensión [Luders S, *et al.* *J Hypertens* 2008; 26: 1487-96.] y reducen el índice de masa ventricular izquierda en la hipertrofia ventricular izquierda [Cuspidi C *et al.* *J Hypertens* 2002; 20: 2293-300.]. También se sabe que reducen la incidencia de microalbuminuria y el riesgo de nefropatía diabética en la diabetes de tipo 2 [Ruggenti P, *N Engl J Med* 2004; 351: 1941-51.] y reducen adicionalmente la probabilidad de diabetes mellitus de nuevo diagnóstico [Hoogwerf BJ, *et al.* *Cleve Clin J Med* 2000; 67: 287-93.]. Estos ensayos clínicos sugirieron fuertemente un papel prominente de RAAS incluyendo ECA en el mecanismo patológico de estas enfermedades. Se realizaron estudios para estudiar la relación entre la expresión de la ECA en patologías cardiovasculares. Se descubrió que la expresión de la ECA está controlada por un polimorfismo de inserción/supresión (I/D) en el gen de la ECA [Rigat B *et al.* *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.]. En consecuencia, la mayor cantidad de la ECA producida en presencia del alelo D se consideró como un factor de riesgo cardiovascular [Cambien F *et al.* *Nature* 1992; 359: 641-4.; Staessen JA *et al.* *J Hypertens* 1997; 15: 1579-92.].

Cientos de estudios probaron el valor de los genotipos de la ECA en la evaluación de riesgos y la optimización de la terapia con inhibidor de la ECA. Estos esfuerzos dieron como resultado la confirmación del papel del genotipo en la expresión de la ECA (los pacientes con genotipo DD parecen tener 1,5 veces [Rigat B *et al.* *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.] más expresión de la ECA en suero que los pacientes con genotipo II), pero en general no logró proporcionar una correlación positiva de la expresión de la ECA en suero y enfermedades cardiovasculares, incluso si la inhibición de la ECA parece ser una opción de tratamiento exitosa.

Estos datos sugieren que las diferencias en la expresión de la ECA son bien toleradas a nivel individual, respaldado adicionalmente por el hecho de que el alelo D es el más frecuente (50 %) [Lindpaintner K. *et al.* *N Engl J Med* 1995; 332: 706-11.] y evolutivamente no suprimido.

El objetivo del estudio de los inventores fue identificar la relación entre el genotipo de la ECA, y la expresión de una actividad fisiológica. Realizando el proceso reivindicado en la presente invención, los inventores descubrieron que la actividad de la ECA está controlada por un inhibidor endógeno, que suprime la actividad de la ECA en suero en al menos 75 % en seres humanos, amortiguando la actividad de la ECA en un amplio intervalo de niveles de expresión.

Ejemplos

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina endógena (ECA) se midió en sueros extraídos de un voluntario sano tras la adición *in vitro* de dosis crecientes del inhibidor de la ECA captopril y la relación de concentración-respuesta ilustrada en la Fig. 1. Se ve claramente que la inhibición es máxima en condiciones de saturación, mientras que el inhibidor se vuelve ineficaz en caso de concentraciones aún menores (actividad enzimática máxima inalterada). Los efectos clínicos de los fármacos son habitualmente intermedios, por ejemplo, la inhibición de la diana es significativa, pero el nivel de antagonismo no alcanza la inhibición completa.

La viabilidad del método se probó al principio cuando la ECA recombinante se mezcló con un inhibidor de la ECA (captopril) y después se diluyó en serie (Fig. 2). Los resultados han demostrado la viabilidad del método. La dilución de las mezclas dio como resultado un aumento aparente de la actividad de la ECA, que representa la disociación del inhibidor (I) y la enzima (E) y, por lo tanto, disminuye la concentración de la ECA inhibida (EI). Por otra parte, también resultó evidente que el aumento de la actividad aparente de la ECA está relacionado con el nivel de inhibición: no hay ningún cambio en la actividad de la ECA cuando la inhibición inicial es insignificante (concentración de captopril 0,1 nM), hay un aumento robusto incluso a factores de dilución bajos cuando la dosis inicial de inhibidor está cerca de su Kd (p. ej. resultados en el caso de captopril 10 nM) y, finalmente, aumentar la concentración inicial del inhibidor a niveles de inhibición máximos (por ejemplo, captopril 100 nM) requiere factores de dilución altos (más de 16 veces) para desenmascarar la actividad enzimática (Fig. 2).

A continuación, el método fue probado en un entorno real, en particular en un escenario clínico.

Estimación de la inhibición de una enzima endógena

Determinación del factor de dilución donde el efecto del inhibidor reversible se vuelve insignificante.

5 En el caso de la terapia con inhibidor de la ECA, el efecto es la inhibición de la actividad de la ECA, que se supone que se caracteriza por la ecuación 1.

10 Para estimar el factor de dilución necesario, se probaron los efectos de un inhibidor seleccionado sobre la actividad de la ECA. En particular, la concentración-respuesta para que captopril inhiba la actividad de la ECA, se muestra en la Fig. 1. Al ajustar los datos con un ajuste no lineal (curva) basado en la ecuación 1, la constante de estabilidad para el complejo ECA-captopril en suero humano (K_i) es 14,8 nM.

15 Otros factores importantes son las concentraciones apropiadas de la enzima (ECA) y el inhibidor (por ejemplo, captopril). La concentración de inhibidor se ve afectada por la cantidad de fármaco inhibidor de la ECA tomado, el metabolismo del fármaco, interacciones fármaco-fármaco, etc., un conjunto completo de razones para investigar la eficacia. Sin embargo, las concentraciones de inhibidores todavía están habitualmente limitadas con respecto a la concentración máxima, debido a la disponibilidad limitada de las píldoras que contienen el fármaco y efectos secundarios potenciales. Por lo tanto, se puede estimar que las concentraciones máximas de fármaco no son mucho mayores de lo necesario para inhibir completamente la ECA. En el caso de captopril, aparece en el intervalo de 100 nM - 1000 nM.

20 La concentración de la ECA se ha estimado mediante la medición directa del contenido de ECA del plasma humano extraído de 110 voluntarios. La concentración en suero de la ECA fue de 155 ± 6 ng/ml (0,86 nM).

25 Habiendo definido algunos de los valores mencionados en las ecuaciones de la descripción, es posible construir modelos para los efectos de la dilución. En este caso particular, la ecuación 1 se ha usado para calcular los efectos de las diluciones en la actividad de la ECA. Parámetro variable: concentración de inhibidor, parámetros y valores constantes: Concentración de la ECA = 0,86 nM; K_i = 14,8 nM. Se pueden obtener valores para la actividad de la ECA calculada (% de enzima activa (E) relacionada con la concentración total de enzima (E+EI)) en función del factor de dilución (que afecta a las concentraciones de los componentes de la solución (E, EI, I) a diferentes concentraciones

30 iniciales de inhibidor, que abarcan el intervalo fisiológico completo (0,1 - 1000 nM) (Fig. 3).

35 Parece que la dilución donde la forma inhibida (unida a inhibidor) de la ECA se vuelve insignificante en comparación con la ECA libre (actividad máxima, disociada) está en el intervalo de 128-512 veces, dependiendo de las concentraciones esperadas del captopril.

Por tanto, preferentemente el factor de dilución alto en el caso de una muestra en la que la forma unida a inhibidor es insignificante es al menos 200, preferentemente al menos 300 o al menos 350 o muy preferentemente al menos 400.

40 Por tanto, preferentemente el factor de dilución bajo en el caso de una muestra en la que la forma activa se considera insignificante es como máximo 20 o como máximo 10 o muy preferentemente como máximo 5 o como máximo 4.

La relación de factores de dilución es por tanto al menos 10 o preferentemente al menos 30 o al menos 70 o al menos 100.

45 Es importante tener en cuenta que, con respecto a la invención, es fundamental usar tanta dilución como sea posible para estimar las actividades enzimáticas no inhibidas (máximas). De hecho, la inhibición se puede estimar con mucha precisión mediante valores a diluciones de 1 y 512 veces (Tabla 1). Esta consideración teórica ha sido probada en una configuración clínica donde los pacientes fueron tratados con diversos inhibidores de la ECA. Se confirmó que los factores de dilución sugeridos son suficientes para determinar la inhibición de la ECA.

50

Tabla 1. Valores teóricos para la inhibición de la actividad de la ECA

	Inhibición estimada a dilución 1 y 512 (% de desinhibido)	Inhibición estimada a dilución 4 y 400 (% de desinhibido)	Inhibición teórica (% de desinhibido)
Sin captopril	0	0	0
0,1 nM; captopril	0,7	0,2	2,7
1 nM; captopril	6,3	1,6	8,2

(continuación)

	Inhibición estimada a dilución 1 y 512 (% de desinhibido)	Inhibición estimada a dilución 4 y 400 (% de desinhibido)	Inhibición teórica (% de desinhibido)
10 nM; captopril	40,2	14,3	41,5
100 nM; captopril	86,9	62,2	87,4
1000 nM; captopril	98,3	93,5	98,6

El nivel de inhibición se calcula según el método descrito en la Fig. 2. También se proporcionan valores para la inhibición cuando la actividad se mide a diluciones de 1, 4, 400 y 512 veces.

5 Configuración de un ensayo para medir la actividad enzimática

La actividad de la ECA debe medirse con precisión incluso después de diluciones de hasta 512 veces. El desarrollo de métodos para determinar la actividad enzimática puede no ser fácil. En particular, su precisión puede estar inversamente relacionada con el coste de la determinación. La conclusión en lo que respecta a la invención es medir la actividad enzimática sin inhibición significativa en presencia de un inhibidor. Esto requiere un factor de dilución alto. Se probaron varios métodos de ensayo para llevar a cabo la invención. Finalmente, se usó un método fotométrico descrito originalmente por Simonetta Ronca-Testoni (Clinical Chemistry (1986), 29(6), 1093-1096) y se optimizó para el equipo de los inventores.

15 Se proporciona una descripción detallada del ensayo en la sección de Métodos (ensayo de actividad de la ECA).

Este método fue adecuado para determinar con precisión las actividades enzimáticas en un intervalo de sueros diluidos de 4 a 400 veces. Aunque el cálculo basado en las actividades con dilución de 4 y 400 veces tiende a subestimar la inhibición, los valores obtenidos pueden usarse para evaluar la eficacia del tratamiento.

20

Tabla 2. Determinación de la inhibición de la ECA en suero en muestras de sangre individuales

Código del paciente	Actividad de la ECA				Relación de actividad (%)	Inhibición (%)
	dilución 4 veces		dilución 400 veces			
	Medida	Calculada	Medida	Calculada		
A 02	1,46	5,83	0,37	147,3	4,0	96
A 03	2,14	8,57	0,51	202,41	4,2	95,8
A 04	1,15	4,61	0,52	208,54	2,2	97,8
A 05	4,64	18,56	0,37	149,61	12,4	87,6
A 06	1,99	7,98	0,38	153,64	5,2	94,8
A 08	2	8,02	0,47	189,14	4,2	95,8
A 10	0,65	2,62	0,3	120,71	2,2	97,8
A 11	0,66	2,66	0,5	198,27	1,3	98,7
A 14	1,56	6,22	0,35	141,28	4,4	95,6
A 17	1,35	5,38	0,32	127,78	4,2	95,8
A 18	0,45	1,81	0,42	167,66	1,1	98,9
A 20	2,58	10,33	0,21	85,23	12,1	87,9
A 21	1,15	4,59	0,26	102,05	4,5	95,5
A 25	0,42	1,7	0,32	128,1	1,3	98,7
A 27	1,22	4,89	0,44	174,45	2,8	97,2
A 29	0,76	3,05	0,33	131,27	2,3	97,7
A 30	1,11	4,44	0,6	239,22	1,9	98,1
A 32	0,56	2,23	0,35	140,06	1,6	98,4
A 33	1,63	6,52	0,41	162,98	4,0	96,0
A 34	0,38	1,53	0,19	75,45	2,0	98,0
A 35	8,17	32,67	0,39	156,49	20,9	79,8
A 37	2,4	9,62	0,36	144,62	6,7	93,3
A 38	0,65	2,62	0,32	129,55	2,0	98,0
A 39	1,15	4,61	0,39	157,53	2,9	97,1
A 44	0,65	2,61	0,18	70,97	3,7	96,7
A 47	3,28	13,13	0,35	141,09	9,3	90,7
A 50	9,45	37,82	0,37	146,56	25,8	74,2
A 51	0,59	2,35	0,38	151,74	1,5	98,5
A 52	0,63	2,51	0,4	159,04	1,6	98,4

(continuación)

Código del paciente	Actividad de la ECA				Relación de actividad (%)	Inhibición (%)
	dilución 4 veces		dilución 400 veces			
	Medida	Calculada	Medida	Calculada		
A 53	0,5	1,98	0,43	173,97	1,1	98,9
A 55	1,16	4,62	0,41	163,83	2,8	97,2
A 56	10,53	42,1	0,47	187,48	22,5	77,5
A 61	4,36	17,45	0,32	129,46	13,5	86,5
A 65	0,53	2,11	0,32	126,19	1,7	98,3
A 66	3,68	14,74	0,36	144,26	10,2	89,8
A 67	0,99	3,97	0,39	154,32	2,6	97,4
A 69	3	11,99	0,38	152,39	7,9	92,1
A 70	6,57	26,27	0,41	165,44	15,9	84,1
A 71	1,56	6,23	0,28	113,87	5,5	94,5
A 72	9,63	38,52	0,24	95,92	40,2	59,8
A 73	0,25	1,02	0,13	50,87	2,0	98,0

Validación del método en muestras clínicas

5 Se reclutaron 539 pacientes en el estudio. Todos los pacientes han tomado terapia antihipertensiva, que incluía inhibidores de la ECA en 386 pacientes. Los datos experimentales de los primeros 50 pacientes se muestran en la Tabla 2. Las actividades enzimáticas medidas se multiplicaron por el factor de dilución (4 o 400) para estimar las actividades en la muestra con inhibición (dilución de 4 veces, donde ECA está presente en su forma unida a inhibidor (EI) y en su forma libre (E)) y después de disminuir el efecto inhibitor a un nivel insignificante (dilución de 400 veces, donde la concentración del complejo de ECA-inhibidor (EI) es insignificante en comparación con la enzima libre (E)). Usando estos valores, se estimó el nivel de inhibición según la ecuación 3.

15 Se midió la actividad de la ECA en suero humano en pacientes hipertensos a diluciones de 4 veces y 400 veces. Los datos en bruto de la actividad enzimática se han multiplicado por el factor de dilución (4 o 400) para calcular la actividad de la ECA en el suero. La relación de estas actividades proporciona una estimación del nivel de inhibición de la ECA dentro de la muestra analizada.

Establecimiento de una relación entre los valores determinados y la eficacia clínica de la terapia

20 Realización de las mediciones y cálculos en muestras clínicas

25 Para llevar a cabo la invención, los inventores han usado los valores obtenidos de los pacientes que no estaban tomando fármacos inhibidores de la ECA. Obsérvese que la invención teóricamente sugiere un ensayo sorprendentemente robusto para determinar la eficacia con respecto a las muestras no tratadas. Por ejemplo, los pacientes sin inhibidor de la ECA deberían tener una diferencia muy pequeña en las actividades normalizadas determinadas a una dilución de 4 veces en comparación con los valores determinados a una dilución de 400 veces (la inhibición calculada debería ser $0 \pm$ error del método experimental). Por el contrario, los pacientes con terapia eficaz con inhibidor de la ECA deben tener actividades menores a una dilución de 4 veces en comparación con una dilución de 400 veces. Sorprendentemente, el nivel de inhibición fue del 72 ± 7 % (promedio \pm DT) en el grupo de control, que es mucho mayor que el promedio esperado de o cercano a 0 (Fig. 4).

Identificación de seroalbúmina humana como un inhibidor endógeno

35 En función de la presente invención, esta es una prueba de la presencia de un inhibidor endógeno de la ECA en el suero humano. También es una indicación adicional de la importancia y el rendimiento del método de la invención, ya que este enorme nivel de inhibición endógena no se ha revelado en las últimas décadas de investigación intensiva que han conducido a la introducción exitosa de fármacos inhibidores de la ECA en la práctica cardiovascular como piedra angular de la terapia médica. No obstante, los datos de los inventores sugieren que la actividad de la ECA en suero se inhibe de manera dominante (nivel de inhibición $72,3 \pm 0,6$ %) en condiciones fisiológicas.

40 También se encontró que el genotipo de la ECA tiene un efecto limitado sobre la actividad de la ECA en contraste con la expresión de la ECA. La presencia de un inhibidor endógeno que amortigua las variaciones en la cantidad de la ECA también proporciona una explicación a este hecho.

45 Se realizaron intentos de identificar este inhibidor endógeno potencial de la ECA. Las muestras de suero se ultrafiltraron a través de dispositivos de filtro de diferentes tamaños de poro. (Figura 12) No se encontró ningún efecto de filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 50 kDa. Por el contrario, filtrar a través de una membrana con un tamaño de poro de 100 kDa dio como resultado actividades de la ECA significativamente elevadas en las

diluciones de 4 a 32 veces en comparación con el control.

En un experimento, la ECA se reticuló con proteínas de interacción en sueros del paciente y se detectaron aductos que comprendían seroalbúmina humana y ECA (datos no mostrados). A continuación, se probaron los efectos de HSA en la actividad de la ECA. (Figura 13) HSA inhibió la actividad de la ECA humana recombinante con una concentración inhibitoria semimáxima de 9,6 mg/ml. Es importante tener en cuenta que la inhibición máxima fue del 95 % (inhibición parcial) a 64 mg/ml de HSA. (Figura 13/A) La actividad de la ECA en suero purificado también fue inhibida por HSA (Figura 13/B) con un valor de CI50 de 6,1 mg/ml. La inhibición máxima fue del 95 % a 64 ng/ml. Finalmente, la actividad de la ECA recombinante fue inhibida por el suero humano. (Figura 13/C) La dilución dio como resultado un aumento de la actividad de la ECA exógena, similar a los resultados con ECA endógena (Figura 11/B).

Por tanto, si el nivel de inhibición por HSA se va a evaluar mediante el método de la invención, los factores de dilución deberían establecerse preferentemente de la siguiente manera.

El factor de dilución alto en el caso de una muestra en la que la forma unida a inhibidor es insignificante es al menos 5, preferentemente al menos 8 o al menos 10 o muy preferentemente al menos 12, 16 o 20.

El factor de dilución bajo en el caso de una muestra en la que la forma activa se considera insignificante es como máximo 3 o como máximo 2,5 o muy preferentemente como máximo 2.

La relación de factores de dilución es por tanto al menos 3 o preferentemente al menos 4 o al menos 5 o al menos 8.

Hubo indicios en la técnica de que puede existir un inhibidor endógeno pero no se ha identificado. Kramers *et al* presentaron una mutación puntual en la región del tallo del gen de la ECA, por la que la cantidad de ECA en circulación se eleva de manera drástica (5 veces) [Kramers C, *et al*. *Circulation* 2001; 104: 1236-40.]. Esta mutación afecta al menos a ocho familias, pero estos miembros tampoco padecen anomalías clínicas o hipertensión. HSA quizás previene en ellos los posibles efectos de una cantidad de ECA extremadamente alta. Nesterovitch *et al*. publicaron otra mutación con una concentración de la ECA 13 veces mayor en el suero, pero no pudieron vincularla a ninguna enfermedad [Nesterovitch AB *et al*. *PLoS One* 2009; 4: e8282.]. Hay algunas otras mutaciones del gen de la ECA que se combinan con una cantidad de ECA levemente elevada, pero en esos casos ni siquiera se observaron enfermedades cardiovasculares [Semmler A, *et al*. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1088-9.; Linnebank M, *et al*. *Neurology* 2003;61:1819-20.; Eyries M *et al*. *J Biol Chem* 2001;276:5525-32.].

La enzima convertidora de angiotensina en suero está patológicamente elevada en algunas enfermedades granulomatosas (p. ej., sarcoidosis) y su relación con la enfermedad de Gaucher se ha descrito previamente [Lieberman J *et al*. *N Engl J Med* 1976; 294: 1442-4. Studdy P, *et al*. *Lancet* 1978;2:1331-4.]. A pesar de su mayor cantidad de ECA, la incidencia de enfermedades cardiovasculares no difiere de la de la población sana.

La albúmina en suero influye no solo en la ECA en circulación sino también en la forma unida a membrana. Este hallazgo es apoyado por grupos de trabajo de Danser y van Dijk, que examinaron *in vivo* la conversión de angiotensina I en antebrazos humanos de pacientes con genotipos diferentes [Danser AH *et al*., *J Hypertens* 1999; 17: 1867-72.; van Dijk MA, *et al*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 484-90.]. En estos estudios, se descubrió que la conversión local de angiotensina I a angiotensina II era independiente del genotipo I/D y la relación de angiotensina II/I era similar en pacientes con II, ID o DD. Anteriormente, más grupos de trabajo han propuesto la existencia de un inhibidor endógeno de la ECA, pero no pudieron establecer su naturaleza. Lieberman *et al*. recomendaron habitualmente la dilución del suero antes de medir la actividad de la ECA para eliminar el efecto del inhibidor endógeno. Descubrieron que el inhibidor es una proteína de su naturaleza, que tiene un peso molecular superior a 50 kDa [Lieberman J. y Sastre A. *Chest* 1986; 90: 869-75.].

Definición de valores de inhibidor que representan inhibición clínicamente eficaz

Los fármacos inhibidores de la ECA deberían aumentar el nivel de inhibición de la ECA en suero incluso en presencia del inhibidor endógeno. De hecho, la inhibición estimada de la ECA en suero en pacientes que toman fármacos inhibidores de la ECA fue de 93±8 %, de acuerdo con las predicciones de la descripción (Fig. 4). Esta diferencia sustancial (72 % en pacientes sin terapia con inhibidor de la ECA frente a 93 % en pacientes con terapia con inhibidor de la ECA) sugiere que la eficacia de la terapia con inhibidor de la ECA puede incluso evaluarse independientemente de la presencia de un inhibidor endógeno. Si los datos que representan los valores individuales para los pacientes se representan como un histograma, los dos grupos de pacientes (p. ej., pacientes con o sin terapia con inhibidor de la ECA) son distinguibles (Fig. 5) con una nitidez sorprendente. En la Fig. 5, se han representado datos mostrados en la Fig. 4 como distribución de frecuencia (histograma). La línea representa el valor elegido (90 %) que representa el umbral para una terapia eficaz con inhibidor de la ECA. Aunque este valor es algo arbitrario y puede ser menor o mayor con un pequeño porcentaje, esto afectaría solo a algunos pacientes que pertenecen a un grupo limítrofe. De lo contrario, los pacientes están claramente separados en dos grandes grupos que comprenden aquellos en los que la inhibición es suficiente y aquellos en los que no.

La distribución de frecuencias en la Fig. 5. muestra claramente que la inhibición endógena en pacientes sin terapia

con inhibidor de la ECA (n=158) está limitada al intervalo de 46 a 87 %. Por el contrario, la mayoría de los pacientes que tomaban fármacos inhibidores de la ECA tenían niveles mayores de inhibición (n=383). Por lo tanto, la eficacia clínica de la inhibición de la ECA en suero puede establecerse teóricamente mediante el método descrito en la invención. Los inventores han probado esto eligiendo una inhibición del 90 % como umbral para la inhibición de la ECA en suero clínicamente significativa (Fig. 5).

Relación con la tensión arterial

A continuación, la inhibición de la ECA se determinó mediante el método de dilución que se correlaciona con la tensión arterial (Fig. 6). La actividad de la ECA se determinó a diluciones de 4 y 400 veces de muestras de suero, además de la medición de la tensión arterial. La inhibición aparente de la ECA se calculó por la relación de los valores con diluciones de 400 veces y 4 veces. Se muestra la tensión arterial media de los pacientes con inhibición aparente de la ECA por debajo (n=68) o por encima (n=318) de 90 %. Las barras representan la media y el error típico de la media, mientras que los asteriscos representan la diferencia significativa entre los dos grupos ($p=0,003$).

El efecto observado del tratamiento con inhibidor de la ECA para disminuir la tensión arterial estuvo de acuerdo con grandes ensayos clínicos, como EUROPA (Fox, KM, *et al.*, Lancet. 6 de septiembre de 2003; 362(9386): 782-8.): los inventores han encontrado una disminución de 5,8 mmHg en la tensión arteriolar media, mientras que esta fue de 6,5 mmHg en el ensayo EUROPA. Cabe mencionar que la eficacia de la inhibición de la ECA se comparó con el grupo de placebo en el ensayo EUROPE, mientras que los grupos de los inventores se basaron en la eficacia bioquímica de la inhibición. Por lo tanto, los valores similares sugieren una identificación precisa de pacientes con inhibición insuficiente de la ECA por la invención.

Consecuencias de la activación de la ECA

La activación de la ECA durante los estados fisiopatológicos puede conducir a diabetes, insuficiencia cardíaca, diabetes, además de otros trastornos. Hasta la fecha, no se ha mencionado ningún papel dominante para la inhibición de la ECA en suero endógeno en la progresión de la enfermedad en la que puede estar implicada la enzima convertidora de angiotensina. No obstante, los datos de los inventores sugieren que algunos cambios en la inhibición pueden contribuir a la progresión de enfermedades relacionadas con la ECA. Por otra parte, los datos de los inventores sugieren claramente que la actividad de la ECA puede ser modulada indirectamente por agentes que afectan a la interacción entre la ECA y el inhibidor endógeno, señalando esta interacción como una nueva diana terapéutica en muchas enfermedades.

Terapia adaptada al paciente

La eficacia determinada de la inhibición también puede usarse para establecer una terapia personalizada o incluso optimizar una terapia con respecto a los efectos secundarios aparentes. Este proceso también se puede usar para estimar la dosis adecuada u óptima del medicamento para evitar efectos secundarios no deseados. En este caso, se debería determinar un valor superior para la inhibición o también se podría ajustar la dosis bajo el control de la determinación. En el primer caso, los ensayos clínicos deberían determinar el nivel de inhibición que logra los efectos clínicos máximos. La dosis del fármaco debería disminuirse en el caso de pacientes con un nivel de inhibidor superior a la inhibición de máxima eficacia determinada. Como alternativa, la dosis puede disminuirse a un nivel cuando el paciente está exento de efectos secundarios y puede determinarse el nivel de inhibición para decidir si la dosis tolerada es suficiente para inhibir la enzima. Cuando se encuentre que la inhibición es insuficiente, entonces el fármaco debería excluirse del régimen terapéutico del paciente. Por el contrario, cuando la inhibición enzimática aún es suficiente a la dosis más baja, entonces la terapia del paciente está optimizada.

En general, el proceso según la descripción se refiere a un método para establecer la dosis de un inhibidor de una enzima en un paciente, en donde se determina un nivel superior de inhibición o se proporciona un nivel superior predeterminado de inhibición y se determina un nivel inferior de inhibición o se proporciona un nivel inferior predeterminado de inhibición, y el nivel de inhibición se evalúa en un paciente mediante un método de la invención y la dosis del fármaco disminuye en el paciente si el nivel de inhibidor evaluado es mayor que el nivel superior de inhibición y la dosis del fármaco aumenta en el paciente si el nivel de inhibidor evaluado es menor que el nivel inferior de inhibición de dicho inhibidor. Preferentemente, el nivel superior de inhibición es cercano a la inhibición de máxima eficacia y el nivel inferior de inhibición es el nivel en el que la inhibición es ineficaz, o cercano a él.

Estimación del nivel de inhibición por una enzima exógena

El método basado en la dilución se puede aplicar a la estimación de la inhibición en casos en los que el nivel de actividad enzimática endógena (baja actividad o la enzima no se expresa en la muestra, tal como HMG CoA reductasa, etc.) o la sensibilidad de la detección no es suficiente para medir las actividades enzimáticas a altos factores de dilución.

La clave de las mediciones exitosas es añadir enzima exógena a la muestra, y después medir los cambios en la

actividad de la enzima endógena. En el caso de la presencia de un inhibidor, la actividad de la enzima exógena se inhibe a dilución baja, mientras que la actividad desinhibida puede determinarse a dilución alta como se ha descrito en el caso de la ECA endógena.

5 El método se probó usando ECA exógena. Se añadió ECA exógena a las muestras de suero del paciente para tener una actividad al menos 100 veces mayor en comparación con la ECA endógena. Por lo tanto, se sensibilizó la medición de la actividad de la ECA. Las muestras de suero de un paciente en tratamiento con inhibidor de la ECA se complementaron con ECA exógena y se diluyeron en serie y se midieron las actividades enzimáticas (Fig. 7.). En la Figura 7, se muestra la actividad de la ECA exógena en función de la dilución de los sueros que contienen la ECA exógena, por lo tanto, inhibición de la ECA en el suero de un paciente en tratamiento con inhibidor de la ECA.

Los resultados de la determinación pueden evaluarse según la ecuación 3: la actividad enzimática fue de 0,88 UA/ml y 102,4 UA/ml a diluciones de 2 veces y 128 veces, respectivamente. Estos datos sugieren que la concentración de inhibidor del suero fue suficiente para inhibir la ECA exógena a un nivel del 99,1 %.

Debe observarse que el experimento puede realizarse para estimar el contenido de inhibidor dentro de una solución arbitraria usando la enzima exógena apropiada. Por lo tanto, el método puede aplicarse en una amplia gama de situaciones potenciales, tales como la estimación de la concentración de un fármaco que actúa sobre una enzima dentro del sistema nervioso central en sueros o líquido cefalorraquídeo. El proceso según la descripción también puede emplearse para estimar el contenido de inhibidor durante la producción química o microbiológica de fármacos o para estimar el contenido de inhibidor en líquidos naturales. Por otra parte, la tecnología actual también se puede aplicar para determinar el aumento real de reacciones biológicas, bioquímicas o químicas por activadores reversibles (tales como cofactores, catalizadores, etc).

25 Validación de la medición de actividad de la ECA

La cantidad de la ECA en circulación está determinada genéticamente. Los pacientes que son homocigotos para el alelo D del gen de la ECA tuvieron un 56 % más de concentración de la ECA en su suero que los que son homocigotos para el alelo I (II=101±7 ng/ml, n=28; ID=115±5 ng/ml, n=70; DD=158±6 ng/ml de suero, n=56). (Figura 10.) La actividad de la ECA también fue elevada en pacientes homocigotos DD, aunque el grado de aumento, medido en suero diluido 4 veces (II=32±2 U/ml, n=28; ID=37±1 U/ml, n=70; DD=44±1 U/ml, n=56), fue menor de lo esperado.

Esta diferencia puede explicarse por factores metodológicos. Para validar la medición de la actividad de la ECA, se comparó la escisión de FAPGG (determinación fotométrica) con la conversión de angiotensina I (determinada mediante HPLC). La determinación de la actividad de la ECA mediante escisión de FAPGG fue directamente proporcional a la conversión de angiotensina I a angiotensina II. (Figura 11/A) No obstante, la escisión de FAPGG fue aproximadamente 20 veces más rápida y fácil de medir. Otro factor importante es la linealidad del método. De hecho, cuando se probó ECA de tejido purificado, no se encontraron efectos de dilución en la actividad de la ECA determinada. Sin embargo, la actividad de la ECA en suero dependía de la dilución. (Figura 11/B) En particular, se encontró un efecto bifásico de la dilución en la actividad de la ECA, un aumento inicial de la actividad (dilución de hasta 16 veces) fue seguido de una fase de meseta (diluciones de 16-64 veces) y un aumento adicional (diluciones de más de 64 veces). (Figura 11/B) Estos datos sugirieron la presencia de un inhibidor de la ECA endógeno soluble. Cuando el suero no está diluido, el inhibidor se une a la ECA, enmascarando su actividad (inhibición) y, cuando el suero está diluido, el inhibidor se disocia de la ECA, desenmascarando su actividad. (Figura 11/C)

45 Métodos

1.1 Recogida de muestras de sangre, preparación de suero y ADN

50 Se recogieron muestras de sangre de voluntarios usando una técnica aséptica convencional. La sangre nativa se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente, las fracciones de suero (separadas por centrifugación a 1500 g, 15 min) se mantuvieron a -25 °C hasta experimentos posteriores. Se preparó ADN genómico a partir de sangre venosa anticoagulada usando un kit de separación de ADN (kit de ADN FlexiGene, Cat. n.º 51204; Qiagen GmbH).

55 1.2 Medición de actividad de la ECA

La actividad de la ECA se determinó a 37 °C usando un sustrato artificial de la ECA (FAPGG, (N-[3-(2-furil)acrililoil]-L-fenilalanilglicilglicina; Sigma-Aldrich; Cat. n.º F7131). La mezcla de reacción contenía: HEPES 25 mM (ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N-2-etanosulfónico), FAPGG 0,5 mM, NaCl 300 mM y suero, el pH fue de 8,20. La medición se realizó en placas de 96 pocillos (Greiner-Bio One; Cat. n.º: 655101) usando un lector de placas (lector de placas NovoStar, BMG Labtech GmbH). Se midieron cambios en la absorbancia (340 nm) cada 5 min durante al menos 90 min. Los valores de densidad óptica se representaron en función del tiempo de reacción y se ajustaron con regresión lineal. La actividad de la ECA se calculó mediante la ecuación:

$$65 \quad \text{Actividad} = -(S/k) * D \quad (4)$$

donde S: pendiente de la disminución de la densidad óptica en el tiempo, k: cambio de densidad óptica tras la escisión de 1 nmol de FAPGG, D: dilución de los sueros. La actividad de la ECA se proporciona en unidades, donde 1 U equivale a la escisión de 1 nmol de FAPGG en un minuto. En algunos experimentos, la mezcla de reacción también contenía albúmina de suero humano (HSA, Cat. n.º: N1-201000-211, Human BioPlazma Manufacturing and Trading LTD).

1.3 Determinación del genotipo de ECA (polimorfismo I/D)

El genotipo de inserción/supresión de la ECA se examinó mediante amplificación por PCR de los alelos I y D en función de un protocolo convencional descrito por Rigat *et al.* [Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.]. Los productos de amplificación se separaron usando electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. La presencia de los alelos I y D dio como resultado un producto de PCR de 490 pb y 190 pb, respectivamente.

1.4 Ultrafiltración de suero

La muestra de suero de un voluntario sano se ultrafiltró después de una dilución de 250 veces en HEPES 25 mM pH 8,20 mediante un dispositivo de ultrafiltración con un tamaño de poro de 50 y 100 kDa (Vivaspin 500, Cat. n.º: VS0231, VS0241; Sartorius Stedim Biotech) a 4 °C durante 6 minutos a 15000 g. Se repitió la ultrafiltración hasta que las muestras diluidas se volvieron a concentrar al volumen inicial.

1.5 Análisis por HPLC de la conversión de angiotensina I

Se incubaron muestras de suero a 37 °C que contenían angiotensina I 0,5 µM (sintetizada por GenScript USA Inc.) y NaCl 300 mM en tampón HEPES 25 mM, pH 8,20. Se añadió EDTA 5 mM para detener la reacción. Los péptidos de angiotensina se midieron después de filtrar a través de un filtro de tamaño de poro de 10 kDa (Vivaspin 500, Cat. n.º: VS0101; Sartorius Stedim Biotech). El análisis por HPLC se realizó usando Shimadzu HPLC con una columna C18 de fase inversa (Hypersil Gold, Cat. n.º: 25005-154630; Thermo Scientific). El eluyente A contenía ácido trifluoroacético al 0,01 % (TFA, Sigma-Aldrich; Cat. n.º 302031) en agua, mientras que el eluyente B contenía TFA al 0,01 % en acetonitrilo (Sigma-Aldrich, Cat. n.º 34998). Los péptidos de angiotensina se separaron usando un perfil de elución en gradiente de contenido de 22 % de acetonitrilo a 55 % de acetonitrilo. Los péptidos de angiotensina se detectaron mediante un detector de matriz de diodos a 230 nm y el área bajo la curva de cada pico de péptido de angiotensina se comparó con las curvas de calibración. La cantidad de péptidos de angiotensina se representó frente al tiempo de reacción y se ajustó mediante una regresión lineal. La cinética de la conversión de angiotensina I se administra en nmol de escisión de angiotensina I en 1 ml de suero en un minuto.

1.6 Medición de la cantidad de ECA

La cantidad de ECA en suero se midió usando un kit de desarrollo comercial de ELISA de ECA humana (R&D Systems Inc., Cat. n.º DY929) según las instrucciones del fabricante con modificaciones menores. En resumen, las placas inmunosorbentes ligadas a enzimas se recubrieron con 80 ng/pocillo de anticuerpo de captura, después se bloquearon los sitios de unión restantes con diluyente reactivo (10 mg/ml de albúmina de suero bovino (Cat) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (Cat)). Se añadieron sueros diluidos 100 veces (en diluyente de reactivo) a los pocillos, después se marcaron los complejos de anticuerpo-antígeno con un anticuerpo de detección biotinilado (20 ng/pocillo). Se añadió estreptavidina diluida 200 veces conjugada con peroxidasa de rábano picante (componente del kit) a los pocillos. Finalmente, se detectó la cantidad de complejos con solución de sustrato (0,3 mg/ml de tetrametilbencidina, H₂O₂ 0,1 µM, ácido acético 50 mM), la reacción se terminó después de 20 minutos con 0,5 mmol/l de HCl y la densidad óptica se midió a 450 nm. Las muestras se midieron al menos tres veces o más hasta que se alcanzó un valor de desviación típica menor del 15 %.

1.7 Reticulación de suero

La interacción de ECA - HSA se estabilizó con reticuladores heterobifuncionales. La mezcla inicial se incubó durante 1 hora a 25 °C y contenía suero diluido 4 veces, succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaetilenglicol] éster (SM(PEG)₁₂ 1,25 mM (+) o 2,5 mM (++) o 5 mM (+++), Thermo Scientific, Cat. n.º 22112) y succinimidil-[(N-maleimidopropionamido)-hexaetilenglicol] éster (SM(PEG)₆, Thermo Scientific, Cat. n.º 22105) en HEPES 25 mM, pH 7,2. Las moléculas de reticulador activas restantes se bloquearon usando tris(hidroximetil)aminometano 50 mM (TRIS, Sigma-Aldrich, Cat. n.º T1503) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron anticuerpo biotinilado de cabra anti-ECA humana (R&D Systems Inc., n.º de pieza 841366, 22,6 ng/ml) y resina de estreptavidina inmovilizada (Pierce, cat. n.º: 20349) a la mezcla para anclar los productos reticulados a la superficie de la resina. El blanco contenía IgG de cabra inespecífica 22,6 ng/ml en lugar de anticuerpo específico para ECA. Después de la incubación durante una noche a temperatura ambiente, la resina se purificó lavando cinco veces usando HEPES 25 mM, pH 7,20. Las proteínas purificadas se eliminaron de la resina hirviendo durante 10 minutos en tampón de muestra SDS concentrado 2x (Sigma-Aldrich, Cat. n.º S3401). Las proteínas reticuladas se visualizaron mediante análisis de transferencia de Western después de electroforesis en gel en un gel de gradiente 5-15 % (gel premoldeado Mini-Protean TGX, Cat. n.º

456-1086, Bio-Rad Laboratories Inc.) El anticuerpo primario era un anticuerpo anti ECA humana de cabra usado en dilución 1:1000 (n.º de pieza 841365; R&D Systems Inc.), el anticuerpo secundario era un anticuerpo anti-cabra unido a peroxidasa usado en dilución 1:40.000. La mancha de transferencia se desarrolló en una película de rayos X médica verde sensible (Primax Berlin GmbH, Cat. n.º ¿?) Después de añadir el reactivo Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer Life Sciences, Cat. n.º NEL10400).

1.7.1 Reticulación de HSA y suero ultrafiltrado

El experimento anterior se realizó con HSA y suero ultrafiltrado con tamaño de poro de 100 kDa en lugar de suero completo. La mezcla inicial contenía suero filtrado diluido 3,5 veces, HSA 0 mg/ml (+), 24 mg/ml (++) o 48 mg/ml (+++) y SM(PEG)₆ 5 mM en tampón HEPES 25 mM pH 7,2. Las siguientes etapas fueron las mismas que se han descrito anteriormente. Después de revelar la transferencia de Western, la membrana se separó durante 20 minutos a 60 °C en tampón de separación que contenía sal de dodecilsulfato de sodio al 1 % (SDS, Serva, Cat. n.º 20765), DL-ditiotreitól 20 mM (DTT, Sigma-Aldrich, Cat. n.º D9779) en tampón de Tris 62,5 mM, pH 7,5. El protocolo de visualización se repitió usando anticuerpo biotinilado anti seroalbúmina humana (Exbio Praha, Cat. n.º 1B-257-C100) como anticuerpo primario en dilución 1:5000 y peroxidasa-estreptavidina en dilución 1:100.000 (Jackson, Cat. n.º 016-030-084) para unir la peroxidasa al complejo.

1.7.2 Reticulación recombinante de la ECA y HSA en la superficie de la placa de ELISA

La interacción recombinante de ECA-HSA se examinó en una placa de ELISA (Greiner Bio-One; Cat. n.º 655061). Se añadieron 300 µl de HSA al 1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS pH 7,2 que contenía KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8 mM) a los pocillos y se incubó durante una noche a temperatura ambiente para permitir la unión a la superficie. Después de lavar con PBS, se añadieron 100 µl de SM(PEG)₆ y SM(PEG)₁₂ 625 µM a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos. Después de un lavado exhaustivo, se añadieron 100 µl de la ECA recombinante 260 ng/ml a los pocillos (R&D Systems, n.º de pieza 841367) durante 1 hora. Se añadieron a la placa 100 µl de anticuerpo biotinilado de cabra anti-ECA humana (R&D Systems Inc. n.º de pieza 841366, 22,6 ng/ml) después de una etapa de lavado de 2 horas. Después, se añadieron 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (R&D Systems, n.º de pieza 890803) durante 30 minutos a cada pocillo seguido de lavado. Finalmente, el complejo de ECA - anticuerpo de detección - estreptavidina-HRP unido se visualizó mediante una solución de sustrato (que contenía ácido acético 80 mM, tetrametilbencidina 0,4 mg/ml, H₂O₂ 0,56 µM) en lector de placas a 380 nm. Como controles, el reticulador se bloqueó con 100 µl de solución de Tris-HCl 330 mM (columna 2) o se dejó solo (columna 3). Se probó la unión inespecífica entre proteínas con solución de gelatina al 1 % en presencia (columna 5) o en ausencia (columna 4) de bloqueo de reticuladores. Como control positivo, se realizó ELISA de tipo sándwich con los reactivos del kit comercial de desarrollo de ELISA de ECA humana. La medición se realizó por triplicado en cada punto temporal.

1.8 ECA recombinante

La ECA recombinante fue producida por un sistema de expresión TOPO Bac-to-Bac (Invitrogen, Cat. n.º A11101) según las instrucciones del fabricante. En resumen, la cepa de *E. coli* químicamente competente (Invitrogen, Cat. n.º C8620-03) se transformó con el gen de ECA que contenía el plásmido de ADNc (GeneCopoeia; Cat. n.º EX-T7349-101). Después de la selección de antibióticos y el aislamiento del plásmido, la construcción pFastBac que contenía el gen de la ECA se transformó en *E. coli* DH10Bac competente (Invitrogen; Cat. n.º 10361-012) para generar un báculo recombinante. El ADN de báculo se transfirió en la línea celular de insecto SF9 (Invitrogen, Cat. n.º 10362-100), en la que se generó el baculovirus. Otras células de insecto SF9 fueron infectadas por estos baculovirus. El día 4, la célula de insecto se (1000 g, 10 min, 4 °C) y los sedimentos se lavaron en PBS para eliminar el medio de cultivo celular. El sedimento se homogeneizó en tampón RIPA (tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X 100 al 1 %, SDS al 0,1 %, de desoxicolato al 1 %) mediante un sonicador (tipo). Se recogió el sobrenadante (15000 g, 10 min, 4 °C) y se inyectó en HEPES 25 mM, NaCl 15 mM, pH 8,2 en una columna de intercambio aniónico (Knauer, columna de intercambio aniónico Q Biofoxx de 40 µm, cat. n.º Y4011). ECA se eluyó con una concentración gradualmente creciente de NaCl (de 168 mM a 540 mM) y se determinó el pico de la ECA mediante la medición de la actividad de la ECA de las fracciones recogidas.

1.9 Ensayo de actividad de la ECA

El ensayo se realizó en una solución que contenía sueros (diferentes diluciones), sustrato 0,1 mM (FAPGG, N-[3-(2-Furil)acrilil]-L-fenilalanil-glicil-glicina), NaCl 300 mM y HEPES 25 mM (ácido 4-(2-Hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico), pH=8,2. Las mediciones se realizaron en una microplaca de 96 pocillos (Greiner Bio-One®) en 200 o 300 µl de volumen final. La disminución de las densidades ópticas a 340 nm se midió mediante un lector de placas NOVostar® a 37 °C. La disminución de las densidades ópticas se ajustó mediante una regresión lineal (los valores se aceptaron cuando R²>0,9). La actividad de la ECA se calculó según la ecuación 5:

$$\text{Actividad} = a / (\text{DO0} - 0,133) * 1093,792 * D \quad (5)$$

donde a es la pendiente de la disminución de la densidad óptica; DO0 es la densidad óptica inicial; 0,133 es la densidad

del tampón de medición solo (que contiene HEPES 25 mM y NaCl 300 mM; 1093,792 es la disminución de la densidad óptica después de la descomposición completa del sustrato; D es el factor de dilución. 1.10 Análisis estadístico Las características basales se compararon utilizando la prueba de ji al cuadrado o la prueba exacta de Fisher para variables cualitativas y la prueba de t de Student o la prueba de U de Mann-Whitney para variables cuantitativas. Se usó el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) y $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

DESARROLLO DE PRODUCTOS

Aparato según la descripción

El aparato de la descripción comprende una unidad receptora de muestras adecuada para recibir al menos dos muestras, preferentemente al menos dos muestras idénticas. Por tanto, la unidad receptora de muestra tiene múltiples recipientes de muestra. Los recipientes de muestra están formados de manera que sean adecuados para recibir muestras de diferentes volúmenes.

El aparato comprende una unidad de dilución que es adecuada para conducir diversos reactivos al recipiente de muestra. Se debe garantizar una mezcla adecuada tras la dilución. Esto se puede lograr mediante una disposición adecuada del dosificador y la forma del recipiente. Preferentemente, el recipiente tiene una forma redondeada para evitar espacios no mezclables.

Una característica específica del aparato es que el aparato tiene un sistema de detección que es adecuado para detectar y supervisar las reacciones enzimáticas, midiendo de este modo la actividad enzimática. El sistema de detección puede ser un sistema de detección espectrofotométrico que comprende, por ejemplo, una fuente de luz y un detector, o puede ser un sistema de detección fluorescente o un sistema de detección UV-VIS dependiendo de los compuestos y/o productos de reacción de la reacción enzimática o cualquier otro medio que se puede usar para determinar la actividad enzimática. En el sistema de detección, preferentemente la conversión de un sustrato enzimático es seguida de la detección del sustrato o del producto de reacción.

Una variante preferida es un lector de placas preferentemente combinado con una o más unidades dosificadoras accionadas por un conjunto de bombas para mover el líquido de dilución y/o los componentes de reacción que preferentemente están tamponados.

En una realización preferida, el recipiente de muestra es una cubeta. En este sentido, el pocillo de una placa se considera como una cubeta en un lector de placas. En una realización preferida, sin embargo, las cubetas tienen volúmenes diferentes, mientras que la relación de la longitud de las cubetas de trayectoria de luz de diferente volumen es menor que la relación de su volumen. Preferentemente, las longitudes de las trayectorias de luz son comparables o esencialmente idénticas, mientras que su volumen es en su mayoría diferente.

El aparato está equipado preferentemente con una unidad de procesamiento de datos o procesador y una unidad de almacenamiento de datos. Estas unidades están conectadas operativamente con el aparato de la descripción. La unidad de almacenamiento de datos comprende un programa adecuado para

- conducir la unidad de dilución para diluir de manera adecuada las muestras, y/u
- obtener datos de la unidad detectora, y/o
- llevar a cabo cualquier cálculo como se define en el método de la descripción.

Por tanto, convenientemente, el aparato es un aparato automático.

Preferentemente, el proceso según la descripción se refiere a reactivos o componentes seleccionados de sustratos enzimáticos, enzimas, sus inhibidores, tampones de dilución, tampones de reacción. Preferentemente, los constituyentes están en forma de un kit, preferentemente junto con el aparato o una parte adecuada del mismo, por ejemplo, cubeta o soporte de datos que comprende el programa.

En una realización preferida, las muestras o los conductos que transfieren las muestras están etiquetados, por ejemplo, mediante códigos de barras, y el aparato está equipado con un lector de etiquetas conectado operativamente con la unidad de procesamiento. De este modo, el aparato puede definir automáticamente el factor de dilución y los niveles de inhibición.

En el caso de los inhibidores de la ECA, la invención está lista para reducirse a la práctica. Este experto en la técnica puede, sin embargo, validar el método para dianas adicionales, es decir, también pares de inhibidores enzimáticos. En este caso, se optimizará el método, en primer lugar, los medios de detección.

El desarrollo adicional puede apuntar a terapias de pacientes cardiovasculares, específicamente para ECA, HMG-CoA reductasa, renina y/o dipeptidil peptidasa-4 pueden actuar como dianas. Un área adicional de desarrollo pueden ser los inhibidores enzimáticos usados en trastornos psiquiátricos o psicósomáticos.

SUMARIO DE LOS RESULTADOS

La aplicabilidad del método del proceso según la descripción se ha validado en la terapia con inhibidor de la ECA. Una cohorte de 501 pacientes con tensión arterial alta participó en el estudio, entre los cuales se recetó medicación de iECA a 387 pacientes. El método de la invención se aplicó en estos pacientes y se encontró una inhibición exitosa en el caso del 82 % de los 387 pacientes. En el caso de pacientes con inhibición insuficiente, los inventores intentaron explorar las razones. Se contactó con los pacientes y se les enfatizó la importancia de tomar el medicamento iECA. Se les informó de que, según los resultados de los inventores, la eficacia de la terapia es insuficiente y se les solicitó un control adicional. El 45 % de los pacientes no regresó. El aumento de la dosis del iECA dio como resultado una terapia exitosa en el caso del 9 por ciento de los pacientes. En el caso del 17 % de los pacientes, el segundo control mostró una inhibición suficiente, mientras que se cambió a otro 17 % de los pacientes a otro medicamento debido a quejas relacionadas con los efectos secundarios. En el 12 % de los pacientes no se pudo encontrar una razón para la insuficiencia de la terapia; en dichos casos, los inventores sugieren modificar la terapia basada en iECA.

La tensión arterial de los pacientes se correlacionó de manera estricta con la inhibición exitosa (Figura 9).

Aplicabilidad Industrial

El presente proceso según la descripción permite aumentar la eficacia de las terapias basadas en medicamentos inhibidores enzimáticos. Las terapias inadecuadas suponen una gran carga para el sistema de asistencia social y, por lo tanto, aumenta la importancia económica de un enfoque personalizado en medicina. Una primera etapa en este enfoque es la evaluación de la eficacia de las terapias en curso o planificadas. La presente invención proporciona una contribución importante a este campo al proporcionar un método sencillo, potencialmente de una sola etapa, de una sola muestra para evaluar la eficacia de la terapia de iECA. Por otra parte, la invención proporciona una posibilidad de establecer u optimizar un régimen terapéutico sin exponer al paciente a una carga excesiva, mejorando de este modo el cumplimiento del paciente.

Más en general, el proceso según la descripción es adecuado para supervisar de manera eficaz y sencilla la presencia de un inhibidor o el nivel de inhibición de cualquier muestra en donde una vez que se establece el método no son necesarias más muestras ni controles. Por otra parte, el método del proceso según la descripción se puede realizar con reactivos, por ejemplo, sustratos, normalmente usados para una enzima dada. Si bien la automatización es posible, el método se puede llevar a cabo en general sin un equipo costoso y demasiado específico.

REFERENCIAS

- Cambien F, Poirier O, Lecerf L, *et al.* Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-4.
- Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, *et al.* A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 303-10.
- Corvol P, Michaud A, Soubrier F, Williams TA. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl* 1995; 13: S3-10.
- Cuspidi C, Muiesan ML, Valagussa L, *et al.* Comparative effects of candesartan and enalapril on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension: the candesartan assessment in the treatment of cardiac hypertrophy (CATCH) study. *J Hypertens* 2002; 20: 2293-300.
- Danser AH, Deinum J, Osterop AP, Admiraal PJ, Schalekamp MA. Angiotensin I to angiotensin II conversion in the human forearm and leg. Effect of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *J Hypertens* 1999; 17: 1867-72.
- Eyries M, Michaud A, Deinum J, *et al.* Increased shedding of angiotensin-converting enzyme by a mutation identified in the stalk region. *J Biol Chem* 2001; 276: 5525-32.
- Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003; 362: 782-8.
- Fyhrquist F, Tikkanen I., Gronhagen-Riska C., Hortling L., Hichens M., "Inhibitor Binding Assay for AngiotensinConverting Enzyme" *Clin Chemistry*, 1984 30(5) 696-700.
- Greenberg B, Quinones MA, Koilpillai C, *et al.* Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the SOLVD echocardiography substudy. *Circulation* 1995; 91: 2573-81.
- Gronhagen-Riska C., Tikkanen I., Fyhrquist F., "Competitive inhibitor binding assay (CIBA) of ACE inhibitors", *Acta. Med. Scand. Suppl.*, 1986, 714, 43-47.
- Hoogwerf BJ, Young JB. The HOPE study. Ramipril lowered cardiovascular risk, but vitamin E did not. *Cleve Clin J Med* 2000; 67: 287-93.
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-83. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1995; 345: 669-85.

- Kramers C, Danilov SM, Deinum J, et al. Point mutation in the stalk of angiotensin-converting enzyme causes a dramatic increase in serum angiotensin-converting enzyme but no cardiovascular disease. *Circulation* 2001; 104: 1236-40.
- 5 Lieberman J, Beutler E. Elevation of serum angiotensin-converting enzyme in Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1976; 294: 1442-4.
- Lieberman J, Sastre A. An angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor in human serum. Increased sensitivity of the serum ACE assay for detecting active sarcoidosis. *Chest* 1986; 90: 869-75.
- Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, et al. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; 332: 706-11.
- 10 Linnebank M, Kesper K, Jeub M, et al. Hereditary elevation of angiotensin converting enzyme suggesting neurosarcoidosis. *Neurology* 2003; 61: 1819-20.
- Luders S, Schrader J, Berger J, et al. The PHARAO study: prevention of hypertension with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in patients with high-normal blood pressure: a prospective, randomized, controlled prevention trial of the German Hypertension League. *J Hypertens* 2008; 26: 1487-96.
- 15 Nesterovitch AB, Hogarth KD, Adarichev VA, et al. Angiotensin I-converting enzyme mutation (Trp1197Stop) causes a dramatic increase in blood ACE. *PLoS One* 2009; 4: e8282.
- Oppong SY, Hooper NM. Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem J* 1993; 292 (Pt 2): 597-603.
- 20 Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-77.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-6.
- 25 Ruggerenti P, Fassi A, Ilieva AP, et al. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 351: 1941-51.
- Semmler A, Stein RW, Caplan L, Danilov SM, Klockgether T, Linnebank M. Hereditary hyper-ACE-emia due to the Pro1199Leu mutation of somatic ACE as a potential pitfall in diagnosis: a first family outside Europe. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1088-9.
- 30 Six-month effects of early treatment with lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together withdrawn six weeks after acute myocardial infarction: the GISSI-3 trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 337-44.
- Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, et al. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15: 1579-92.
- 35 Studdy P, Bird R, James DG. Serum angiotensin-converting enzyme (SACE) in sarcoidosis and other granulomatous disorders. *Lancet* 1978; 2: 1331-4.
- van Dijk MA, Kroon I, Kamper AM, Boomsma F, Danser AH, Chang PC. The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 484-90.
- 40 Wei L, Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Michaud A, Corvol P, Clauser E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *J Biol Chem* 1991; 266: 5540-6.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso *in vitro* para evaluar la eficacia de la inhibición enzimática en la terapia con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en un sujeto que comprende:
- 5 (a) en una muestra de sangre o una muestra obtenida de sangre de un sujeto tratado con un inhibidor de la ECA;
(b) tomar al menos dos partes alícuotas de la muestra;
(c) diluir dichas partes alícuotas en diferentes factores de dilución,
(d) medir la actividad de la ECA en las muestras de dilución;
- 10 (e) definir un factor de dilución alto donde el efecto del inhibidor de la ECA se vuelve insignificante, en donde dicho factor de dilución es al menos 50, preferentemente al menos 100;
(f) definir un factor de dilución de referencia bajo, siendo dicho factor de dilución como máximo 10;
(g) multiplicar los valores de actividad medidos en cada una de las muestras diluidas por el factor de dilución respectivo para obtener valores de actividad de la ECA calculados para cada muestra de dilución;
- 15 (h) obtener el nivel de inhibición de la ECA en la muestra original comparando los valores de actividad enzimática determinados a dichos factores de dilución bajos y altos en dichas muestras de dilución;
(i) valorar la eficacia del tratamiento médico por el inhibidor de la ECA en dicho sujeto evaluando el nivel calculado de inhibición de la ECA, en donde una inhibición enzimática baja es una indicación de una terapia ineficaz y en donde una inhibición enzimática alta es una indicación de una terapia eficaz.
- 20 2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el factor de dilución alto, en donde el efecto del inhibidor de la ECA es insignificante, es al menos 100 o al menos 200, preferentemente al menos 300 o al menos 350 o muy preferentemente al menos 400,
y en donde el factor de dilución bajo de referencia es como máximo 20 o como máximo 10 o muy preferentemente
25 como máximo 5 o como máximo 4, y/o
la relación de factores de dilución es por tanto al menos 10 o preferentemente al menos 30 o al menos 70 o al menos 100.
- 30 3. El proceso de la reivindicación 1, en donde en la etapa (i) la inhibición enzimática se considera insuficiente en un sujeto que tiene un nivel de inhibición, proporcionado en porcentaje, inferior al 90 % y eficaz en un sujeto que tiene un nivel de inhibición de al menos 90 %, evaluando de este modo la eficacia de dicha terapia con inhibidor de la ECA en dicho sujeto.

Figura 1. Respuesta a dosis para captopril en la actividad de enzima convertidora de angiotensina (ECA) en suero humano.

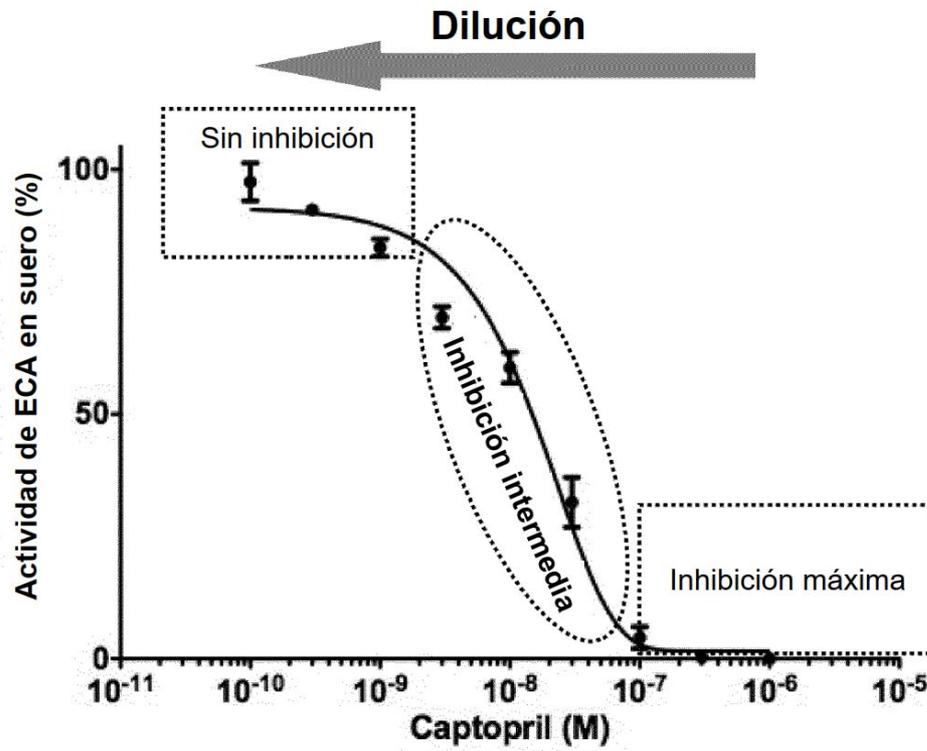


Figura 2. Efecto de la dilución en la actividad de ECA recombinante inhibida.

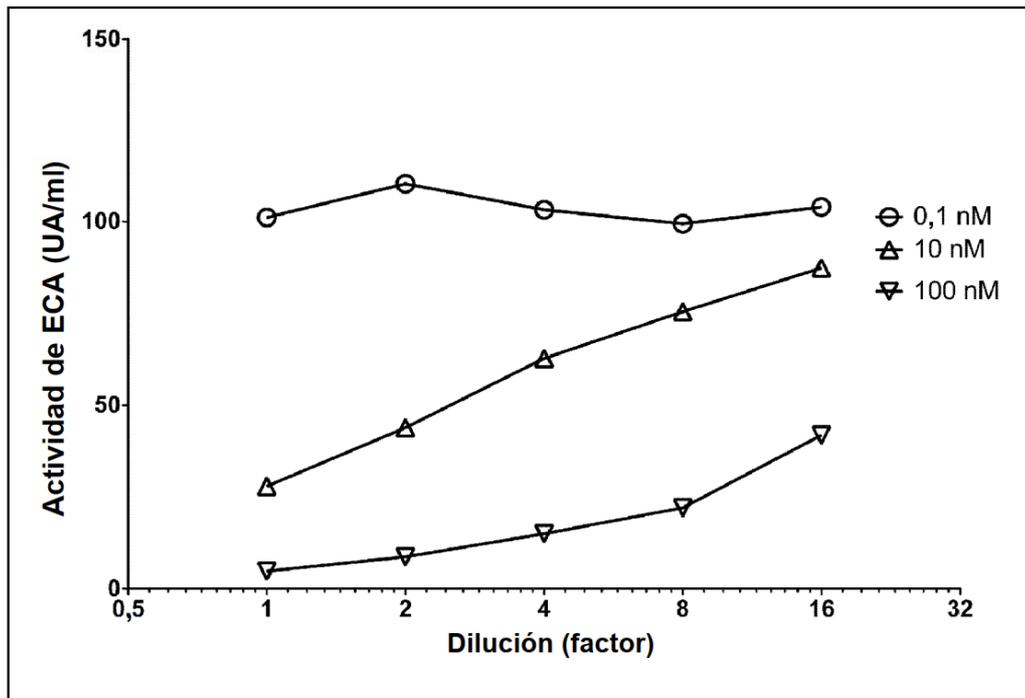


Figura 3. Efecto teórico de la dilución en suero en la inhibición de ECA humana por captopril

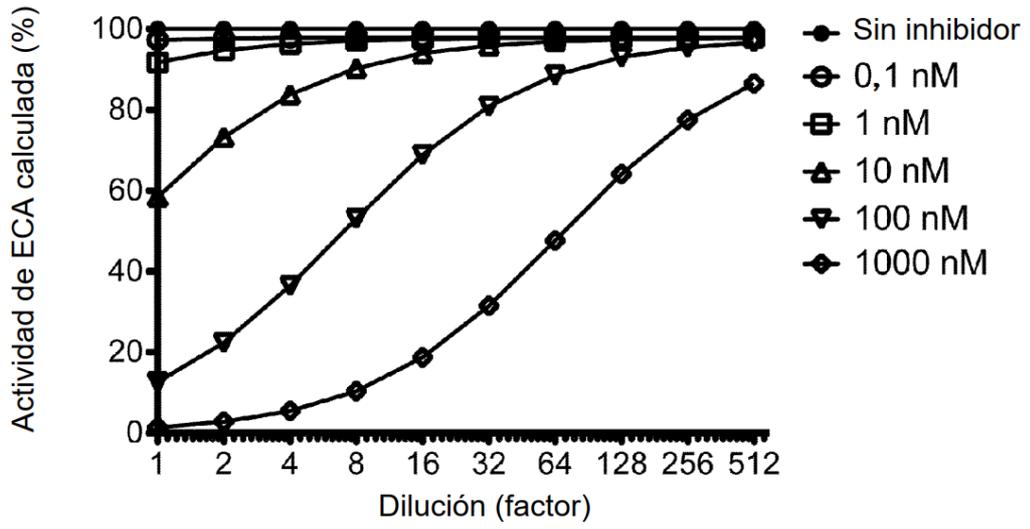


Figura 4. Inhibición de ECA en suero calculada en pacientes hipertensos.

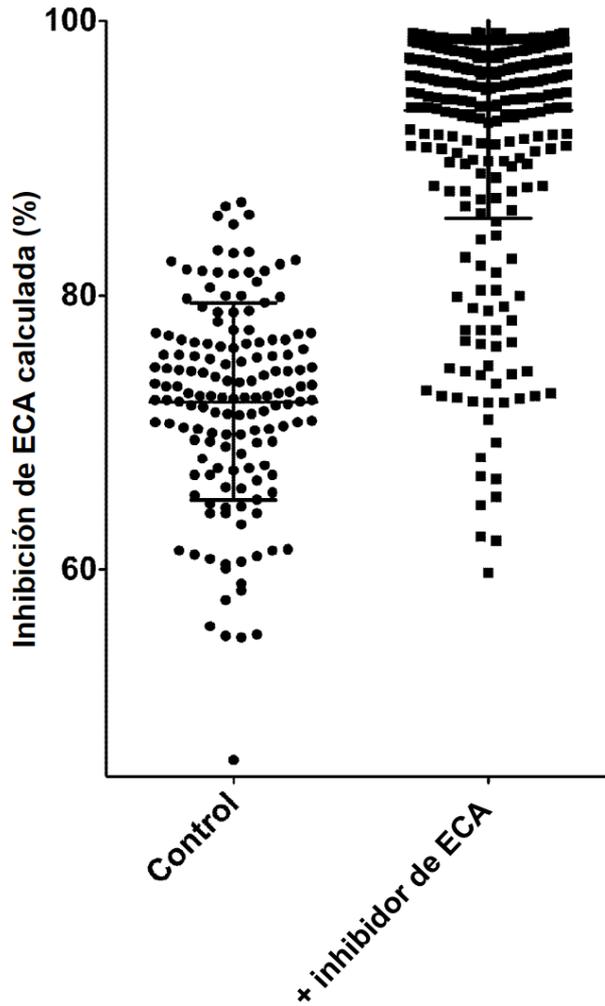


Figura 5. Niveles diferentes de inhibición de ECA en suero en pacientes.

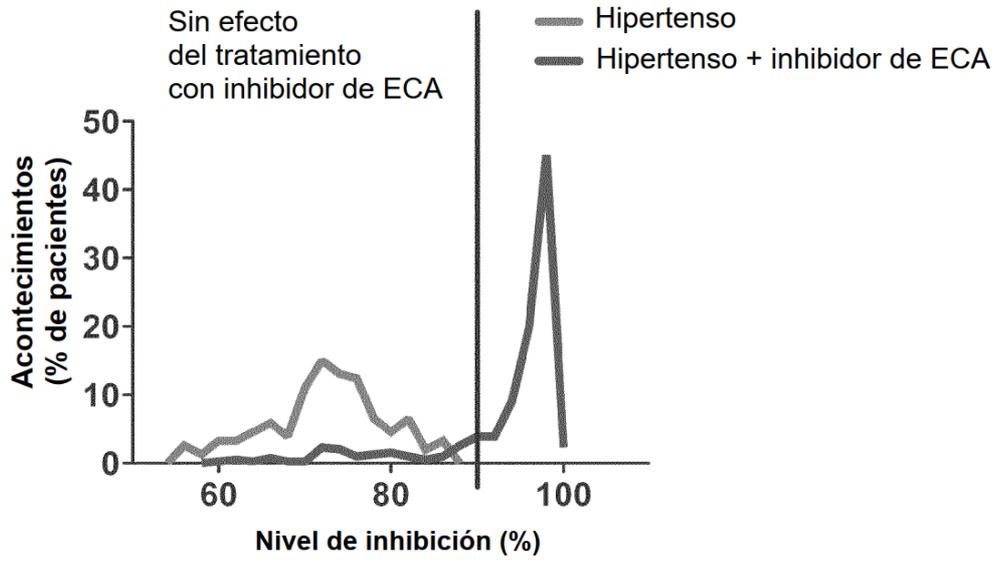


Figura 6. La inhibición de ECA determinada por el método de dilución se correlaciona con la tensión arterial.

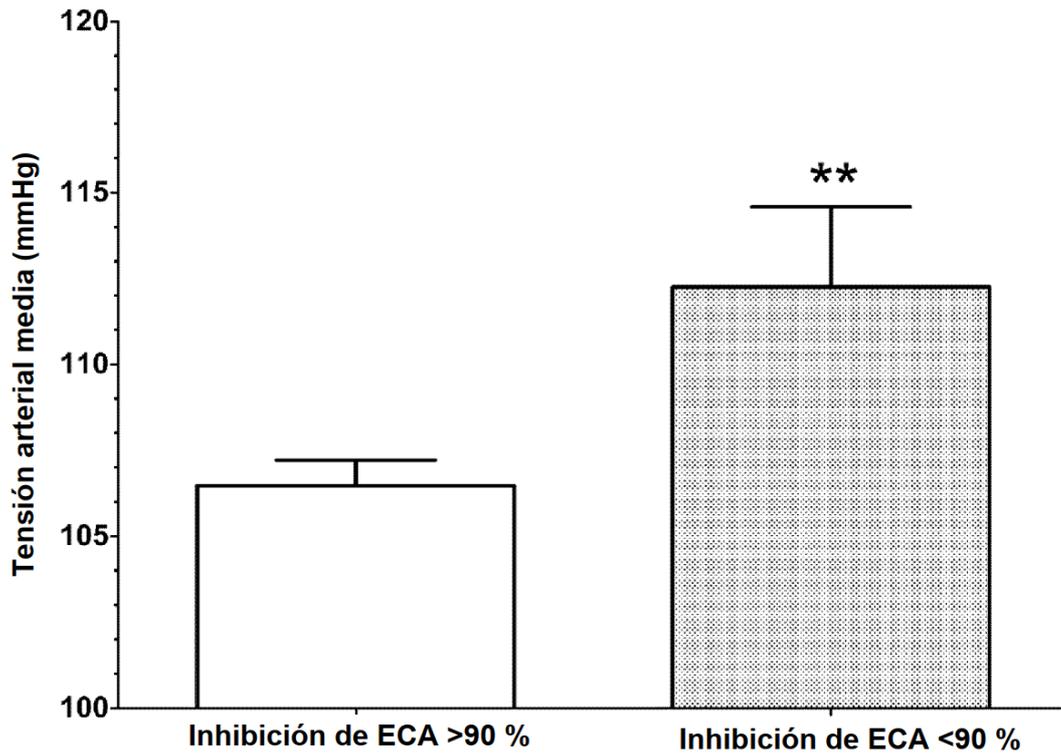


Figura 7. Aumento de la actividad de ECA exógena tras la dilución de los sueros.

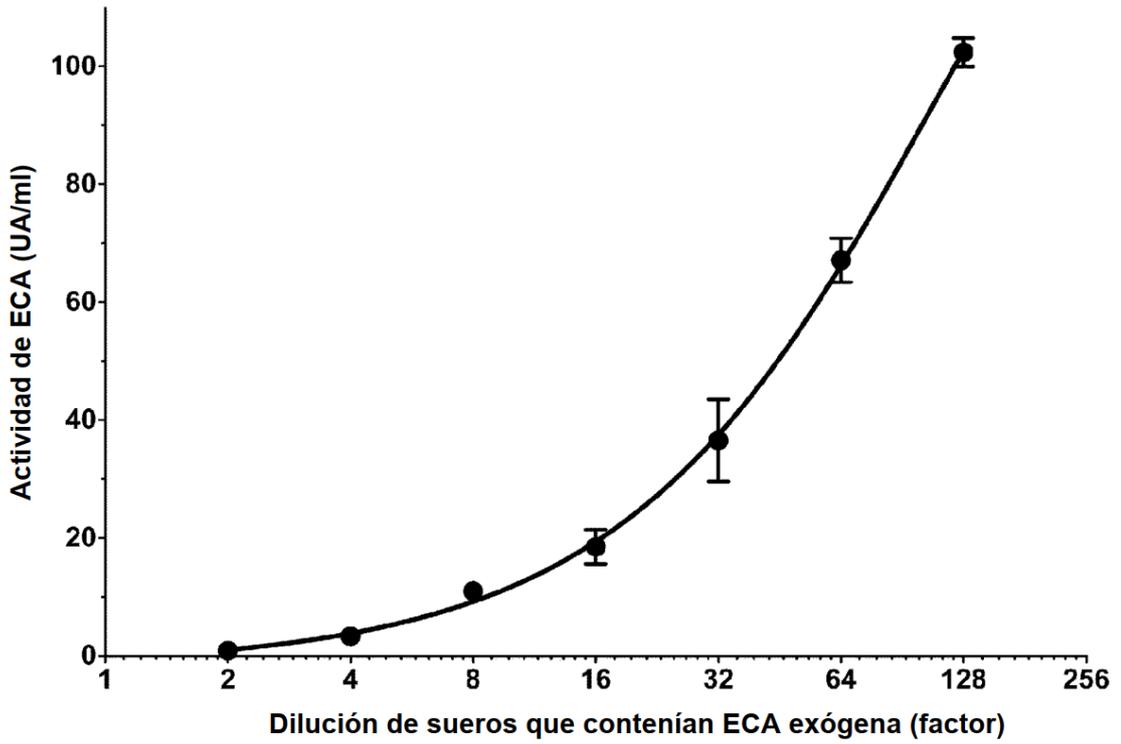


Figura 8. Diferencias en los conceptos de determinación de las actividades enzimáticas

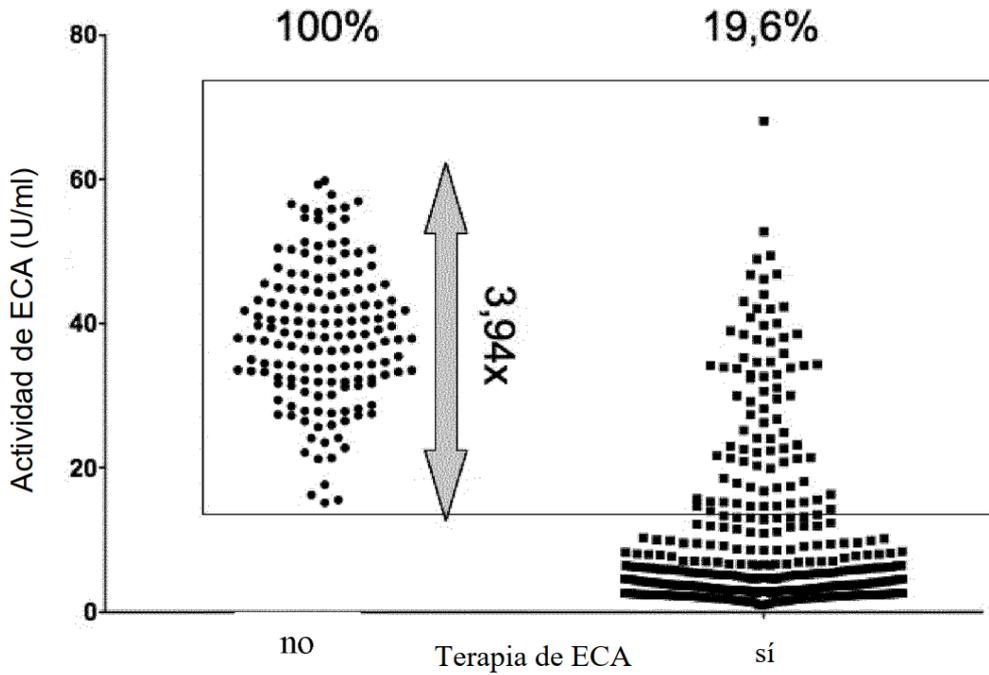


Figura 9: Validación de la eficacia clínica de la invención descrita

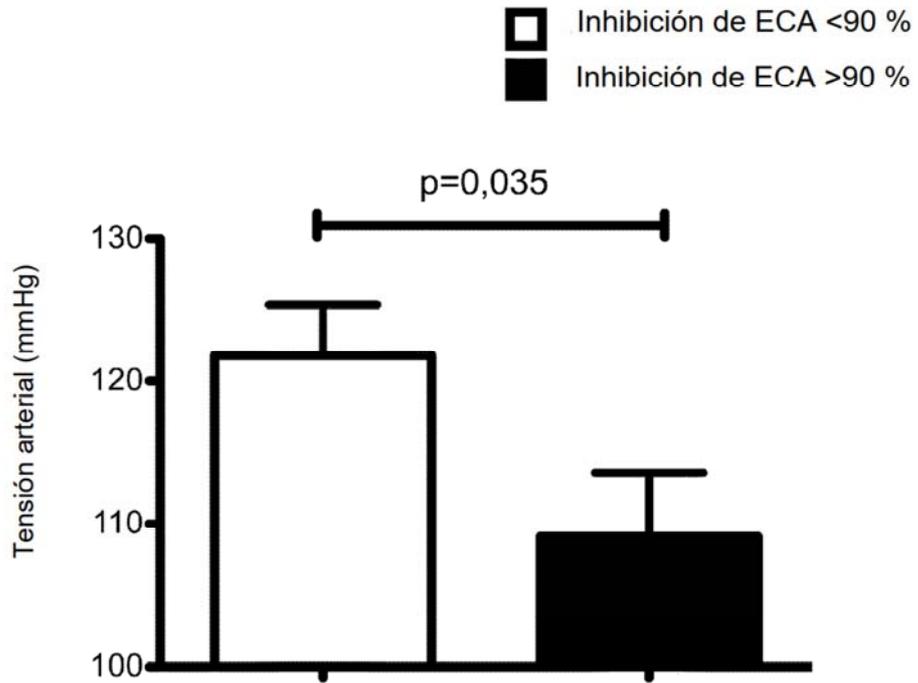


Figura 10. Discordancia en la expresión y actividad de ECA

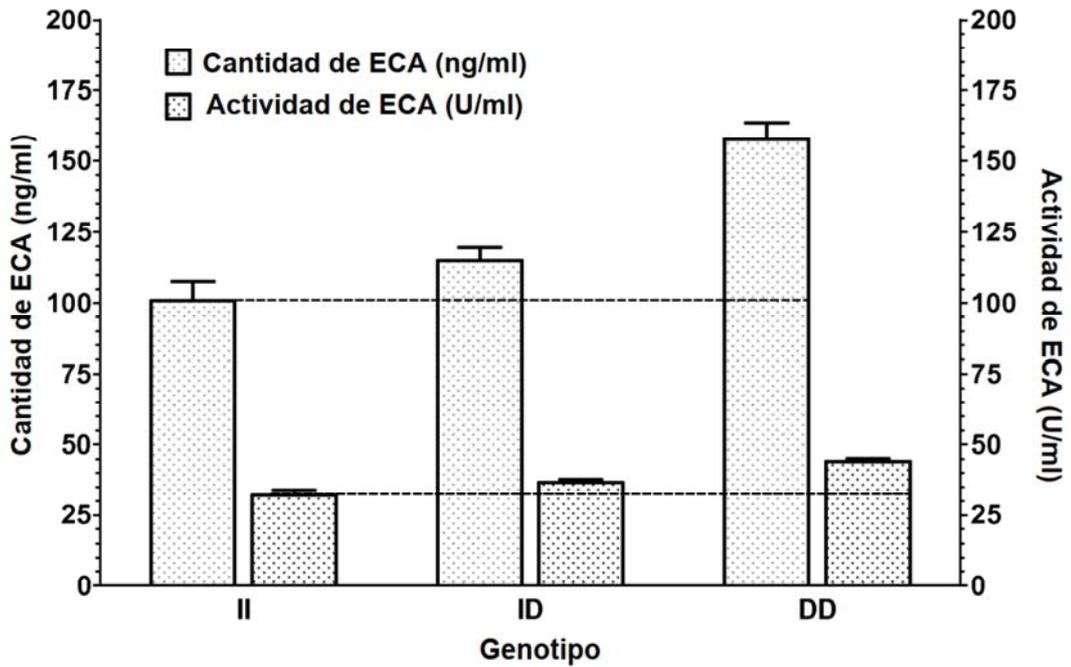


Figura 11 Indicaciones de un inhibidor endógeno

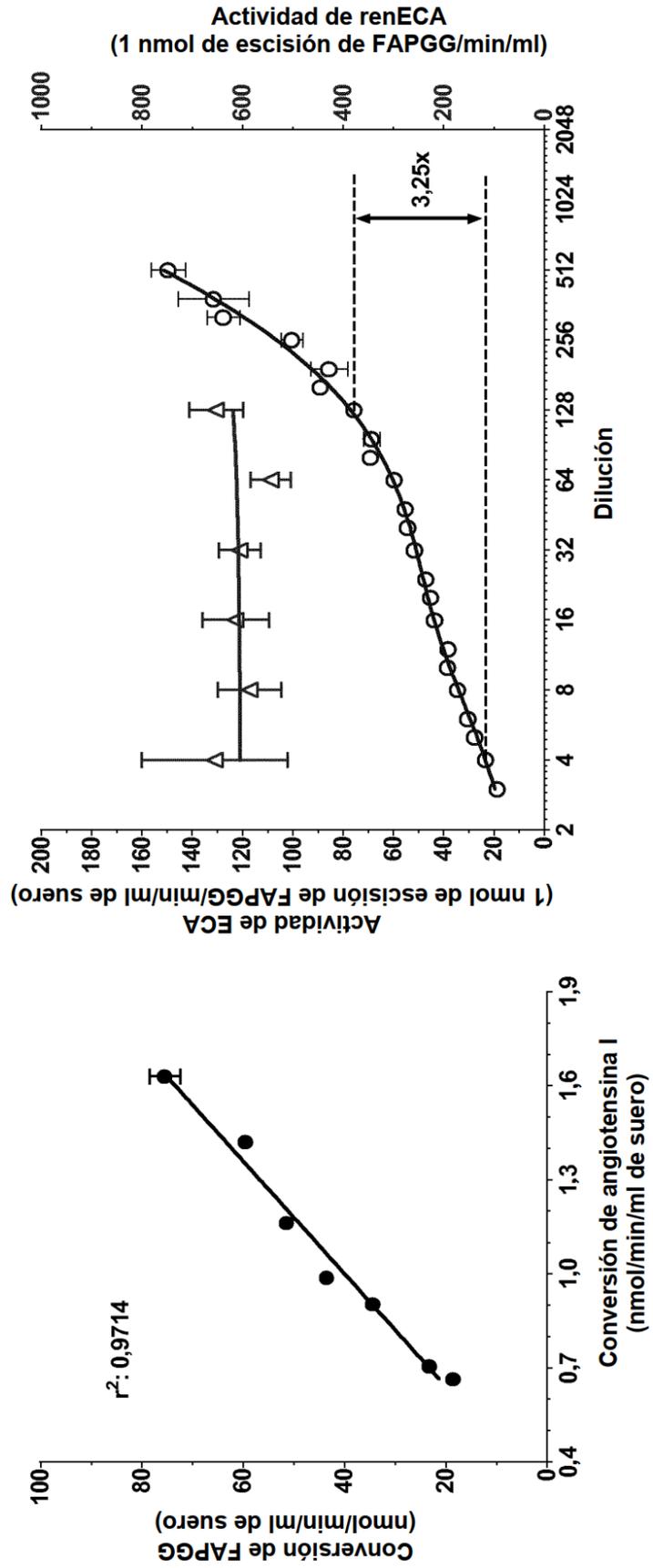


Figura 12 Masa molecular del inhibidor endógeno de ECA en el suero

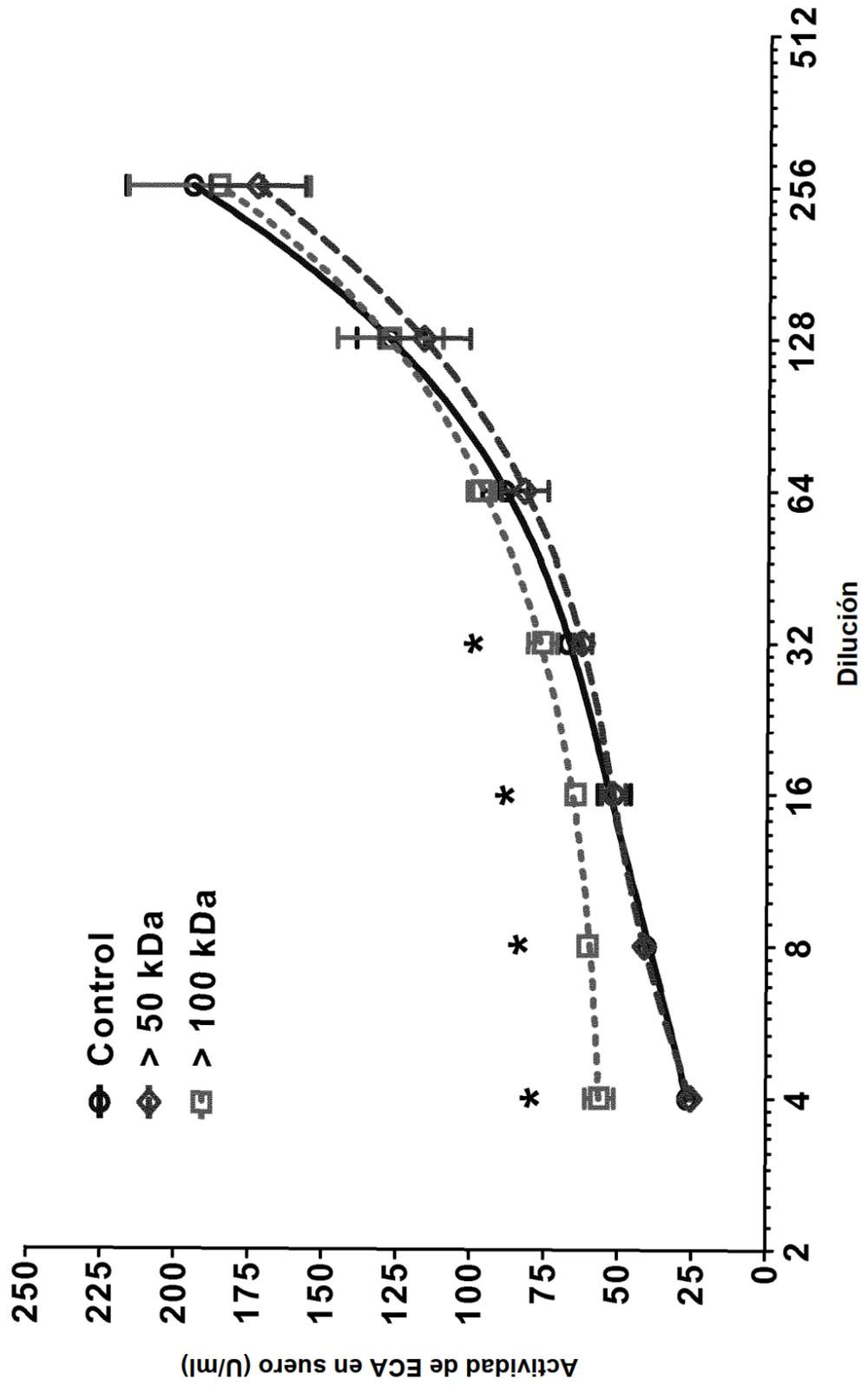


Figura 13 Inhibición de ECA en suero por seroalbúmina

