

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034043**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.20

(21) Номер заявки
201401335

(22) Дата подачи заявки
2012.06.06

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

**(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ ПЕПТИДОВ ИЗ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КАСКАДА В ОБРАЗЦАХ КРОВИ**

(43) **2015.04.30**

(86) **PCT/EP2012/060678**

(87) **WO 2013/182237 2013.12.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АТТОКВАНТ ДИАГНОСТИКС
ГМБХ (АТ)**

(72) Изобретатель:
**Поглич Марко, Швагер Корнелиа,
Лойбнер Ханс, Шустер Манфред (АТ)**

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A2-2009124330**

CUI ET AL.: "Simultaneous analysis of angiotensin peptides by LC-MS and LC-MS/MS: Metabolism by bovine adrenal endothelial cells", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, INC, NEW YORK, vol. 369, no. 1, 28 August 2007 (2007-08-28), pages 27-33, XP022217963, ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/J.AB.2007.06.045, abstract; fig. 1, 6, page 28, paragraph bridging left and right column section "discussion"

EP-A1-2015073

WO-A1-2011001029

YE MINGHAO ET AL.: "Murine Recombinant Angiotensin-Converting Enzyme 2 Effect on Angiotensin II-Dependent Hypertension and Distinctive Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitor Characteristics on Rodent and Human Angiotensin-Converting Enzyme 2", HYPERTENSION, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 60, no. 3, 9 July 2012 (2012-07-09), pages 730-740, XP008159840, ISSN: 0194-911X, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198622 [retrieved on 2013-02-04], section "Methods", abstract; fig. 5

(57) Изобретение раскрывает способ определения продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в биологических образцах, особенно в образцах крови, где образец инкубируют до достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов, вовлеченного в указанный протеолитический каскад, и где проводят количественное определение указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в равновесном состоянии из протеолитического каскада в образце.

B1

034043

034043

B1

Настоящее изобретение относится к измерению продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в образцах крови.

Количественные и качественные параметры продуктов деградации пептидов из протеолитических каскадов в крови существенно варьируют в зависимости от физиологического или биохимического статуса субъекта. Они могут, например, зависеть от состояния здоровья субъекта в связи с определенным или предполагаемым заболеванием, и/или лечения, и/или других факторов. Продукты протеолитической деградации главным образом зависят от регуляции и активности протеолитических ферментов в системе крови, которая сама по себе зависит от физиологического статуса пациента.

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) является протеолитическим каскадом, включающим множество ферментов и пептидов. Каскад начинается, когда ангиотензин I (ангиотензин 1-10 или Анг 1-10) высвобождается из пропептида ангиотензиногена (АТГ) посредством ренина, секретируемого почками. АТГ в избытке экспрессируется в печени человека и секретируется в кровоток, обеспечивая практически неисчерпаемый плазменный пул АТГ. Пептидные метаболиты, произведенные из Анг 1-10 под действием множества протеаз, действуют как лиганды для рецепторов ангиотензина в различных тканях, приводя к разнообразной панели физиологических функций, опосредованных ангиотензиновыми пептидами.

Регуляция кровяного давления является хорошо изученным физиологическим ответом, на который влияют ангиотензиновые пептиды. Ангиотензин II (ангиотензин 1-8 или Анг 1-8) продуцируется за счет протеолитического действия ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) путем удаления двух С-концевых аминокислот из Анг 1-10. Анг 1-8 связывается с клеточными рецепторами, приводя к вазоконстрикции и последующему повышению кровяного давления.

Эта ключевая роль АПФ в производстве Анг 1-8 делает его благоприятной фармакологической мишенью с главной фокусировкой на антигипертензивное лечение, нацеленное на снижение уровней Анг 1-8, приводящее к снижению кровяного давления. Это также отражается тем, что для лечения гипертензии используют широкую панель ингибиторов АПФ. Позднее были выявлены другие РАС-ферменты, включая ренин или нейтральную эндопептидазу (НЭП), в качестве потенциальных фармакологических мишеней для антигипертензивного лечения, при дополнительной оптимизации ингибиторов АПФ для снижения частоты побочных эффектов, которые, как полагают, обусловлены отсутствием селективности АПФ домена. Частые побочные эффекты, встречающиеся при применении ингибиторов АПФ, включают сухой кашель и ангиоэдему, и как полагают, обусловлены ингибированием деградации брадикинина (БК) этими ингибиторами, поскольку описано, что не только Анг 1-10, но также определенные БК пептиды расщепляются АПФ.

Такая ограниченная субстратная специфичность является очень распространенной характеристикой, наблюдаемой среди РАС ферментов. Помимо АПФ, который слегка отличается от других РАС ферментов благодаря своей двудоменной структуре, также известно, что ангиотензин-превращающий фермент 2 (АПФ2) способен к расщеплению Анг 1-8 и Анг 1-10 с получением ангиотензина 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензина 1-9 (Анг 1-9) соответственно.

Далее различные РАС протеазы могут разделять свои субстраты, что приводит к конкуренции ферментов за определенный субстрат. Например, известно, что Анг 1-10 расщепляется АПФ, АПФ2, НЭП и различными аминопептидазами. Все эти факторы создают очень сложную картину РАС, являющейся сетью взаимодействия различных ферментов, рецепторов и пептидов, обеспечивающих концентрации пептидов, опосредованные многочисленными факторами.

При сравнении опубликованных данных об уровнях в плазме растворимого АПФ и Анг 1-10 становится ясным, что АПФ присутствует в существенном молярном избытке по сравнению с Анг 1-10 пептидом в кровотоке. Это приводит к невозможности описания РАС посредством классической ферментативной кинетики, основанной на присутствии огромного избытка субстрата. При физиологических условиях, когда уровни ангиотензинового пептида в кровотоке не превышают 10-200 фмоль/мл, большинство ферментов присутствует в молярном избытке, по сравнению с их субстратами, заставляя исследователя отходить от классической кинетики Ментен для получения достоверного понятия о биохимических процессах при физиологических условиях в исходном матриксе образца.

Например, было описано, что Анг 1-10 разрушается АПФ2 с гораздо более низкой каталитической эффективностью, чем Анг 1-8. Эксперименты, показавшие это, проводили на искусственном матриксе с применением огромного избытка субстратов, по сравнению с соответствующими ферментами, получая максимальную скорость превращения АПФ2 для Анг 1-8 в Анг 1-7, которая в 65 раз превышала скорость превращения для Анг 1-10 в Анг 1-9 [Rice et al., *Biochem J.*, 383(2004), 45-51].

При совместном рассмотрении предыдущих данных и того факта, что многие ангиотензиновые пептиды демонстрируют биологическую активность, становится очевидным, что существует значительная потребность в оценке РАС в биологических образцах, с обеспечением сохранения физиологических концентраций субстрата в образце. Манипуляция РАС фармакологическими средствами меняет активность ферментов и скорости превращения пептидов на множестве уровней системы, что явно благоприятствует всесторонней оценке РАС для мониторинга эффективности лекарственных средства и селективности ингибиторов для определенных ферментативных реакций.

Например, для ингибиторов АПФ, которые, как было описано, ингибируют оба домена АПФ до известной степени при физиологических концентрациях субстрата, можно исследовать ингибирование превращения Анг 1-10 в Анг 1-8, но также потенциал ингибирования, касающийся превращения Анг 1-7 в ангиотензин 1-5 (Анг 1-5), или брадикинина 1-9 (БК 1-9) в брадикинин 1-7 (БК 1-7), или БК 1-7 в брадикинин 1-5 (БК 1-5), для оптимизации их профилей побочных эффектов.

При совместном рассмотрении опубликованных данных по концентрациям ангиотензиновых пептидов и метаболизирующих ферментов в плазме человека, значительной вариации среди различных групп, становится очевидным указание на низкую воспроизводимость использованных способов. Те не менее, отмечен значительный молярный избыток прогормона АТГ в плазме человека по сравнению с ренином, что означает, что он служит в качестве очень долговременного источника Анг 1-10, продуцируемого благодаря постоянной активности ренина в образцах плазмы. Этот факт также применяется в современных анализах АРП (активности ренина в плазме), где количество Анг 1-10, произведенного в течение определенного периода времени, используют для анализа активности ренина в образце. К сожалению, эти значения часто являются слишком низкими из-за отсутствия стабилизации (неполного ингибирования деградации) произведенного Анг 1-10, что требует хорошо определенного набора ингибиторов протеаз для обеспечения скорости деградации Анг 1-10, близкой к нулю [Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569]. Эти недостатки вместе со значительными вариациями среди доноров приводят к плохо воспроизводимой процедуре с ограниченной диагностической ценностью.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является обеспечение нового и усовершенствованного средства для анализа физиологического или биохимического статуса субъекта, особенно физиологического или биохимического статуса субъекта или пациента-человека, во время или после определенного терапевтического лечения, включая применение лекарства, операцию или гемодиализ, но не ограничиваясь ими; используя образец крови указанного субъекта.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ измерения продуктов деградации пептидов в протеолитическом каскаде в биологическом образце, особенно в образце крови, где образец инкубируют до достижения равновесного состояния для по меньшей мере одного продукта деградации пептидов, вовлеченного в указанный протеолитический каскад, и где в образце проводят количественное определение указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в концентрации равновесного состояния.

Термин "равновесное состояние" (РС), как применяется в настоящей заявке, означает, что действительная общая скорость деградации по меньшей мере одного продукта деградации пептидов, вовлеченного в протеолитический каскад, равна действительной общей скорости образования указанного продукта деградации пептидов, таким образом, приводя к устойчивой концентрации указанного продукта деградации пептидов, т.е. концентрации пептида при равновесном состоянии, которая по существу не варьирует в течение определенного периода времени, как указано ниже. Действительная общая скорость образования продукта деградации пептидов определяется как сумма действительных скоростей превращения всех ферментов, вовлеченных в образование указанного продукта деградации пептидов, т.е. указанный продукт деградации пептидов является прямым продуктом указанного фермента(ов). Общая действительная скорость деградации для продукта деградации пептидов определяется суммой действительных скоростей превращения для всех ферментов, вовлеченных в деградацию указанного продукта деградации пептидов, т.е. указанный продукт деградации пептидов является прямым субстратом указанного фермента(ов).

Термин «протеолитический каскад», как применяется в настоящей заявке, означает каскад, включающий по меньшей мере две последовательных протеолитических реакции. В одном варианте осуществления протеолитический каскад является каскадом по меньшей мере из двух, трех, четырех или пяти последующих реакций. Такой протеолитический каскад может включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 последовательных или не последовательных протеолитических реакций, или их комбинаций, которые могут быть разветвленными или многократно разветвленными. Например, протеолитические каскады в соответствии с настоящим изобретением включают ренин-ангиотензиновую систему (РАС), также называемую ренин-ангиотензин-альдостероновой системой (РААС), брадикининовую систему, кинин-калликреиновую систему, каскад свертывания крови, систему комплемента, путь апоптоза, каскады нейропептидов (например, систему окситоцина), каскады эндотелиновых пептидов, и каскады натрийуретических пептидов.

Термин "продукт деградации пептидов, вовлеченный в протеолитический каскад" или "продукт деградации пептидов из протеолитического каскада", как применяется в настоящей заявке, означает пептид, который является частью указанного протеолитического каскада, как субстрат (пептидный предшественник) или продукт по меньшей мере одного фермента, вовлеченного в протеолитический каскад, или как субстрат и продукт по меньшей мере двух ферментов, вовлеченных в протеолитический каскад. Соответственно, для протеолитического каскада РАС пептиды (или продукты деградации пептидов), вовлеченные в протеолитический каскад, могут быть выбраны из ангиотензина, ангиотензина I (Анг 1-10) и их продуктов биологической деградации, особенно ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина 2-10 (Анг 2-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина III (ангиотензина 2-8 или Анг 2-8), ангио-

тензина IV (ангиотензин 3-8 или Анг 3-8), ангиотензина 1-9 (Анг 1-9), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), ангиотензина 2-7 (Анг 2-7), ангиотензина 3-7 (Анг 3-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5). Для протеолитического каскада брадикинина пептиды (или продукты деградации пептидов), вовлеченные в протеолитический каскад, могут быть выбраны из каллидина (КД или Лиз-брадикинина) и продуктов его биологической деградации, особенно брадикинина 1-9 (БК 1-9), брадикинина 2-9 (БК 2-9), брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5). В одном варианте осуществления один или несколько продуктов деградации пептидов могут быть выбраны из пептидов, вовлеченных в один или несколько протеолитических каскадов, например, два или более протеолитических каскадов, где каскады могут быть отдельными или связанными или сопряженными, например, одним или несколькими идентичными или схожими ферментами или пептидами. В одном варианте осуществления протеолитический каскад является ренин-ангиотензиновой системой (РАС) или брадикининовой системой, или той и другой. Например, один или несколько продуктов деградации могут быть выбраны из РАС и системы брадикинина. В одном варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из ангиотензиногена, ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина 2-10 (Анг 2-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина III (ангиотензина 2-8 или Анг 2-8), ангиотензина IV (ангиотензина 3-8 или Анг 3-8), ангиотензина 1-9 (Анг 1-9), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), ангиотензина 2-7 (Анг 2-7), ангиотензина 3-7 (Анг 3-7), ангиотензина 1-5 (Анг 1-5), каллидина (КД или Лиз-брадикинина), брадикинина 1-9 (БК 1-9), брадикинина 2-9 (БК 2-9), брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5).

В одном варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из ангиотензина I (1-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5). В одном варианте осуществления продуктами деградации пептидов, подвергающимися количественному определению, являются ангиотензин I (1-10), ангиотензин II (ангиотензин 1-8 или Анг 1-8), ангиотензин 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензин 1-5 (Анг 1-5).

В другом варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5). В одном варианте осуществления продуктами деградации пептидов, подвергающимися количественному определению, являются ангиотензин II (ангиотензин 1-8 или Анг 1-8), ангиотензин 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензин 1-5 (Анг 1-5).

В еще одном варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из брадикинина 1-9 (БК 1-9), брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5). В одном варианте осуществления продуктами деградации пептидов, подвергающимися количественному определению, являются брадикинин 1-9 (БК 1-9), брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5).

В еще одном варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5). В одном варианте осуществления продуктами деградации пептидов, подвергающимися количественному определению, являются брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5).

Термины "фермент, вовлеченный в протеолитический каскад" или "фермент из протеолитического каскада", применяемые в настоящей заявке, означают фермент, являющийся частью указанного протеолитического каскада, образующего или разрушающего по меньшей мере один пептид, вовлеченный в протеолитический каскад. Соответственно для протеолитического каскада РАС ферменты, вовлеченные в протеолитический каскад, могут быть выбраны из ренина, аминокпептидаз (АП, особенно аминокпептидазы А (АПА) и аминокпептидазы N (АПN), дипептидиламинопептидаз (ДАП), карбоксипептидаз (особенно АПФ2), дипептидилкарбоксипептидаз (особенно АПФ) и эндопептидаз (особенно нейтральной эндопептидазы, также называемой неприлизином). Для протеолитического каскада брадикинина ферменты, вовлеченные в протеолитический каскад, могут быть выбраны из калликрейна, аминокпептидаз (АП, особенно аминокпептидазы А (АПА) и аминокпептидазы N (АПN), дипептидиламинопептидаз (ДАП), карбоксипептидаз (особенно АПФ2), дипептидилкарбоксипептидаз (особенно АПФ) и эндопептидаз (особенно нейтральной эндопептидазы, также называемой неприлизином). Термин "действительный", как применяется в настоящей заявке, означает действительную (или эффективную) скорость образования или деградации пептида, или действительную или эффективную скорость обмена фермента, в условиях, представленных в образце.

Термин "равный", как применяется в настоящей заявке, означает, что концентрация пептида, полученная в результате такой равной скорости образования или деградации указанного пептида ("равновесная концентрация пептида" или "равновесный уровень пептида"), или полученная от таких равных скоростей обмена по меньшей мере двух ферментов, вовлеченных в образование или деградацию указанного пептида ("равновесная скорость обмена пептида"), не варьирует более чем на минут, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. Соответственно действительные общие скорости обмена ферментов, вовлеченных в деградацию указанного пептида, определяют по действительным общим скоростям их субстратного пептида(ов), так чтобы любой вновь или дополнительно образованный субстрат был деградирован. Однако это не обязательно означает, что окончательная концентрация указанного пептида является нулевой, но окончательная концентрация, присутствующая в образце в равновесном состоянии, суще-

ственно не меняется, как подробно описано выше.

Соответственно в одном варианте осуществления концентрация указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов из протеолитического каскада остается в пределах постоянного диапазона на протяжении периода времени равновесного состояния, несмотря на постоянный поток формирования и деградации. В одном варианте осуществления концентрация указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в равновесном состоянии не меняется более чем на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% в течение периода времени по меньшей мере 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. В одном варианте осуществления концентрация указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в равновесном состоянии не меняется более чем на 15% или более чем на 10% в пределах 60 мин. Соответственно указанный пептид не проявляет ни существенного накопления, ни существенного снижения в течение вышеуказанных периодов времени.

В одном варианте осуществления образец инкубируют 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 мин или вплоть до 300 мин, перед количественным определением по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в концентрации равновесного состояния. В другом варианте осуществления образец может быть инкубирован в течение более 6 часов (ч), особенно в течение 8, 12, 18, 24 или 48 ч. Подходящие периоды инкубации зависят главным образом от данного протеолитического каскада, от определяемых пептидов, от природы образца и от параметров инкубации. Такие периоды инкубации могут быть легко определены специалистом в данной области техники. В одном варианте осуществления равновесное состояние является законсервированным (или стабилизированным, или замороженным, или погашенным) после инкубации. Термины "законсервированный", "стабилизированный", "замороженный" и "погашенный", как применяется в настоящей заявке, означают сохранение биохимического статуса, например консервацию уровней пептидов, например, путем ингибирования протеолитической деградации. Стабилизация пептидных уровней равновесного состояния (или уровней пептида *in vivo*) может быть выполнена путем добавления одного или нескольких ингибиторов протеаз, особенно путем добавления коктейля из ингибиторов протеаз. Соответственно, один или несколько ингибиторов протеаз могут быть добавлены после достижения при инкубации равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов: Подходящие ингибиторы протеаз или их комбинации могут быть выбраны специалистом в данной области техники и могут, например, включать комбинацию специфических или неспецифических ингибиторов ферментов, или их комбинацию. Один или несколько ингибиторов протеаз, или коктейль из ингибиторов протеаз обеспечивает полное ингибирование специально протеолитических этапов интересующего каскада (т.е. ферментов, формирующих и деградирующих определяемые пептиды), или каждого фермента протеолитического каскада.

В одном варианте осуществления ингибируется каждый этап протеолитического каскада, т.е. ингибируется каждый фермент, вовлеченный в протеолитический каскад, по меньшей мере одним компонентом из коктейля ингибиторов протеаз. В другом варианте осуществления коктейль ингибиторов протеаз содержит по меньшей мере один специфический или неспецифический ингибитор каждого класса протеаз, вовлеченных в протеолитический каскад. Коктейль ингибиторов протеаз может содержать один или несколько ингибиторов, подавляющих один или несколько ферментов, вовлеченных в протеолитический каскад. Примерами таких ингибиторов РАС являются лизиноприл (ингибитор АПФ) и алискирен (ингибитор ренина). Коктейль ингибиторов протеаз может также содержать один или несколько ингибиторов, подавляющих одну или несколько групп ферментов, вовлеченных в протеолитический каскад, например, таких как ЭДТА (ингибирует металлопротеазы). Далее, коктейль ингибиторов протеаз может содержать один или несколько неспецифических ингибиторов. В одном варианте осуществления коктейль ингибиторов протеаз содержит комбинацию по меньшей мере из двух вышеупомянутых классов ингибиторов. В другом варианте осуществления коктейль ингибиторов протеаз содержит один или несколько ингибиторов подающих (*feeding*) ферментов, особенно специфических ингибиторов этих ферментов.

Например, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре ингибитора протеаз добавляют в образец. В одном варианте осуществления коктейль ингибиторов протеаз включает пепстатин А, 1,10-фенантролин, ЭДТА, п-гидрокси-ртуть-бензойную кислоту и Z-Арг.

Альтернативно, или в дополнение к применению одного или нескольких ингибиторов протеаз или коктейля ингибиторов протеаз, равновесное состояние может быть сохранено путем добавления одного или нескольких хаотропных агентов, таких как йодид натрия, перхлорат натрия, перхлорат лития, хлорид магния, гуанидин тиоцианат (ГТЦ), гуанидиния хлорид, фенол, пропанол, бутанол, этанол, додецилсульфат натрия, тиомочевина, мочевины, или другие.

Альтернативно, или в дополнение к применению одного или нескольких ингибиторов протеаз или коктейля ингибиторов протеаз, равновесное состояние может быть сохранено другими средствами физической инактивации ферментов в образце, например, денатурацией фермента, индуцированной нагреванием, солью, рН или детергентом; или путем охлаждения, например, с помещением образцов на лед непосредственно после инкубации. Для одного или нескольких из последующих этапов обработки образцов, например отделения плазмы или сыворотки и разделения путем твердофазной экстракции (ТФЭ; например, для удаления матрикса и/или обогащения пептида), соответствующая температура окружающей среды может быть выбрана для обеспечения инактивации всех ферментов в образце. Например, лю-

бая предварительная обработка образца перед анализом может быть выполнена при температуре окружающей среды 4°C (или ниже), по меньшей мере до полной денатурации или инактивации ферментов, вовлеченных в протеолитический каскад (например, до элюирования с ТФЭ колонки).

Напротив, классические анализы АРП нацелены на полное ингибирование путей деградации Анг I немедленно после получения образца, а ферментативную активность рассчитывают на основе скорости аккумуляции пептида, образованного указанным ферментом. Даже если ингибирование путей деградации Анг I может быть неполным в таких анализах АРП, они все еще далеки от какого-либо равновесного состояния в соответствии с настоящим изобретением, поскольку конечная концентрация Анг I существенно меняется со временем. В анализе АРП, как описано, например, Bystrom et al. (Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569), концентрация Анг I существенно возрастает со временем. Далее современные анализы стараются оценить общую активность РАС путем измерения конформационной активируемой формы ренина в образцах плазмы с помощью методов на основе ИФА и РИА (DRG Diagnostics, <http://www.drg-diagnostics.de/49-1-DRG+Renin+active+ELISA.html>). В отличие от ПСР-фингерпринтинга, эти анализы критически зависят от специфичности используемых антител, и не позволяют сделать выводы о концентрации эффекторных пептидов в образцах, ответственных за физиологические эффекты РАС. Причиной этого является то, что существует множество ферментов, влияющих на уровень эффекторных пептидов. Все эти пептиды одновременно анализируются посредством ПСР-фингерпринтинга, в то время как современные анализы фокусируются на анализе активности или концентрации только одного фермента в образце.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в равновесном состоянии действительная скорость обмена подающего фермента является максимальной, т.е. подающий субстрат присутствует в существенном молярном избытке, по сравнению с подающим ферментом, и любое добавление внешнего подающего субстрата не приводит к дальнейшему повышению действительной скорости обмена подающего фермента. Соответственно, подающий фермент из протеолитического каскада является ферментом, ответственным за подающую реакцию превращения, т.е. этап, ограничивающий скорость последующего протеолитического каскада (или критический элемент протеолитического каскада). Для протеолитического каскада РАС при физиологических условиях подающим ферментом является ренин, ответственный за превращение ангиотензиногена в ангиотензин I. В физиологических системах (например, в организме, в образцах крови, плазмы или сыворотки) ангиотензиноген в качестве субстрата ренина присутствует при существенном молярном избытке ренина. Однако, в одном варианте осуществления изобретения, один или несколько, или все другие ферменты протеолитического каскада РАС, например, такие как аминопептидазы (особенно АПА и/или АПН), дипептидиламинопептидазы, карбоксипептидазы (особенно АПФ2), дипептидил-карбоксипептидазы (особенно АПФ) и/или эндопептидазы (особенно нейтральная эндопептидаза, также называемая неприлизином), присутствуют в образце в концентрациях, достаточных для деградации любых вновь или дополнительно образованных субстратов, и таким образом, позволяют установить равновесное состояние для указанных ферментов и пептида(ов) во время инкубации, т.е. их действительные общие скорости обмена определяют по действительным общим скоростям обмена их субстратного пептида(ов).

В соответствии с настоящим изобретением термин "подающий фермент" означает фермент с максимальной действительной скоростью обмена, т.е. с действительной скоростью обмена, которая является максимальной достигаемой скоростью обмена для указанного фермента в образце. Термин "максимальная достигаемая скорость обмена" означает скорость обмена фермента, содержащегося в образце, которая может быть достигнута при определенных условиях в образце, если субстратный пептид присутствует (или возможно, будет присутствовать) в существенном молярном избытке по сравнению с ферментом (или практически неисчерпаемом количестве), по меньшей мере, до достижения равновесного состояния. Соответственно действительная скорость обмена подающего фермента не может быть дополнительно повышена путем добавления внешнего субстрата, поскольку подающий субстрат уже присутствует в значительном молярном избытке по сравнению с подающим ферментом. Если, например, любой внешний субстратный пептид (т.е. пептид, вовлеченный в протеолитический каскад) или аналог такого субстрата добавляют в образец до или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние, это может, в соответствии с определением из настоящего изобретения, приводить к изменению этапа(ов), ограничивающего скорость протеолитического каскада, и таким образом, также подающего фермента(ов) протеолитического каскада, если количество добавленного субстратного пептида достаточно для обеспечения максимальной достигаемой скорости обмена по меньшей мере одного фермента, вовлеченного в деградацию указанного субстратного пептида (т.е. иного фермента, чем подающий фермент в физиологических условиях). Например, если исследуемым протеолитическим каскадом является РАС, и если значительный молярный избыток Анг 1-10 (или его аналога, например, Анг 1-10, несущего массовую метку или любую ковалентную модификацию, включая аминокислотные замены), по сравнению с одним или несколькими из ферментов, вовлеченных в деградацию Анг 1-10, добавляют в образец до или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние, по меньшей мере один или все ферменты, вовлеченные в деградацию Анг 1-10 (например, АПФ, АПФ2, АП и/или НЭП) будут достигать максимально достигаемых скоростей обмена, и таким образом, станут доступным подающий

этап(ы), ограничивающий скорость, для последующей протеолитической реакции (реакций) каскада.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в образец может быть добавлен подающий фермент. Добавление подающего фермента повышает пропускную способность ферментативного каскада, и таким образом, приводит к повышению абсолютных уровней пептидов, в то время как относительные уровни (отношения пептидов) остаются неизменными. Соответственно уровни равновесного состояния для одного или нескольких пептидов все еще отражают физиологическую ситуацию, т.е. активности ферментов, однако общие уровни пептидов возрастают пропорционально. Это может быть полезным, например, если уровни пептидов, измеренные без добавления подающего фермента, будут ниже предела обнаружения способа, используемого для количественного определения пептида(ов). Факультативно может также быть добавлен подающий субстрат. Это может гарантировать то, что подающий субстрат находится и остается в молярном избытке по сравнению с подающим ферментом, и что подающий субстрат все еще присутствует в практически неисчерпаемых количествах, приводя к скорости обмена подающего фермента, стабильной в течение определенного времени, определяя равновесное состояние, даже при добавлении подающего фермента.

В другом варианте осуществления в равновесном состоянии действительная общая скорость деградации продукта подающего фермента (т.е. пептида, образованного подающим ферментом) равна действительной общей скорости его образования. В другом варианте осуществления протеолитическим каскадом является РАС, а продуктом подающего фермента в соответствии с вышеуказанным определением является Анг I. В указанном варианте осуществления действительная скорость обмена фермента, деградирующего Анг I в равновесном состоянии, равна действительной скорости обмена ренина, который является ферментом, образующим Анг I, если только один ферментативный путь деградации Анг I "открыт" в образце, т.е. только один фермент, деградирующий Анг I, является активным. Если более одного фермента, деградирующего Анг I, является активным в образце, сумма действительных скоростей обмена указанных активных ферментов, деградирующих Анг I (т.е. действительная общая скорость деградации Анг I), равна действительной скорости обмена ренина (т.е. действительной общей скорости образования Анг I) в указанном варианте осуществления.

В другом варианте осуществления в равновесном состоянии действительная общая скорость деградации более чем одного пептида, особенно двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти пептидов, вовлеченных в протеолитический каскад, равна действительной общей скорости образования указанного пептида(ов). В еще одном варианте осуществления в равновесном состоянии актуальная общая скорость деградации каждого пептида, вовлеченного в протеолитический каскад, равна действительной общей скорости формирования указанных пептидов.

Соответственно, равновесное состояние достигается для одного или нескольких пептидов и связанных ферментов, т.е. ферментов, формирующих или деградирующих указанный пептид(ы). Как описано выше, равновесное состояние достигается, если конечная концентрация по меньшей мере одного пептида, двух или более пептидов, или всех пептидов, вовлеченных в протеолитический каскад, не меняется более чем на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% в течение периода времени по меньшей мере 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. Указанное равновесное состояние достигается после инкубации образца в течение 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин, или в течение 8, 12, 18, 24 или 48 ч. Равновесное состояние продолжается в течение по меньшей мере 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин.

В одном варианте осуществления изобретения в равновесном состоянии общая максимальная достигаемая скорость деградации по меньшей мере одного пептида, вовлеченного в протеолитический каскад, равна или больше действительной общей скорости его образования. В соответствии с настоящим изобретением максимальная достигаемая скорость деградации пептида является общей скоростью деградации, которую можно достичь в определенных условиях в присутствии значительного молярного избытка указанного пептида по сравнению с каждым ферментом, деградирующим указанный пептид (или практически неисчерпаемого количества указанного пептида), т.е. путем добавления внешнего пептида. Соответственно, максимальная достигаемая скорость деградации пептида является суммой максимальных достигаемых скоростей всех ферментов, вовлеченных в деградацию указанного пептида.

В одном варианте осуществления в начале времени инкубации количество всех ферментов, вовлеченных в протеолитический каскад, находится в избытке от количества их соответствующего субстрата(ов), за исключением подающего фермента из протеолитического каскада. В другом варианте осуществления количество указанного одного или нескольких ферментов или всех ферментов, вовлеченных в протеолитический каскад, находится в избытке от количества соответствующего субстрата(ов) в течение всего периода времени инкубации, за исключением подающего фермента из протеолитического каскада.

В другом варианте осуществления условия являются такими, как указано выше (т.е. количество фермента находится в избытке от количества соответствующего субстрата, и/или скорость образования пептида является равной скорости деградации в равновесном состоянии), применяясь по меньшей мере к одному или нескольким анализируемым пептидам, и/или к соответствующему анализируемому ферменту(ам), формирующему или деградирующему указанный пептид(ы).

Например, если способ из настоящего изобретения применяют для оценки одного или нескольких

компонентов протеолитического каскада РАС, а анализируемыми пептидами являются, например, Анг 1-10 и Анг 1-8, это означает, что пока не будет достигнуто равновесное состояние, действительная скорость образования Анг 1-10 ренином является выше суммы действительных скоростей деградации всех ферментов, вовлеченных в деградацию Анг 1-10, включая АПФ, аминопептидазы и АПФ2, но не ограничиваясь ими; а действительная скорость образования Анг 18 АПФ является выше суммы действительных скоростей деградации всех ферментов, вовлеченных в деградацию Анг 1-8, включая АПФ2, АП и/или ДАП, но не ограничиваясь ими. Соответственно, концентрация Анг 1-10 и Анг 1-8 возрастает, т.е. Анг 1-10 и Анг 1-8 накапливаются, пока не будет достигнуто равновесное состояние. Когда достигается равновесное состояние, действительная скорость образования Анг 1-10 равна сумме действительных скоростей обмена всех ферментов, вовлеченных в деградацию Анг 1-10 (действительной общей скорости деградации Анг 1-10); а действительная скорость образования Анг 1-8 равна сумме действительных скоростей обмена всех ферментов, вовлеченных в деградацию Анг 1-8 (действительной общей скорости деградации Анг 1-8). Если, например, анализируют все десять пептидов, вовлеченных в РАС (как показано, например, на фиг. 2, 3 и 4А, 4С1 и 4С2), вышеуказанные условия должны применяться ко всем десяти пептидам или ко всем ферментам, вовлеченным в РАС.

Соответственно в одном варианте осуществления равновесного состояния из настоящего изобретения, по меньшей мере одна реакция протеолитической деградации должна быть активной или "открытой" для по меньшей мере одного, особенно для каждого пептида из протеолитического каскада до степени, обеспечивающей, чтобы действительная общая скорость деградации была равной действительной общей скорости образования указанного пептида, т.е. не была ограниченной или "закрытой", например, путем использования одного или нескольких ингибиторов протеаз, до степени, в которой действительная общая скорости образования превышает действительную или максимальную достигаемую скорость деградации указанного пептида.

В одном варианте осуществления хелатирующие агенты, такие как, например, ЭДТА, ЭГТА, 8-гидроксихинолин, фенантролин и димеркапрол (также называемый британским антилюизитом), не добавляют до и/или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние, особенно для РАС каскада или других протеолитических каскадов, где вовлечены металлопротеазы, поскольку хелатирующие агенты обладают ингибирующим эффектом в отношении металлопротеаз за счет хелатирования двухвалентных ионов.

В одном варианте осуществления хаотропные агенты, такие как йодид натрия, перхлорат натрия, перхлорат лития, хлорид магния, гуанидин тиоцианат (ГТЦ), гуанидиния хлорид, фенол, пропанол, бутанол, этанол, додецилсульфат натрия, тиомочевина, мочевина и/или другие, не добавляют до и/или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние.

В одном варианте осуществления равновесное состояние достигается в физиологических условиях для указанного протеолитического каскада, что означает, что компоненты протеолитического каскада (ферменты и субстратные или итоговые пептиды), их общие и/или относительные количества, присутствующие в биологическом образце, взятом из организма, а также матрикс по отношению к составу и/или рН образца не меняются, или по существу не меняются до и/или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние. В одном варианте осуществления концентрации ферментов и/или пептидов, вовлеченных в протеолитический каскад, присутствующих в биологическом образце, взятом из организма, не меняются до и/или во время инкубации, пока не достигается равновесное состояние.

В другом варианте осуществления субстраты или аналоги субстратов любого фермента(ов), вовлеченного в протеолитический каскад, например, такие как внутренние стандарты или стандарты деградации, в их нативной форме или в форме, модифицированной меткой (например, изотопной и/или флюоресцентной меткой, и/или аминокислотными модификациями или заменами по меньшей мере одной аминокислоты), не добавляют до и/или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние. В одном варианте осуществления настоящего изобретения протеолитическим каскадом является РАС, и ни ангиотензиноген, ни ангиотензин I и/или ангиотензин II, ни любые их аналоги не добавляют до и/или во время инкубации, пока не достигается равновесное состояние.

В другом варианте осуществления дополнительные вещества или реагенты, например, такие как буферные вещества (Трис, ФБР, МЭС, ГЭПЭС, цитрат, борат, карбонат или гидрокарбонат (или бикарбонат) и/или другие буферные вещества или соответствующие буферные растворы не добавляют до и/или во время инкубации, пока не достигается равновесное состояние.

В другом варианте осуществления вещества или реагенты, например, такие как ЭДТА, ЭГТА, ПМСФ, АЭБСФ (4-(2-аминоэтил) бензолсульфонил фторид гидрохлорид), БСА, малеиновая кислота, малеиновый ангидрид, муравьиная кислота и/или вода (в любой форме, например, деионизированная и/или дистиллированная и т.д.), не добавляют до и/или во время инкубации, пока не достигается равновесное состояние.

Однако, несмотря на вышеуказанное, один или несколько таких вышеупомянутых ингибиторов протеаз, хелатирующих агентов, хаотропных агентов, субстратов, стандартов, БСА, буферных веществ, и/или других веществ или реагентов могут быть добавлены, как только достигнуто равновесное состояние, и факультативно погашены.

В частности, один или несколько стандартов, например, внутренних стандартов и/или стандартов деградации, могут быть добавлены при достижении равновесного состояния и заморожены. Стандартами являются, например, пептиды из протеолитического каскада, модифицированные массовой меткой и/или химической меткой (например, изотопной или флюоресцентной меткой, и/или аминокислотными модификациями, и/или применением массовых меток, и/или заменами по меньшей мере одной аминокислоты). Соответственно внутренние стандарты являются внутренними стандартами со стабильной изотопной меткой, например, раскрытыми в WO 03/016861 A. В одном варианте осуществления биологический образец инкубируют после взятия у субъекта (*ex vivo*), т.е. матрикс образца и/или концентрации анализируемых компонентов протеолитического каскада не модифицируют, но факультативно дополнительно обрабатывают (например, для получения плазмы или сыворотки), до или после достижения и стабилизации равновесного состояния. Факультативно, антикоагулянты, т.е. вещества, предотвращающие коагуляцию (останавливающие свертывание крови), могут быть добавлены в биологический образец до и/или во время инкубации, пока не достигается равновесное состояние. Однако такие антикоагулянты не должны существенно влиять на анализируемые протеазы протеолитического каскада. Подходящим антикоагулянтом для применения в способе в соответствии с настоящим изобретением является гепарин.

Если анализируемым протеолитическим каскадом является каскад свертывания крови, специалист в данной области техники может определить антикоагулянтные агенты для добавления в образец до или во время инкубации, пока не достигается равновесное состояние, предотвращающие свертывание крови, но позволяющие установить равновесное состояние по меньшей мере для одного анализируемого пептида. Например, может быть выбран антикоагулянт, который ингибирует свертывание крови на этапе после протеолитического каскада, т.е. не ингибирующий какой-либо фермент(ы), вовлеченный в деградацию анализируемого пептида(ов) (прежде протеолитического каскада).

Перед анализом образцы могут быть предварительно обработаны или дополнительно обработаны, например, посредством отделения плазмы или сыворотки (например, путем центрифугирования, или активации коагуляции с последующим центрифугированием), и/или очистки твердофазной экстракцией (ТФЭ), например, для удаления матрикса и/или обогащения пептидов. Соответственно твердофазную экстракцию можно проводить с материалом для обращенно-фазовой хроматографии, материалом для хроматографии гидрофобного взаимодействия, материалом для ионообменной хроматографии, материалом для аффинной хроматографии, например, материалом для обращенно-фазовой хроматографии, особенно с C18, C8 или C6H5 (фенил) материалом.

В одном варианте осуществления один или несколько образцов концентрируют до сухого состояния после элюции с твердой поверхности, и они могут быть восстановлены в ВЭЖХ-совместимом растворителе, что означает, что состав растворителя не мешает связыванию одного или нескольких анализируемых веществ с МС-сцепленной ВЭЖХ колонкой. Растворитель для восстановления является, например, водным растворителем, который может быть дополнен добавками, включая пропанол, бутанол, 2-бутанол, пентанол, 2-пропанол, ацетон, метилэтилкетон, ацетонитрил, метанол, этанол, кислоты или основания для повышения растворимости анализируемых веществ и/или облегчения связывания анализируемых веществ с ВЭЖХ колонкой.

В другом варианте осуществления способы в соответствии с настоящим изобретением включают этапы: обеспечения образца, обработанного с антикоагулянтом; факультативно, дополнительной обработки образца для получения образца плазмы или сыворотки; инкубации образца до достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов, вовлеченного в протеолитический каскад; консервации указанного равновесного состояния; факультативно, добавления одного или нескольких внутренних стандартов, как только достигается равновесное состояние; проведения твердофазной экстракции с образцом; и анализа образца. Отделение плазмы или сыворотки можно проводить до или после этапа инкубации, пока не будет достигнуто (и факультативно стабилизировано) равновесное состояние, в зависимости от того, нужно ли исследовать равновесное состояние в плазме, сыворотке или цельной крови.

Анализ по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в концентрации равновесного состояния может быть выполнен, например, посредством масс-спектрометрии (МС); посредством жидкостной хроматографии, такой как жидкостная хроматография высокого давления (также называемая высокоэффективной жидкостной хроматографией, ВЭЖХ); в частности, жидкостной хроматографии - электрораспылительной ионизации - масс-спектрометрии (ЖХ-МС), и/или жидкостной хроматографии-танDEMной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Например, Cui et al. (*Anal Biochem.* 369 (2007), 27-33) описывают способы жидкостной хроматографии - электрораспылительной ионизации - масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии-танDEMной масс-спектрометрии для количественного определения ангиотензиновых пептидов. Для каждого пептида и соответствующих внутренних стандартов можно определять различные массовые переходы. Производительность способа можно контролировать с применением образцов для качественного контроля.

Такие образцы для качественного контроля могут включать, например, биологические образцы с предварительно определенными концентрациями анализируемых веществ, а также синтетические образцы, содержащие смесь предварительно определенных концентраций синтетических пептидов. Например,

образец для качественного контроля может быть образцом пула крови, плазмы или сыворотки, или образцом пула гомогената ткани с предварительно определенными концентрациями одного или нескольких пептидов. Концентрации ангиотензиновых пептидов можно рассчитать по соотношению сигналов эндогенных пептидов и сигналов внутренних стандартов, с тем условием, чтобы интегрированные сигналы достигали отношения сигнала к шуму выше 10.

Далее, анализ можно выполнить посредством радиоиммунного анализа (РИА) или иммуноферментного анализа (ИФА). Факультативно, этап ВЭЖХ очистки может быть выполнен перед количественным определением продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада на основе РИА или ИФА.

В одном варианте осуществления предварительную обработку образца, обработку образца и/или анализ образцов можно выполнять в формате планшета с множеством лунок, например, на 96 луночном планшете.

Настоящее изобретение обеспечивает новый инструмент для анализа физиологического или биохимического статуса субъекта на основе наблюдений одного или нескольких протеолитических каскадов у субъекта, в частности, в системе крови субъекта. В частности, способы из настоящего изобретения обеспечивают определение уровня множества пептидов из протеолитических каскадов в условиях равновесного состояния. Далее способы из настоящего изобретения обеспечивают оценку протеолитического каскада компартмент-специфическим образом, например, РАС можно анализировать в различных компартментах, таких как цельная кровь, сыворотка, а также плазма. Анализ продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает результат для физиологического или биохимического статуса субъекта, подобный "отпечаткам пальцев" ("фingerprint-подобный"), или fingerprint-подобный профиль ферментативной активности субъекта, который может быть показателем присутствия или отсутствия некоторых заболеваний, или эффективности или неэффективности лечения этого заболевания (с тем условием, конечно, что заболевание напрямую или опосредованно влияет на протеолитический каскад). Кроме того, способы изобретения обеспечивают сравнение fingerprintов *in vivo* (образцы немедленно стабилизируют, и таким образом, они отражают уровни пептидов в кровотоке) и *ex vivo* (уровни пептидов при равновесном состоянии в плазме, сыворотке или цельной крови).

Соответственно способы из настоящего изобретения можно применять для изучения протеолитического каскада в целом, физиологического или биохимического статуса у пациента или группы пациентов; для диагностики заболевания, напрямую или опосредованно связанного с протеолитическим каскадом (или его отклонением), для определения лечения или режима лечения такого заболевания; для определения комбинаций фиксированных доз, для исследования механизма действия; для минимизации побочных реакций или нежелательных явлений, связанных с лекарствами; или для исследования фармакологии используемых лекарственных средств или кандидатов в лекарственные средства, например, для оценки кратковременных и долгосрочных эффектов или токсичности.

Далее, способы в соответствии с настоящим изобретением можно применять для скрининга и разработки новых лекарственных средств, биомаркеров или параметров биомаркеров, особенно для такого скрининга в физиологическом матриксе указанных лекарственных средств или биомаркеров.

В одном варианте осуществления способы в соответствии с настоящим изобретением применяются в качестве биомаркерного анализа для патологических состояний или заболеваний, связанных с протеолитическим каскадом (каскадами) при исследовании со способами в соответствии с настоящим изобретением. Например, не только концентрация одного из продуктов деградации пептидов, но весь fingerprint равновесного состояния (РС-fingerprint), включающий некоторые или все пептиды, вовлеченные в исследуемый протеолитический каскад в соответствии с настоящим изобретением, и/или математические функции (например, продукты, отношения, суммы, разницы) концентраций двух или более продуктов деградации пептидов, и/или комбинации по меньшей мере двух из указанных математических функций, можно применять в качестве биомаркера (или компиляции биомаркеров).

В другом варианте осуществления способы в соответствии с настоящим изобретением можно применять для определения специфической группы пациентов для лечения, например, для идентификации отвечающих и не отвечающих на лечение.

Способы в соответствии с настоящим изобретением можно также применять в качестве сопутствующей диагностики. Сопутствующей диагностикой являются способы анализа (тесты или определения), предназначенные для содействия врачу в выполнении решений по лечению пациентов. Это осуществляется путем обеспечения информации о том, как лекарства работают в организме, и таким образом, выяснения эффективности и/или безопасности специфического лекарства или класса лекарств для отдельных пациентов, целевой группы или подгруппы пациентов. Имеются две основных группы сопутствующей диагностики, которые включают тесты, применяемые для лекарств, которые уже имеются в продаже, а также тесты, которые уже применяются в доклинической или клинической фазе разработки потенциального лекарства. Применение сопутствующей диагностики для лекарств, находящихся на ранней стадии разработки, может существенно изменить процесс разработки лекарства и коммерциализации лекарств - кандидатов путем отбора более безопасных лекарств с наименьшими побочными эффектами, с

повышенной терапевтической эффективностью, быстрым и более рентабельным образом.

Соответственно субъекта, от которого получен биологический образец, можно лечить одним или несколькими фармацевтическими композициями (*in vivo*), например фармацевтической композицией, содержащей ингибитор протеаз, в частности, если способ в соответствии с настоящим изобретением используется для контроля эффектов фармацевтической композиции, или для определения оптимальной дозы фармацевтической композиции, или для оценки каких-либо потенциальных токсических взаимодействий одной или нескольких фармацевтических композиций, или для оценки взаимодействия множества лекарств.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения субъект является человеком. В другом варианте осуществления субъект является животным, например млекопитающим, грызуном, свиньей или обезьяной.

Способ в соответствии с настоящим изобретением является стандартизированной процедурой для общей оценки протеолитического каскада в образцах крови, но также пригоден для протеолитических каскадов в других образцах, особенно биоптатах ткани, гомогенатах ткани, срезах ткани, ликворе, желчи, моче и т.д. Настоящее изобретение можно применять в принципе для всех протеолитических каскадов (под контролем ферментативного расщепления белков или пептидов в продукты деградации пептидов, являющиеся или метаболитами, или промежуточными соединениями, или конечными продуктами протеолитического каскада), присутствующих в кровеносной системе. Настоящее изобретение особо пригодно для наиболее значимых протеолитических каскадов в кровеносной системе человека, таких как РАС, каскад свертывания крови, система комплемента, путь апоптоза, нейропептидные каскады, каскады эндотелиновых пептидов, каскады натрийуретических пептидов. В настоящем изобретении обеспечивается способ измерения концентраций пептидов при равновесном состоянии, отражающий активность и скорости превращения метаболизирующих их ферментов. Концентрация пептидов при равновесном состоянии в этом контексте означает, что скорость его образования равна скорости его деградации, приводя к концентрации пептида, не меняющейся по существу или в значительной степени в течение определенного периода времени, и сильно зависящей от аффиностей ферментов к их субстратам при определенных условиях, а не от максимальных скоростей превращения фермента, как подробно описано выше. Поскольку настоящее изобретение связано с биологическими системами, ясно, что термин "равновесное состояние" не может рассматриваться как отдельная достигаемая точка, но скорее как кинетическая целевая область концентраций пептидов, которые по существу не меняются со временем в течение определенного периода времени. Более точные периоды времени до достижения концентраций равновесного состояния зависят главным образом от данного протеолитического каскада, от определяемых пептидов, от природы образца и от параметров инкубации. Их можно легко определить для каждого каскада. Как правило, "окно равновесного состояния", где можно проводить количественное определение в соответствии с настоящим изобретением, скорее является широким, по меньшей мере, для некоторых протеолитических каскадов, особенно тех, что в крови. Обычно равновесное состояние достигается после определенного времени инкубации, которое определяют эмпирически (например, 30 мин для РАС системы), а затем остается стабильным в течение длительного периода времени (например, 6 ч для РАС системы). Затем равновесное состояние нарушается эффектами, такими как деградация и инактивация вовлеченных ферментов, или отсутствие подающего субстрата в образце. Время стабильности (t_s) для данного каскада, основанное на концентрации подающего субстрата, можно рассчитать путем деления концентрации подающего субстрата (или подающего предшественника пептида) (c_f) за вычетом фермент- и образец-специфичной константы, определяющей минимальную концентрацию субстрата для достижения максимальной скорости обмена подающего фермента в образце (c_{min}), на скорость обмена подающего фермента из каскада, таким образом, определяя скорость добавления (V_f) каскада.

$$t_s = (c_f - c_{min})/V_f$$

t_s - время стабильности на основе концентрации подающего субстрата [ч],

c_f - концентрация подающего субстрата [моль/л],

c_{min} - минимальная концентрация субстрата, специфичная для образца, для достижения максимальной скорости обмена подающего фермента в образце [моль/л],

V_f - скорость прохождения каскада [[моль/л]/[ч]] и

$$c_{min} = f \cdot c_E$$

f - смещение,

c_E - концентрация подающего фермента.

Например, применение этих формул выше к РАС, где подающее превращение осуществляется ренином, дает время стабильности равновесного состояния РАС на основе расчетной концентрации подающего субстрата примерно от 60 до 200 ч, на основе различных опубликованных значений для АРП (активности ренина в плазме), КРП (концентрации ренина в плазме), см., например, [Nishiyama et al. 2010, and Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569], и с применением концентрации АТГ, например 70 мкг/мл плазмы и фактора смещения, например 1000. Конечно, указанное время стабильности равновесного состояния на основе расчетной концентрации подающего субстрата служит лишь как грубая и теоретическая контрольная точка, поскольку действительное время стабильности равновесного состоя-

ния может существенно различаться в образцах.

Способ в соответствии с настоящим изобретением особенно пригоден для мониторинга и анализа Анг 1-10 и продуктов его деградации, таким образом, для наблюдения статуса РАС в образцах крови человека. Концентрации равновесного состояния для Анг 1-10 и продуктов его деградации являются высоко показательными для физиологического или биохимического статуса субъекта. Например, отклонения от распределения продуктов деградации Анг 1-10 являются показателем нарушения функции ферментов РАС и/или системы брадикинина, способного приводить, например, к патологическому повышению кровяного давления или другим патологическим состояниям или заболеваниям. С другой стороны, по распределению и относительным концентрациям продуктов деградации Анг 1-10 в равновесном состоянии в соответствии с настоящим изобретением можно контролировать тип и эффективность терапевтических мер, нацеленных на РАС. К удивлению, концентрации равновесного состояния в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают гораздо лучшие индикации и корреляции, чем определение Анг 1-10 или других продуктов деградации в образцах плазмы, в которых не достигается равновесное состояние (т.е. "классических" немедленно стабилизируемых образцах крови).

В отличие от способов из предшествующего уровня техники, где применяют ингибиторы для немедленной стабилизации пептидов, продуцируемых определенными ферментами, с ограниченным успехом [Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569], в соответствии с настоящим изобретением, образцу позволяют достичь равновесного состояния, определяемого активностью фермента, по меньшей мере для одного пептида, вовлеченного в протеолитический каскад. Этот инновационный подход обеспечивает высоко воспроизводимую общую оценку протеолитического каскада, особенно РАС, в физиологическом матриксе образца, при интеграции всех ферментативных активностей, вовлеченных в метаболизм пептидов в протеолитическом каскаде. Другим преимуществом по сравнению с методиками из предшествующего уровня техники является то, что концентрации субстратов в анализе в соответствии с настоящим изобретением, как правило, остаются ниже концентрации метаболизирующих ферментов (за исключением подающего фермента), с учетом аффинности фермента к каждому отдельному субстрату при данных условиях в образце (например, физиологических условиях), в отличие от анализов ферментативной активности *in vitro*, где этой важной характеристикой пренебрегают с целью упрощения путем применения избыточных количеств субстрата.

Наконец, измерение уровня пептидов при равновесном состоянии способом в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает идентификацию потенциальных участков нарушения регуляции в образцах пациента, обеспечивая путь специфического подхода к пациенту для терапевтической манипуляции протеолитическими каскадами, на которые влияет заболевание пациента (например, выбор типа РАС-направленного медикамента в лечении гипертензии и прогнозирование лекарственной резистентности), и обладает существенным потенциалом для применения способа в поиске биомаркеров.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает отличную платформу *ex-vivo* для диагностических анализов, в частности, для диагноза заболевания, связанного с протеолитическим каскадом, в частности, РАС. Такое заболевание, связанное с РАС, включает, например, гипертензию; заболевания сердца, в частности застойную сердечную недостаточность, хроническую сердечную недостаточность, острую сердечную недостаточность, артериосклероз, инфаркт миокарда; заболевания почек, в частности почечную недостаточность, диабетическую нефропатию; заболевания легких, в частности острое повреждение легких и/или острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС); заболевания печени, в частности фиброз; воспалительные заболевания, в частности сепсис, артрит, ревматизм и/или рак. Настоящее изобретение также пригодно для рутинного анализа у большого числа пациентов, например, для идентификации веществ, влияющих на РАС; оценки эффектов веществ, влияющих на РАС; и/или мониторинга пациентов, принимающих медикаменты, влияющие на РАС. Таким медикаменты, влияющие на РАС, могут включать один или несколько активных ингредиентов, например, таких как ингибиторы аминокатализ, в частности амастатин; ингибиторы АПФ, в частности каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, периндоприл, хинаприл, рамиприл, трандолаприл, беназеприл; антагонисты рецептора ангиотензина II, в частности кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лосартан, ольмесартан, тельмисартан, валсартан; антагонисты рецептора альдостерона, в частности эплеренон, спиронолактон; и/или АПФ2, в частности, рекомбинантный растворимый АПФ2 человека, и ингибиторы ренина, в частности алискирен.

Для образцов крови особенно важно для достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного пептида, вовлеченного в протеолитический каскад, чтобы протеазы из протеолитического каскада, наблюдаемого в настоящем способе, не ингибировались путем добавления ингибиторов протеаз в образец, по меньшей мере не до степени, не позволяющей по меньшей мере одному ферменту, вовлеченному в деградацию по меньшей мере одного пептида, работать до достижения равновесного состояния для указанного по меньшей мере одного пептида, т.е. по меньшей мере один фермент для деградации указанного пептида(ов) должен быть активным до степени, обеспечивающей равновесное состояние для указанного пептида(ов). Таким образом, в одном варианте осуществления ингибиторы протеаз не добавляются в образец до такой степени, чтобы активность протеаз, вовлеченных в формирование и деградацию по меньшей мере одного анализируемого пептида, была значительно подавлена, до и/или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние. В соответствии с указанным вариантом осуще-

ствления образцы не комбинируют с такими ингибиторами протеаз, или если такие ингибиторы уже добавлены, такие ингибиторы подавляют (в их функции ингибирования протеаз) или удаляют до и/или во время инкубации, пока не будет достигнуто равновесное состояние. Конечно, ингибиторы, которые не влияют на протеазы соответствующего протеолитического каскада, который изучается способом в соответствии с настоящим изобретением, но которые ингибируют другие виды протеолитической активности (например, ингибиторы коагуляции крови, если изучают РАС), могут быть добавлены в образец, поскольку это не влияет на способность соответствующего протеолитического каскада (т.е. анализируемого каскада, например, РАС) достигать равновесного состояния по меньшей мере для одного пептида из каскада.

Протеолитические каскады присутствуют в большом количестве физиологических процессов от простого расщепления белков (например, пищевого белка, или белков, выводимых из клеток организма или жидкостей организма) до высоко регулируемых каскадов, таких как РАС или система коагуляции крови. Протеазы могут либо разрушать специфические пептидные связи (ограниченный протеолиз), в зависимости от аминокислотной последовательности белка, полностью разрушать пептид до аминокислот (неограниченный протеолиз). Специфическое расщепление пептидных связей является центральным регуляцией сложных биологических процессов. В частности, пептидные гормоны часто продуцируются в виде неактивных пептидных предшественников, которые присутствуют в кровообращении в избыточных количествах. Для высвобождения активных гормонов необходимы селективные протеазы, которые в свою очередь деградируются другими протеазами.

В одном варианте осуществления тип образца, который можно анализировать в соответствии с настоящим изобретением, является образцом крови. "Образец крови" в соответствии с настоящим изобретением может быть любым образцом, содержащим кровь, или одну или несколько её фракций (содержащих протеазы из соответствующего протеолитического каскада). В частности, все образцы крови, которые рутинно получают от доноров-людей, можно применять в соответствии с настоящим изобретением, например цельную кровь, плазму или сыворотку, особенно свежую или замороженную цельную кровь с добавлением антикоагулянтов, или свежую или замороженную плазму с добавлением антикоагулянтов. Кровь или плазма "с добавлением антикоагулянтов" содержат антикоагулянты, т.е. вещества, предотвращающие коагуляцию (останавливающие свертывание крови), конечно, без влияния на протеазы анализируемого протеолитического каскада в их способности достигать равновесного состояния. Подходящим антикоагулянтом является гепарин; таким образом, гепаринизированные образцы крови являются подходящим исходным материалом для способа в соответствии с настоящим изобретением. Гепаринизированные образцы крови могут быть дополнительно обработаны перед применением способа в соответствии с настоящим изобретением. Например, гепаринизированная плазма или сыворотка может быть получена из образца крови. Альтернативно, способ в соответствии с настоящим изобретением можно также выполнять с цельной кровью, т.е. при наличии всех клеток крови (а также протеаз на таких клетках или в таких клетках). Чаще ингибиторы протеаз, действующие как антикоагулянты, такие как цитрат или ЭДТА, являются менее пригодными; или альтернативно (если образец уже содержит антикоагулянты) могут требовать добавления нейтрализующих веществ для таких ингибиторов протеаз для обеспечения инкубации образца по достижению равновесного состояния.

Со способом в соответствии с настоящим изобретением, может быть идентифицирован не только один специфический пептид или продукт деградации пептидов в качестве маркера статуса протеолитического каскада. Можно анализировать более одного из пептидных членов каскада, таким образом, обеспечивая еще более усовершенствованный анализ физиологического или биохимического статуса этого каскада у субъекта. В ходе настоящего изобретения было установлено, что относительные количества различных пептидных членов протеолитического каскада в равновесном состоянии являются хорошим индикатором физиологического или биохимического статуса этого каскада у субъекта. Например, отношение молярных количеств или концентраций двух или более продуктов протеолитической деградации в равновесном состоянии может быть показателем ферментативной активности, связанного физиологического состояния, или патологии. Примером, обеспеченным настоящим изобретением, является молярное отношение Анг 1-8 к Анг 1-10 (или отношения других продуктов деградации Анг 1-10) в равновесном состоянии, что является показателем статуса РАС у субъекта и/или влияния на РАС режима лечения, используемого у субъекта (например, лечения такими веществами, как лизиноприл, амастатин, АПФ, АПФ2, НЭП, и т.д.).

Таким образом, один вариант осуществления настоящего изобретения включает количественное определение по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, предпочтительно по меньшей мере четырех продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в образце и концентрации равновесного состояния. Со способами из настоящего изобретения можно провести количественное определение как можно большего числа продуктов деградации в протеолитическом каскаде в равновесном состоянии (или сколько известно) до получения "фингерпринт-подобной" оценки статуса протеолитического каскада.

В соответствии с настоящим изобретением необходимо провести количественное определение одного или нескольких продуктов деградации в равновесном состоянии. Это существенно отличается от анализов предшествующего уровня техники, которые обычно применяют количественное определение

исследуемых веществ при состоянии протеолитического каскада, немедленно стабилизированном после взятия образцов (т.е. образцов крови) у субъекта, т.е. не в равновесном состоянии. Обычно такие образцы из предшествующего уровня техники обрабатывают ингибиторами протеаз немедленно после взятия образцов, для подавления нежелательных фермент-зависимых изменений в каскаде. Однако настоящее изобретение использует такие фермент-зависимые изменения в анализе физиологического или биохимического статуса субъекта, касающиеся протеолитического каскада, специально позволяя протеазам указанного исследуемого каскада осуществлять их протеолитическую активность, пока не будет достигнуто равновесное состояние. Это обычно приводит к изменению количества и состава продуктов деградации пептидов в исследуемом протеолитическом каскаде, по сравнению с образцом, немедленно стабилизированным после взятия образца у субъекта. В соответствии с изобретением специфическая протеолитическая активность образца приводит к равновесному состоянию, которое является гораздо лучшим показателем биохимического статуса субъекта, у которого исследуют этот каскад, чем в немедленно стабилизированном образце (без этапа инкубации до достижения равновесного состояния в соответствии с настоящим изобретением).

Как уже было указано выше, равновесное состояние в соответствии с настоящим изобретением является не отдельной, точно количественно определяемой и выделенной точкой, а статусом, где изменения в относительных показателях в образце существенно уменьшены. Обычно такое равновесное состояние можно достичь путем применения обычных условий инкубации для данных образцов и исследуемого каскада. Как указано выше, образец может быть инкубирован в течение 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. Для РАС и/или системы брадикинина образцы могут быть инкубированы в течение по меньшей мере от 30 до 300 мин или в течение по меньшей мере от 30 до 180 мин, или в течение по меньшей мере от 30 до 120 мин, или в течение по меньшей мере от 30 до 90 мин, или в течение по меньшей мере от 30 до 60 мин. Подходящие температуры инкубации являются такими как те, которые присутствуют в физиологической системе, или такими, где протеазы из исследуемого протеолитического каскада имеют оптимальную температуру действия, например при температуре от 30 до 50°C, от 35 до 40°C, или предпочтительно около 37°C (в частности, для образцов крови человека).

Как уже было указано, настоящее изобретение дополнительно иллюстрировано примерами в разделе "Примеры", в частности, для ренин-ангиотензиновой системы (РАС) и брадикининовой системы. Один или несколько анализируемых продуктов деградации могут быть выбраны из ангиотензиновых пептидов, таких как ангиотензин I (Анг 1-10), ангиотензин 2-10 (Анг 2-10), ангиотензин II (ангиотензин 1-8 или Анг 1-8), ангиотензин III (ангиотензин 2-8 или Анг 2-8), ангиотензин IV (ангиотензин 3-8 или Анг 3-8), ангиотензин 1-9 (Анг 1-9), ангиотензин 1-7 (Анг 1-7), ангиотензин 2-7 (Анг 2-7), ангиотензин 3-7 (Анг 3-7) и ангиотензин 1-5 (Анг 1-5); и/или из кининовых пептидов, таких как каллидин (КД или Лиз-брадикинин) и продуктов его биологической деградации, таких как брадикинин 1-9 (БК 1-9), брадикинин 2-9 (БК 2-9), брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5).

В одном варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5). В другом варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5). В еще одном варианте осуществления продукт деградации пептидов выбран из брадикинина 1-9 (БК 1-9), брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5).

Поскольку способ в соответствии с настоящим изобретением использует протеолитические активности, содержащиеся в образце, один или несколько образцов, в частности образцов крови, должны не содержать добавленных ингибиторов протеаз для протеолитического каскада, пока не будет достигнуто равновесное состояние.

Такие ингибиторы протеаз могут быть добавлены после инкубации до достижения и стабилизации равновесного состояния. Это сохраняет концентрации пептидов, отражающих равновесное состояние, присутствующих во время этапа количественного подсчета (хотя равновесное состояние обычно стабильно в течение определенного периода времени, это обеспечивает дополнительную гарантию качества для способа в соответствии с настоящим изобретением).

Со способами в соответствии с настоящим изобретением можно контролировать статус РАС и/или системы брадикинина. В одном варианте осуществления проводят количественное определение по меньшей мере двух продуктов деградации пептидов, и рассчитывают отношение параметров равновесного состояния по меньшей мере двух продуктов деградации пептидов. Соответственно один вариант осуществления настоящего изобретения применяет количественный анализ по меньшей мере двух из ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина 2-10 (Анг 2-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина III (ангиотензина 2-8 или Анг 2-8), ангиотензина IV (ангиотензина 3-8 или Анг 3-8), ангиотензина 1-9 (Анг 1-9), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), ангиотензина 2-7 (Анг 2-7), ангиотензина 3-7 (Анг 3-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5); каллидина (КД или Лиз-брадикинина) и продуктов его биологической деградации, таких как брадикинин 1-9 (БК 1-9), брадикинин 2-9 (БК 2-9), брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5). Затем можно рассчитать отношение или продукт этих по меньшей мере двух продуктов деградации пептидов для обеспечения особо показательного параметра

для состояния протеолитического каскада, например РАС, в образце. Например, отношение концентраций равновесного состояния между Анг 1-8 и Анг 1-10 является показателем физиологического или биохимического статуса, функции и/или активности АПФ. Соответственно, отношение между продуктом деградации пептидов и его пептидом-предшественником (т.е. субстратом фермента, образующего указанный продукт деградации пептидов) в равновесном состоянии, является показателем физиологического или биохимического статуса, функции и/или активности фермента, расщепляющего указанный субстрат на указанный продукт деградации пептидов. В одном варианте осуществления рассчитывают более одного отношения между продуктом деградации пептидов и его пептидом-предшественником. Указанные по меньшей мере два отношения могут быть вновь связаны друг с другом, например, путем расчета отношения или продукта из по меньшей мере двух отношений, или путем сложения или вычитания отношений, или того и другого (расчет отношения(ий) между суммами и/или разностями). В другом варианте осуществления рассчитывают отношение по меньшей мере между одним уровнем пептида *in vivo* (немедленно стабилизированным) и уровнем того же самого пептида в равновесном состоянии.

Способ в соответствии с настоящим изобретением зависит от точного и аккуратного количественного анализа продуктов деградации пептидов. Поскольку многие образцы, особенно образцы крови, содержат белки, соли, кислоты, основания, липиды, фосфолипиды или другие компоненты, которые могут нарушать количественный анализ пептидов, могут применяться способы предварительной обработки образцов перед количественным анализом.

Способ в соответствии с настоящим изобретением может быть проведен с применением набора.

Соответственно в другом аспекте настоящее изобретение относится к набору для измерения продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в биологическом образце при концентрации в равновесном состоянии. Набор может содержать инструкцию по инкубации образца в течение определенного периода времени, пока не будет достигнуто равновесное состояние по меньшей мере для одного продукта деградации из протеолитического каскада. Набор может дополнительно содержать одну или несколько инструкций для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением, как описано выше.

Соответственно в одном варианте осуществления набор для измерения продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в биологическом образце в концентрации равновесного состояния (т.е. набор для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением) включает инструкцию по инкубации одного или нескольких образцов в течение определенного периода времени до достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов из каталитического каскада. Факультативно, набор дополнительно содержит один или несколько химических, биохимических и/или биотехнологических реагентов, выбранных из пептидов, ферментов, ингибиторов ферментов, буферных веществ, растворителей, хаотропных агентов, детергентов, и их комбинаций. Факультативно, набор дополнительно содержит одно или более химических, биохимических и/или биотехнологических средств, таких как материалы для твердофазной экстракции или другие материалы для очистки, контейнеры или их комбинации. Факультативно, набор дополнительно содержит один или несколько биологических образцов, выбранных из образцов крови, образцов сыворотки, образцов плазмы, образцов ткани, и их комбинаций. Например, указанные биологические образцы могут быть образцами крови, сыворотки, плазмы и/или ткани и могут применяться, например, в качестве стандарта и/или контроля качества. Указанные контейнеры могут быть пробирками или флаконами для сбора образца, или любым другим стандартным контейнером, пригодным, чтобы вмещать химический, клинический, биохимический или биотехнологический материал. В одном варианте осуществления контейнер является контейнером для крови или ткани. Указанный контейнер факультативно содержит один или несколько антикоагулянтов, таких как гепарин, ЭДТА, и/или другие антикоагулянты. Указанный контейнер может дополнительно содержать один или несколько ингибиторов ферментов или коктейль ингибиторов протеаз, такой, как подробно описано выше или в разделе "Примеры".

В одном варианте осуществления набор дополнительно содержит один или несколько ингибиторов протеаз или коктейль из ингибиторов, один или несколько подающих субстратов, одну или несколько пробирок для сбора крови, факультативно покрытых гепарином, один или несколько стандартов, один или несколько образцов для контроля качества, один или несколько материалов для твердофазной экстракции, и/или один или несколько растворителей, или их комбинации.

Компоненты набора и инструкции, содержащиеся в наборе, дополнительно определены выше в связи со способами из настоящего изобретения. Инструкция по инкубации образцов в течение определенного периода времени, пока не будет достигнуто равновесное состояние по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов из каталитического каскада, может, например, включать информацию о способах, реагентах и/или условиях, как указано выше, в связи со способами из настоящего изобретения, например, информацию о продолжительности и условиях инкубации, стабилизации образца, и/или анализе. Соответственно инструкция может включать дополнительные инструкции, например, о том, что не нужно добавлять ингибиторы протеаз до и/или во время инкубации до достижения равновесного состояния, и/или об инактивации или удалении какого-либо ингибитора протеаз, который можно добавить. Специфические приложения, такие как измерение активности отдельных протеаз на основе анализов

равновесного состояния пептидов или влияния некоторых ингибиторов протеаз (или соответствующих фармацевтических композиций) на протеолитический каскад и уровни пептидов в равновесном состоянии могут требовать добавления определенных ингибиторов протеаз перед инкубацией для достижения равновесного состояния. Таким образом, инструкции могут включать указания по добавлению определенных ингибиторов протеаз. Однако, как указано выше, по меньшей мере одна реакция протеолитической деградации должна быть активной по меньшей мере для одного пептида из протеолитического каскада до степени, обеспечивающей действительную общую скорость деградации, равную действительной общей скорости формирования указанного пептида.

Такие инструкции могут быть обеспечены, например, в бумажном формате (например, в виде брошюры или руководства), или в электронном виде. Такая инструкция может напрямую или опосредованно сопровождать набор, например обеспечиваться производителем и/или поставщиком набора, и содержаться в упаковке набора, или обеспечиваться иным образом вместе с набором (например, по электронной почте от производителя и/или поставщика набора, или путем скачивания с веб-страницы производителя и/или поставщика набора).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению набора для определения продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада в биологическом образце в концентрации равновесного состояния. Такое применение набора подробно описано выше по отношению к способам в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления применение набора включает этап инкубации образца до достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов, вовлеченного в указанный протеолитический каскад. В другом варианте осуществления применение набора включает этап количественного определения указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в концентрации равновесного состояния в образце.

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к физическому или электронному представлению результатов количественного определения способа в соответствии с настоящим изобретением, или применения набора в соответствии с настоящим изобретением, где по меньшей мере два продукта деградации пептидов подвергаются количественному анализу на физическом или электронном носителе, и где расчетные количества по меньшей мере двух продуктов деградации обеспечиваются в последовательности из протеолитического каскада. В других вариантах осуществления по меньшей мере три или по меньшей мере четыре продукта деградации пептидов подвергаются количественному анализу на физическом или электронном носителе, а расчетные количества по меньшей мере трех или четырех продуктов деградации обеспечиваются в последовательности из протеолитического каскада.

В одном варианте осуществления физического или электронного представления в соответствии с настоящим изобретением, результаты количественного определения по меньшей мере двух или по меньшей мере трех из ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина 2-10 (Анг 2-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина III (ангиотензина 2-8 или Анг 2-8), ангиотензина IV (ангиотензина 3-8 или Анг 3-8), ангиотензина 1-9 (Анг 1-9), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), ангиотензина 2-7 (Анг 2-7), ангиотензина 3-7 (Анг 3-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5), каллидина (КД или Лиз-брадикинина) и продуктов его биологической деградации, таких как брадикинин 1-9 (БК 1-9), брадикинин 2-9 (БК 2-9), брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5), включают и обеспечивают, в зависимости от их относительных количеств.

Соответственно, это физическое или электронное представление может быть обеспечено в форме, где результаты количественного анализа ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина 2-10 (Анг 2-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина III (ангиотензина 2-8 или Анг 2-8), ангиотензина IV (ангиотензина 3-8 или Анг 3-8), ангиотензина 1-9 (Анг 1-9), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), ангиотензина 2-7 (Анг 2-7), ангиотензина 3-7 (Анг 3-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5), включаются и обеспечиваются, в зависимости от их относительных количеств. В соответствии с другим вариантом осуществления, это физическое или электронное представление может быть обеспечено в форме, в которой результаты количественного определения каллидина (КД или Лиз-брадикинина) и продуктов его биологической деградации, таких как брадикинин 1-9 (БК 1-9), брадикинин 2-9 (БК 2-9), брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5), включаются и обеспечиваются, в зависимости от их относительных количеств.

В одном варианте осуществления это физическое или электронное представление может быть обеспечено в форме, в которой результаты количественного анализа ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5), включаются и обеспечиваются, в зависимости от их относительных количеств.

В другом варианте осуществления физическое или электронное представление может быть обеспечено в форме, в которой результаты количественного анализа ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензина 1-5 (Анг 1-5), включаются и обеспечиваются, в зависимости от их относительных количеств.

В еще одном варианте осуществления это физическое или электронное представление может быть обеспечено в форме, в которой результаты количественного анализа брадикинина 1-9 (БК 1-9), брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5), включаются и обеспечиваются,

в зависимости от их относительных количеств.

В еще одном варианте осуществления это физическое или электронное представление может быть обеспечено в форме, в которой результаты количественного анализа брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5), включаются и обеспечиваются, в зависимости от их относительных количеств.

Это физическое или электронное представление продуктов деградации пептидов в соответствии с настоящим изобретением является ценным диагностическим инструментом для любого врача, обеспечивая существенную помощь в диагностике расстройства или заболевания (например, расстройства или заболевания, связанного с РАС). Оно обеспечивает сравнение между здоровым и патологическим статусом (или сравнение различных стадий заболевания, или различных этапов лечения) "фингерпринт-подобным" образом, т.е. путем многопараметрического представления полученных результатов количественного анализа (как показано на графических представлениях на фигурах в соответствии с настоящим изобретением ("РАС-фингерпринты"). Эти результаты могут быть обеспечены в электронном виде. В электронном формате сравнение и разработку этих форм на протяжении времени либо у одного и того же пациента, либо в популяции пациентов или в группе пациентов, можно легко анализировать и контролировать. На графических представлениях можно изобразить протеолитический каскад так, чтобы результаты представленного способа были не только результатами количественного анализа, но также комплексными и взаимозависимыми "фингерпринт-подобными" результатами, имеющими большое значение в диагностике заболевания и/или лечении, демонстрирующими биохимические связи, лежащие в основе концентраций пептидов. Таким образом, этот инструмент, в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивает усовершенствованное применение результатов, полученных со способом в соответствии с настоящим изобретением.

Изобретение далее описано следующими примерами и фигурами, конечно, не ограничивающими его.

Фиг. 1 демонстрирует равновесное состояние РАС (РСР).

(А) Гепаринизированную кровь собирали от здорового донора и инкубировали при 37°C.

После указанных периодов времени добавляли коктейль ингибиторов протеаз к аликвоте образца гепаринизированной крови для консервации равновесного состояния. Показаны концентрации ангиотензина 1-10 (синим цветом) и ангиотензина 1-8 (зеленым цветом), и сравниваются с аликвотой образца крови, собранного от того же самого донора, которую стабилизировали немедленно во время сбора (ICE, t=0). (В) Концентрации равновесного состояния для ангиотензина в гепаринизированной крови определяли при отсутствии (красным цветом; контроль) и в присутствии указанных ингибиторов РАС (синим цветом). Равновесное состояние замораживали путем добавления коктейля ингибиторов протеаз в образцы немедленно (0 ч) или спустя 2 или 4 ч инкубации при 37°C. (С) концентрации ангиотензина в гепаринизированной крови определяли при отсутствии (красным цветом; контроль) и в присутствии ЭДТА и АЭБСФ (синим цветом). Инкубации замораживали путем добавления коктейля ингибиторов протеаз к образцам немедленно (0 ч) или спустя 2 ч или 4 ч инкубации при 37°C. Показаны концентрации ангиотензина 1-10 и ангиотензина 1-8.

На фиг. 2 показана фармакологическая манипуляция равновесным состоянием РАС. Указанные агенты добавляли перед периодом инкубации 2 ч после РСР-фингерпринтинга на основе ЖХ-МС/МС. Результаты показаны на иллюстрациях фингерпринтинга, отображающих концентрации ангиотензинового пептида в виде сфер различного размера, и метаболизирующих ферментов, представленных синими стрелками и буквами. Подписи под сферами показывают наименование пептида и концентрацию пептида в пг/мл крови. РСР-фингерпринты показаны для низкомолекулярных ингибиторов РАС (А), экзогенно добавленных ферментов (В), и их комбинаций (С).

На фиг. 3 показана зависимость РСР-фингерпринтинга от матрикса. Гепаринизированную кровь, плазму, и плазму, подвергнутую одному циклу замораживания/оттаивания, получали от одного и того же донора, и подвергали РСР-фингерпринтингу, выполняя 2-часовую инкубацию при 37°C с последующей консервацией равновесного состояния добавлением коктейля ингибиторов протеаз к образцам и ЖХ-МС/МС анализом. Графики фингерпринтинга для контрольных образцов без фармакологической манипуляции (А) приведены и сравниваются с образцами, где амастатин (В) или АПФ2 в комбинации с лизиноприлом (С) добавляли перед периодом инкубации.

На фиг. 4 показаны РАС и РСР-фингерпринтинг у здоровых добровольцев. Образцы крови собирали у здоровых добровольцев в присутствии коктейля ингибиторов протеаз, для консервации уровней ангиотензиновых пептидов, присутствующих *in vivo*, т.е. перед каким-либо уравниванием (РАС-фингерпринт, или *in vivo* РАС-фингерпринт), и сравнивали с гепаринизированной кровью и плазмой, подвергнутой инкубации до достижения равновесного состояния (РСР-фингерпринт или *ex vivo* фингерпринт) параллельно. Показаны средний РАС-фингерпринт (консервированные уровни пептидов *in vivo*) и средние РСР-фингерпринты (консервированные уровни пептидов *ex vivo* при генерируемом равновесном состоянии) для гепаринизированной крови и плазмы от 12 здоровых добровольцев (А). Рассчитывали молярное отношение РС для АПФ [фмоль/мл Анг 1-8]/[фмоль/мл Анг 1-10] и представляли вместе с соответствующими концентрациями ангиотензина 1-10 и ангиотензина 1-8 в пг/мл и фмоль/мл для каж-

дого субъекта-донора (В). В таблицах показаны значения для уровней пептидов, составляющих РАС-фингерпринты (фиг. 4В1; табл. 1), РСР-фингерпринты для крови (фиг. 4В2; табл. 2) и РСР-фингерпринты для плазмы (фиг. 4В3; табл. 3) для всех доноров, а также расчетные средние значения и стандартные ошибки среднего. РАС- и РСР-фингерпринты для 2 из 12 здоровых доноров показаны вместе в соответствующими значениями для молярных отношений РС ниже (С; 4С1: Донор 3, 4С2: Донор 6).

На фиг. 5 показан обзор основных этапов деградации пептидов системы брадикинина; т.е. основные брадикининовые пептиды и соответствующие ферменты, формирующие и/или деградирующие эти пептиды.

На фиг. 6 показаны таблицы с уровнями пептидов, измеренных для РАС (А) и системы брадикинина (В) в тех же самых образцах плазмы, стабилизированных ГТЦ после инкубации в течение указанных периодов времени.

На фиг. 7 показаны соответствующие гистограммы.

Примеры

Материалы:

С18 картриджи: Sep-Pak Vac 3cc (500 мг), Waters

Масс-спектрометр: Q TRAP4000 - Applied Biosystems

ВЭЖХ система: 1100 Series, Agilent

С18 RP-ВЭЖХ колонка: Luna 3u C18(2) 100А, 100×2,00 мм, (Phenomenex, Кат.№ 00D-4251-B0)

Реагенты:

Этанол, абс. (Merck, Кат.№ 100983)

Метанол, (Fluka, Кат. № 14262)

Вода LiChrosolv (Merck, Кат. № 115333)

Ацетонитрил, LiChrosolv (Merck, Кат. № 114291)

Муравьиная кислота, >98%, (Fluka, Кат. № 06440)

Z-Арг, в качестве ингибитора ренина, (Bachem, C-3195)

Пепстатин А (Bachem (N-1125)

p-Гидрокси-ртуть-бензойная кислота, натриевая соль (Fluka, 55540)

1,10-Фенантролина моногидрат (Sigma, P9375)

Лизиноприл (Sigma, L6394)

Каптоприл (Sigma, C4043)

Амаститин · HCl, (Bachem, N-1410)

АПФ, НЭП и АПН получали от R&D Systems.

рчАПФ2 (рекомбинантный растворимый АПФ2 человека) произведен Apeiron Biologics.

ЭДТА (Sigma)

ГТЦ (Sigma, Кат.№ G9277)

Трифторуксусная кислота (ТФУ) (Sigma-Aldrich, Кат.№ 302031)

Внутренние стандарты

Внутренними стандартами, используемыми для определения абсолютного количества пептидов в биологических образцах, были синтетические пептиды, чьи последовательности были идентичными анализируемому пептидам, и были маркированы массовой меткой, обеспечивающей дифференцировку эндогенных пептидов и стандартных пептидов при ЖХ-МС/МС анализе. Идентичные физико-химические свойства этих синтетических пептидов делают их идеальными внутренними стандартами для количественного определения малораспространенных пептидов, демонстрирующими идентичное поведение и выход при обработке образца, по сравнению с их соответствующим анализируемым пептидом. Внутренние стандарты применяли к образцу во время или непосредственно после взятия крови, с учетом всех вариаций, вызванных манипуляциями. Применение пептидных специфических внутренних стандартов рекомендуется, поскольку выход пептидов может отличаться для разных пептидов и отдельных образцов.

Далее характеристики МС/МС-фрагментации для эндогенных и стандартных пептидов являются идентичными, обеспечивая высокую точность и воспроизводимость при определении уровней абсолютных пептидов.

Пример I. Анализ продуктов деградации протеолитического каскада в образцах крови в соответствии с настоящим изобретением (РСР-фингерпринт)

РСР-фингерпринтинг

Образцы крови собирали и предотвращали коагуляцию со стандартизированными пробирками с гепарином (BD). Как показано на фиг. 3, отделение плазмы проводили для соответствующих образцов перед инкубацией до достижения равновесного состояния.

После инкубации образцы крови или плазмы в течение периодов времени, как указано на фиг. 1, или инкубации в течение 2 ч, как указано на фиг. 2, 3 и 4, в водяной бане с температурой 37°C, образцы охлаждали на льду с последующим немедленным добавлением коктейля ингибиторов, консервирующих

равновесное состояние, содержащего пепстатин А, 1,10-фенантролин, ЭДТА, п-гидрокси-ртуть-бензойную кислоту, и Z-Арг, а также внутренних стандартов.

Подготовка образца и анализ посредством ЖХ-МС/МС

После отделения плазмы путем центрифугирования при 3000 об./мин в течение 10 мин при 4°C наносили 0,2-2 мл плазмы на активированный и уравновешенный картридж Sep-Pak C18. Компоненты матрикса образца удаляли путем трехкратного отмывания 1 мл воды. Связанные анализируемые вещества затем отмывали 1 мл метанола. Элюаты упаривали до сухого состояния и восстанавливали в смеси 10% ацетонитрила и 90% воды с добавлением 0,1% муравьиной кислоты, с последующим ЖХ-МС/МС анализом.

Твердофазная экстракция

Для обработки образцов использовали вакуумный коллектор.

1. Активация: Абсолютный этанол
2. Уравновешивание: 2 × 1 мл H₂O
3. Загрузка: 0,2 - 1 мл стабилизированной плазмы
4. Отмывка: 3 × 1 мл H₂O
5. Элюция: 1 мл метанола

Количественный анализ и интеграция сигнала

MRM-хроматограммы интегрировали с применением программного обеспечения Analyst 1.5.1, поставляемого Applied Biosystems. Пороговое значение для предела количественного определения устанавливали на отношении сигнала к шуму 10. Интеграционные сигналы, не достигшие этого значения, устанавливали на ноль. Сигналы анализируемых веществ соотносили с сигналами внутренних стандартов и концентрацию рассчитывали по исходно добавленным количествам внутренних стандартов.

Результаты

Оценка PАС по отношению к концентрациям ангиотензиновых пептидов критически зависит от условий, используемых для сбора и консервации образцов. Была разработана аналитическая система, способная эффективно сохранять *in vivo*, а также *ex vivo* уровни ангиотензиновых пептидов равновесного состояния в крови, с последующим высоко чувствительным анализом ЖХ-МС/МС и абсолютным количественным анализом.

В целом, PАС является системой пептидных гормонов, постоянно продуцирующей новые пептиды из прогормона АГТ, где скорость продукции зависит в первую очередь от активности ренина. Уровни пептидов, присутствующих в кровотоке, зависят от растворимых протеаз; протеаз, связанных с клетками крови, а также протеаз, ассоциированных с эндотелием, которые могут быть пространственно различными из-за орган-специфических видов экспрессии. Внутренняя поверхность кровеносных сосудов покрыта многочисленными различными рецепторами ангиотензина, и таким образом, занимает центральную часть в установлении концентраций ангиотензиновых пептидов в кровотоке. В результате орган-специфической экспрессии ангиотензин-метаболизирующих протеаз, таких как АПФ или АПФ2, становится очевидным, что уровни пептидов в крови могут различаться в разных участках организма. Тем не менее, множество ферментативных компонентов PАС присутствует в крови в свободной растворимой форме или в форме, связанной с клетками крови, которая существенно влияет на уровень циркулирующих пептидов. С учетом всех предыдущих соображений, PАС представляет систему с временно постоянным потоком молекул пептидных гормонов с локальными различиями, касающимися концентраций пептидов в разных тканях и органах.

В настоящем изобретении описан способ, при котором учитывается все связанные с кровью факторы, влияющие на системы пептидных гормонов, такие как PАС, путем инкубации образца крови или плазмы до достижения равновесного состояния для уровней одного или нескольких пептидов, с последующим количественным анализом пептидов. Как показано на фиг. 1А, PАС-фингерпринт, представляющий концентрации циркулирующих ангиотензиновых пептидов *in vivo* в образцах крови, собранных из венозной крови руки, с немедленной стабилизацией образца путем добавления коктейля ингибиторов протеаз, существенно отличается от PАС-фингерпринта *ex vivo* (или PСР-фингерпринта), наблюдаемого, когда кровь инкубировали при 37°C без добавления ингибиторов протеаз. Интересно, что концентрации ангиотензиновых пептидов, достигаемые при этих условиях, достигали уровней, которые, как было установлено, оставались постоянными на протяжении значительного периода времени. Это указывало на состояние равновесия, достигаемое в образце, которое характеризовалось равными скоростями формирования и деградации отдельных пептидов, а именно, равновесного состояния. Уровни пептидов равновесного состояния достигались в пределах 30 мин и оставались стабильными в течение по меньшей мере 6 ч от начала инкубации (фиг. 1А). Период стабильности заканчивался сильным повышением концентрации Анг 1-10 в образце, указывая на изменение активностей ферментов в образце. Наконец, спустя 24 ч инкубации концентрация Анг 1-10 медленно снижалась. Помимо Анг 1-10 и Анг 1-8, не отмечалось значительных количеств ангиотензиновых метаболитов в образцах в во время анализа. Было установлено, что так на называемый PСР-фингерпринт (фингерпринт равновесного состояния PАС) существенно влияют фармакологические агенты, интерферирующие с PАС (фиг. 1В, фиг. 2А). Кроме того, проверяли, может

ли добавление агентов, влияющих на РАС, сдвигать равновесное состояние образца к другим, но устойчивым условиям равновесного состояния. Ингибитор АПФ (каптоприл) и ингибитор аминоксипептидазы (амастатин), или их комбинацию добавляли к крови перед инкубацией в течение 2 или 4 ч при 37°C. При всех видах обработки достигались характеристики равновесного состояния для ингибитора(ов), как показано сравнительными уровнями Анг 1-10 и Анг 1-8 спустя 2 и 4 ч инкубации (фиг. 1В). Ингибиторы АПФ лизиноприл или каптоприл повышали уровни равновесного состояния для Анг 1-10 и понижали для Анг 1-8, по сравнению с контрольными уровнями. Ингибиторы ренина, блокирующие исходный этап продукции ангиотензина, как было установлено, полностью ингибируют РАС. Амастатин, являющийся ингибитором некоторых аминоксипептидаз, как было установлено, значительно повышает уровни Анг 1-8, что указывает на важную роль аминоксипептидаз в регуляции уровней Анг 1-8 *in vivo*.

Фиг. 1С сравнивает концентрации пептидов, достигаемые спустя 2 и 4 ч инкубации при 37°C при отсутствии (красные столбцы) и в присутствии ЭДТА и АЭБСФ (синие столбцы), с последующей консервацией концентраций пептидов путем добавления коктейля ингибиторов в указанные моменты времени. Комбинацию ЭДТА и АЭБСФ применяли в способах из предшествующего уровня техники для измерения активности ренина в плазме (АПП) (Bystrom et al.; Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569). Концентрации ангиотензина 1-10 (верхняя панель) и ангиотензина 1-8 (нижняя панель) в контрольных образцах достигали равновесного состояния, на что указывают минимальные изменения между 2 и 4 ч инкубации при 37°C (по сравнению с фиг. 1В). Напротив, в присутствии ЭДТА и АЭБСФ отмечены существенные изменения уровней Анг 1-10 и Анг 1-8 между 2 и 4 ч инкубации при 37°C. Сильное накопление со временем Анг 1-10 в образце, обработанном ЭДТА/АЭБСФ, ясно демонстрирует отсутствие равновесного состояния в этих образцах.

Далее влияние рекомбинантных ферментов РАС на РСР-фингерпринты оценивали путем добавления 5 мкг/мл АПФ, АПФ2, НЭП или АПН в образцы перед периодами инкубации. РСР-фингерпринты сдвигались, как ожидалось, в этих образцах (фиг. 2В), а также в образцах, в которые добавляли различные фармакологические ингибиторы (фиг. 2С). Следует отметить, что сравнение образцов, обработанных ингибитором АПФ лизиноприлом, с комбинацией АПФ2 и лизиноприла, показало, что Анг 1-10 является субстратом для АПФ2 при физиологических концентрациях в исходном матриксе образца, эффективно продуцируя Анг 1-9 (фиг. 2А1, 2С1). Хотя уровни равновесного состояния для Анг 1-10 после добавления АПФ2 оставались высокими, отмечался значительный пептидный поток в направлении Анг 1-9, что может быть важным механизмом действия ингибиторов АПФ в клиническом применении. Далее, эта АПФ2-опосредованная продукция Анг 1-9 выразительно продемонстрирована в присутствии амастатина, который дополнительно повышает уровни равновесного состояния Анг 1-10 путем ингибирования его N-концевой протеолитической деградации (фиг. 2С3). Было установлено, что ингибирование АПФ является необходимым условием для детекции значительных уровней равновесного состояния Анг 1-9, что указывает на значительно более высокую аффинность Анг 1-10 к АПФ, чем к АПФ2. Эта более высокая аффинность АНГ 1-10 к АПФ, чем к АПФ2, может также быть подтверждена путем наблюдения концентраций равновесного состояния Анг 1-10 при сравнении добавления АПФ и АПФ2 (фиг. 2В1).

Результаты, полученные в этих экспериментах, явно указывают на прямую связь РСР-фингерпринта с интегрированными активностями ферментов РАС, содержащимися в образце.

На основе этих наблюдений был изучен эффект применения свежей или замороженной плазмы вместо крови, как более легкой при использовании в отношении крупномасштабных анализов, поскольку известно, что компоненты РАС, ассоциированные с клетками крови, теряются при этих условиях. РСР-фингерпринты сравнивали для крови, плазмы и замороженной/оттаянной плазмы от одного и того же донора для контрольных образцов (фиг. 3А), образцов с добавлением амастатина (фиг. 3В) и образцов с добавлением АПФ2 и лизиноприла (фиг. 3С). Ингибиторы и комбинации были выбраны для достижения очевидного сдвига равновесного состояния при использовании либо ферментов, либо низкомолекулярных ингибиторов для проверки пригодности способа с точки зрения клинического анализа. Было установлено, что замораживание и оттаивание плазмы вызывает минимальные вариации в РСР-фингерпринте, в то время как применение крови вместо плазмы приводило к существенным различиям, особенно касающимся Анг 1-10, Анг 1-8 и Анг 1-7, что указывало на присутствие ассоциированных с клетками крови НЭП (CD10) и АПФ (CD143).

Наконец, вариабельность РАС-фингерпринта и РСР-фингерпринта исследовали среди 12 здоровых добровольцев и анализировали в немедленно стабилизированной крови, уравновешенной крови и уравновешенной плазме от каждого донора. Среднее значение от измеренных концентраций ангиотензина приведено в виде графика фингерпринтинга на фиг. 4А. Данные по донорам, касающиеся Анг 1-10 и Анг 1-8, в которых указан преобладающий пептид, присутствующий у здоровых добровольцев, приведены для РАС-фингерпринтов (4В1 - табл. 1), РСР-фингерпринта в крови (4В2 - табл. 2), а также РСР-фингерпринта в плазме (4В3 - табл. 3). Помимо концентраций пептидов в пг/мл, концентрации рассчитывали в фмоль/мл и использовали для установок отношения молярной активности равновесного состояния для АПФ путем деления концентрации Анг 1-8 на концентрации Анг 1-10. По сравнению с измеренными РАС-фингерпринтами, РСР-фингерпринты показали значительно большие вариации среди доноров, которые отражали возможные различия в составе растворимых компонентов РАС среди разных доноров.

Два примера доноров показаны на фиг. 4С. Донор 3 (фиг. 4С1) имел молярное РС-отношение для АПФ в крови (1-8/1-10) 4,5; в то время как Донор 6 (фиг. 4С2) имел РС-отношение для АПФ 20,5; что указывало на более выраженную роль АПФ в продукции Анг 1-8 у этого донора. Также имеется различие в РС-отношении для АПФ (0,35 против 0,79), однако разница на основе РСР-финггерпринта была гораздо более выраженной.

В заключение, в настоящем изобретении обеспечивается действенный способ оценки РАС или её компонентов в биологических образцах. Комбинация представленного высокочувствительного способа количественного определения ангиотензиновых пептидов на основе ЖХ-МС/МС с инновационным обеспечением равновесного состояния образца перед стабилизацией представляет высоко воспроизводимое средство оценки активности растворимых и ассоциированных с клетками крови ферментов РАС. Применение этой новой технологии обеспечивает высокий потенциал открытия биомаркеров, поскольку РАС вовлекается в различные патологические состояния. Далее активности растворимых и ассоциированных с клетками крови ферментов РАС представляют основную мишень для фармакологической активности некоторых антигипертензивных лекарств. Понимание индивидуальности систем позволит найти путь для пациент-специфических подходов в лечении заболеваний, связанных с РАС. Технология в соответствии с настоящим изобретением стимулирует эту разработку путем обеспечения глубокого и комплексного понимания действия ренин-ангиотензиновой системы в биологических образцах.

Пример II: Анализ продуктов деградации протеолитического каскада ренин-ангиотензиновой системы, а также брадикининовой системы в образцах крови в соответствии с настоящим изобретением.

Все способы осуществляли, как описано в примере I, за тем исключением, что образцы плазмы стабилизировали путем добавления 4 М ГТЦ/1% ТФУ, немедленно или после инкубации в течение 2 или 3 ч на водяной бане при 37°C.

Результаты

Фиг. 6 и 7 демонстрируют, что способ в соответствии с настоящим изобретением можно применять не только для РАС, но также для других протеолитических каскадов, таких как брадикининовая система. Далее эти фигуры показывают, что равновесное состояние может быть эффективно стабилизировано не только путем добавления коктейля ингибиторов протеаз, но также хаотропного агента, такого как ГТЦ. После периода инкубации в течение 1 часа достигалось равновесное состояние для РАС и брадикининовой системы, и оставалось стабильным, как можно видеть при сравнении уровней пептидов при 1 и 3 ч инкубации.

Перечень последовательностей

<110> APEIRON Biologics AG
 <120> СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ ПЕПТИДОВ ИЗ
 ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО КАСКАДА В ОБРАЗЦАХ КРОВИ
 <130> R 62032
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
 1 5 10

 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
 1 5

 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
 1 5

 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
 1 5

 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Val Tyr Ile His Pro Phe
 1 5

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Asp Arg Val Tyr Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Arg Val Tyr Ile His Pro
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Val Tyr Ile His Pro
 1 5

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Arg Pro Pro Gly Phe
 1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного измерения продуктов деградации пептидов из протеолитического каскада, включающего по меньшей мере две последовательные протеолитические реакции, в образце крови, где образец инкубируют до тех пор, пока действительная общая скорость деградации по меньшей мере одного продукта деградации пептидов не будет равна действительной общей скорости образования указанного продукта деградации пептидов, и будет достигнуто равновесное состояние для указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов, вовлеченного в указанный протеолитический каскад, и где проводят количественное определение в образце указанного по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в концентрации равновесного состояния, и где субстраты для любого(ых) фермента(ов), вовлеченного(ых) в протеолитический каскад, не добавляют до и/или во время инкубации до того, как достигнуто равновесное состояние.

2. Способ по п.1, в котором образец крови является таким, как цельная кровь, плазма или сыворотка, особенно свежая или замороженная, обработанная антикоагулянтами цельная кровь, или свежая или

замороженная, обработанная антикоагулянтами плазма.

3. Способ по п.1 или 2, в котором проводят количественное определение в образце по меньшей мере двух, трех или четырех продуктов деградации пептидов в концентрации равновесного состояния.

4. Способ по п.3, в котором проводят количественное определение продуктов деградации пептидов и рассчитывают отношение результатов количественного определения этих продуктов деградации пептидов в равновесном состоянии.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором образец инкубируют в течение 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или вплоть до 300 мин.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором образец инкубируют при температуре от 30 до 50°C, от 35 до 40°C или около 37°C.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором протеолитический каскад является ренин-ангиотензиновой системой (РАС), брадикининовой системой или ренин-ангиотензиновой системой (РАС) и брадикининовой системой.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором продукт деградации пептидов выбран из ангиотензиногена, ангиотензина I (Анг 1-10), ангиотензина 2-10 (Анг 2-10), ангиотензина II (ангиотензина 1-8 или Анг 1-8), ангиотензина III (ангиотензина 2-8 или Анг 2-8), ангиотензина IV (ангиотензина 3-8 или Анг 3-8), ангиотензина 1-9 (Анг 1-9), ангиотензина 1-7 (Анг 1-7), ангиотензина 2-7 (Анг 2-7), ангиотензина 3-7 (Анг 3-7), ангиотензина 1-5 (Анг 1-5), каллидина (КД или Лиз-брадикинина), брадикинина 1-9 (БК 1-9), брадикинина 2-9 (БК 2-9), брадикинина 1-8 (БК 1-8), брадикинина 1-7 (БК 1-7) и брадикинина 1-5 (БК 1-5).

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором продукты деградации пептидов выбраны из следующего: ангиотензин I (1-10), ангиотензин II (ангиотензин 1-8 или Анг 1-8), ангиотензин 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензин 1-5 (Анг 1-5); или

ангиотензин II (ангиотензин 1-8 или Анг 1-8), ангиотензин 1-7 (Анг 1-7) и ангиотензин 1-5 (Анг 1-5); или

брадикинин 1-9 (БК 1-9), брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5); или

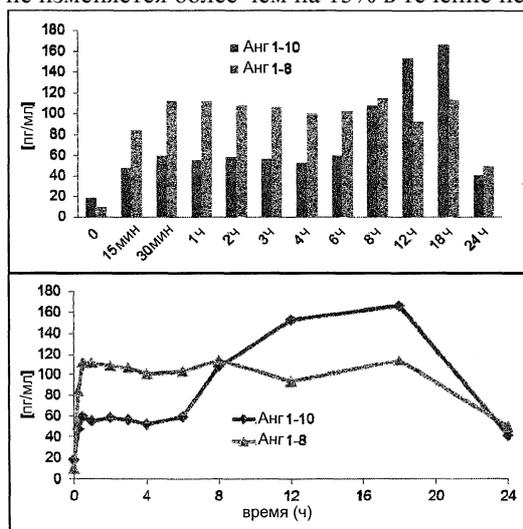
брадикинин 1-8 (БК 1-8), брадикинин 1-7 (БК 1-7) и брадикинин 1-5 (БК 1-5).

10. Способ по любому из пп.1-9, в котором ингибиторы протеаз добавляют после инкубации для достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов.

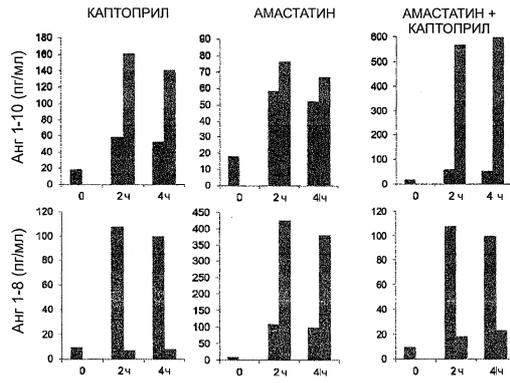
11. Способ по любому из пп.1-10, в котором после инкубации для достижения равновесного состояния по меньшей мере для одного продукта деградации пептидов добавляют один или более хаотропных агентов.

12. Способ по любому из пп.1-10, в котором равновесное состояние сохраняют денатурацией ферментов, индуцированной нагреванием, солью, рН, детергентом или охлаждением.

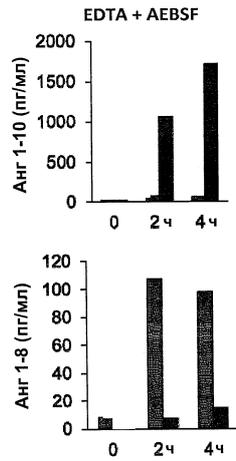
13. Способ по любому из пп.1-12, где уровень по меньшей мере одного продукта деградации пептидов в равновесном состоянии не изменяется более чем на 15% в течение периода в 60 мин.



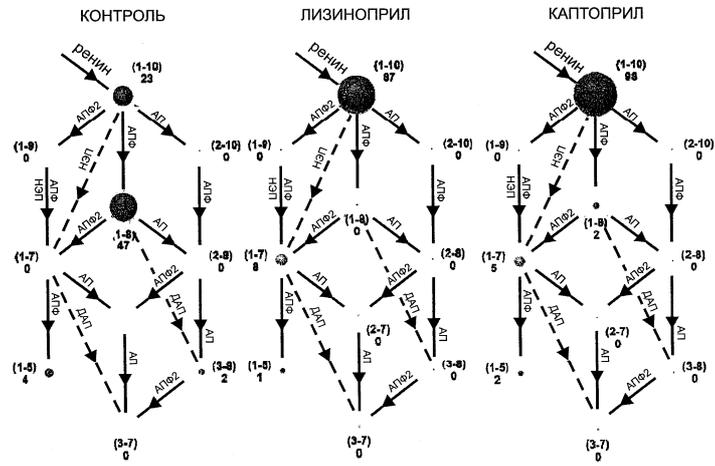
Фиг. 1А



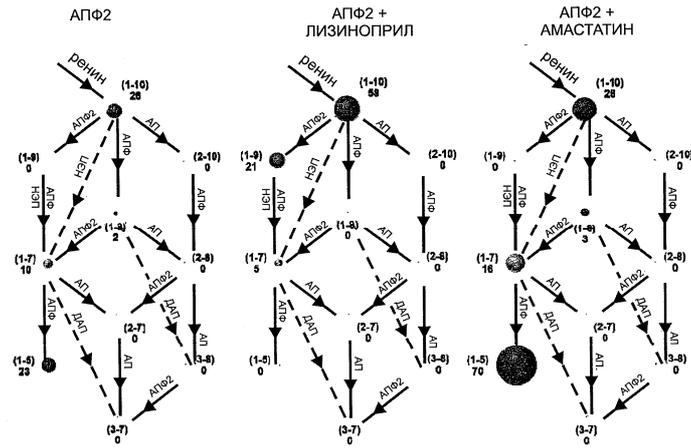
Фиг. 1B



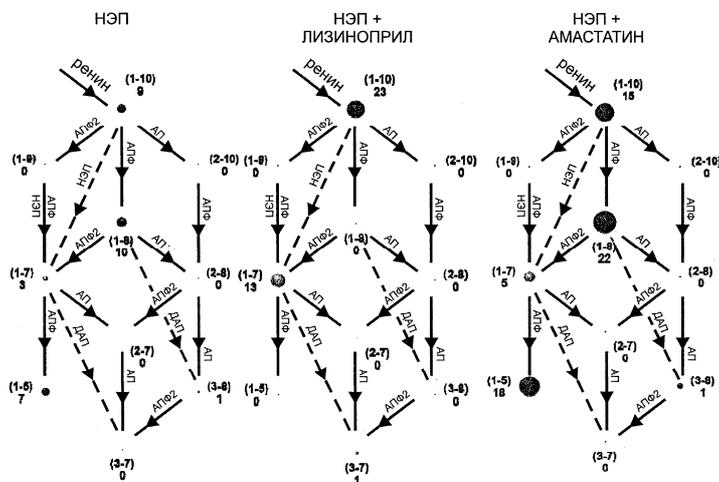
Фиг. 1C



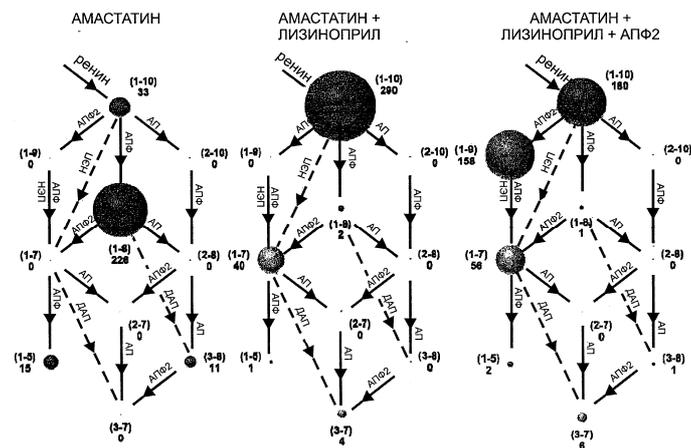
Фиг. 2A1



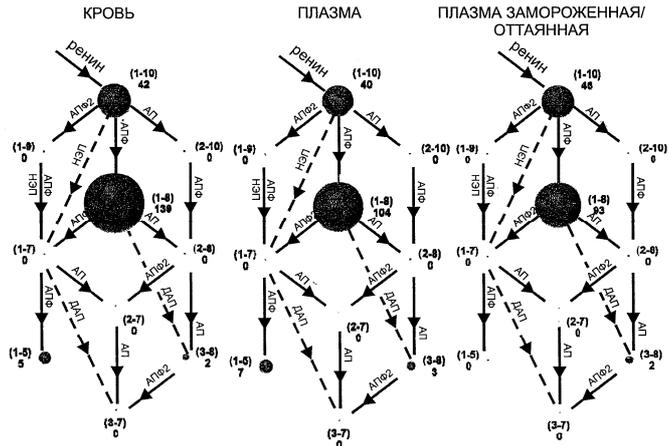
Фиг. 2С1



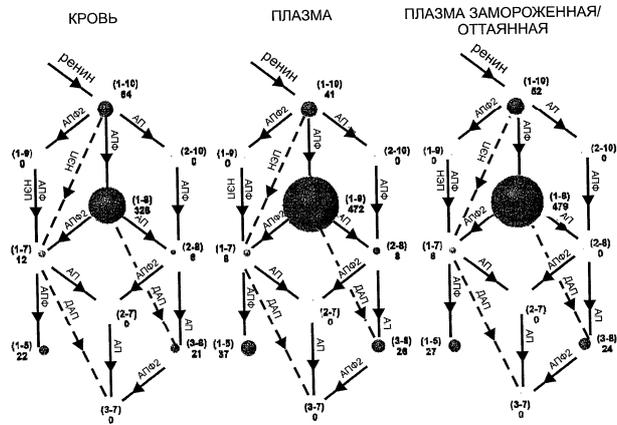
Фиг. 2А2



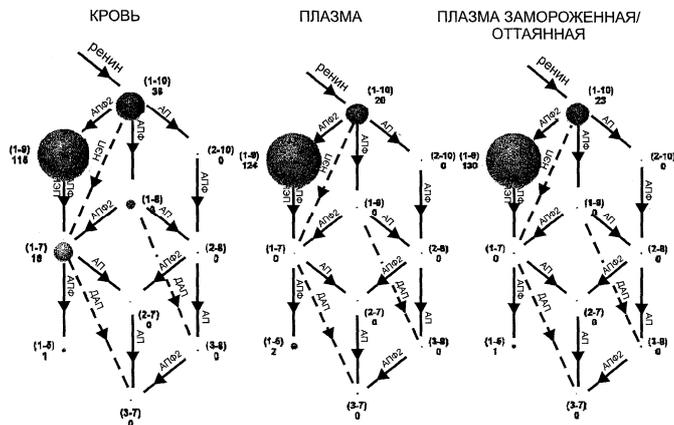
Фиг. 2С3



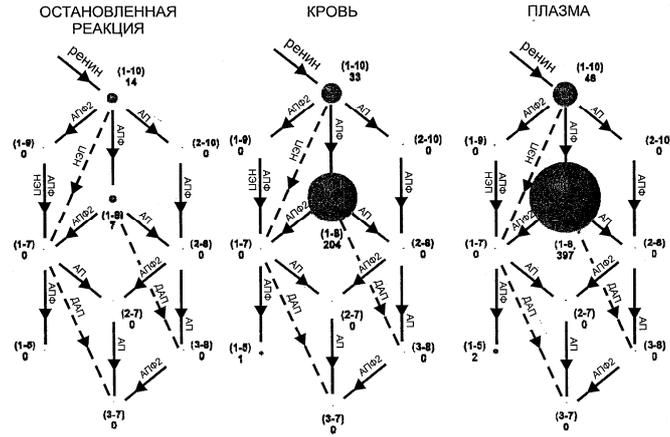
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 4А

	РАС-ФИНГЕРПРИНТ/КРОВЬ				
	Анг 1-8		Анг 1-10		молярное отношение 1-8/1-10 [-]
	[пг/мл]	[фмоль/мл]	[пг/мл]	[фмоль/мл]	
1	8	8	12	9	0,81
2	8	7	17	13	0,57
3	5	5	18	14	0,35
5	3	3	9	7	0,39
4	18	17	27	21	0,79
6	8	7	12	9	0,79
7	3	3	12	10	0,28
8	ниже предела обнаружения				
9	7	7	19	15	0,47
10	12	12	24	18	0,64
11	3	3	ниже предела обнаружения	ниже предела обнаружения	ниже предела обнаружения
15	6	6	22	17	0,33
среднее значение	7	7	17	13	0,54
стандартная ошибка среднего значения	1	1	3	2	0,09

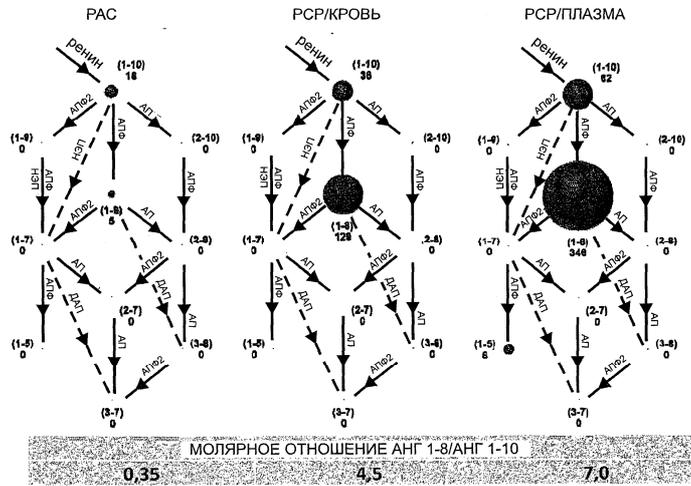
Фиг. 4В1

	РАС-ФИНГЕРПРИНТ/КРОВЬ				
	Анг 1-8		Анг 1-10		молярное отношение 1-8/1-10 [-]
	[пг/мл]	[фмоль/мл]	[пг/мл]	[фмоль/мл]	
1	180	172	22	17	10,2
2	164	156	39	30	5,2
3	129	123	36	27	4,5
5	142	136	34	26	5,2
4	270	258	76	59	4,4
6	242	231	15	11	20,5
7	284	271	30	23	11,9
8	277	265	17	13	20,4
9	206	197	51	39	5,0
10	227	217	33	25	8,6
11	110	105	13	10	10,5
15	225	215	31	24	9,0
среднее значение	204	195	33	25	9,6
стандартная ошибка среднего значения	16	16	5	4	1,6

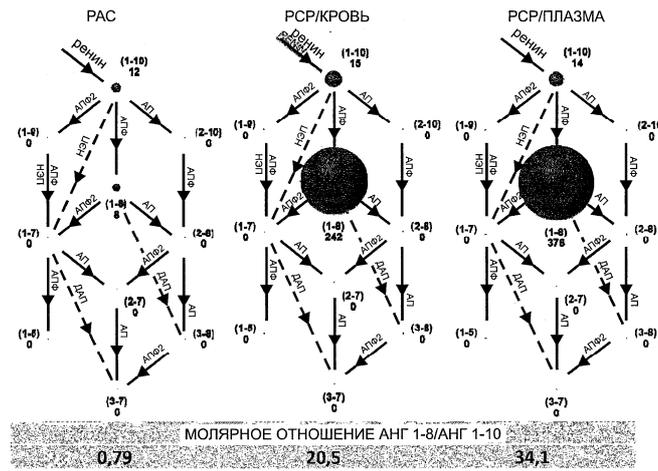
Фиг. 4В2

РАС-ФИНГЕРПРИНТ/КРОВЬ					
	Анг 1-8		Анг 1-10		Молярное отношение 1-8/1-10 [-]
	[пг/мл]	[фмоль/мл]	[пг/мл]	[фмоль/мл]	
1	321	307	34	26	11,9
2	311	297	54	41	7,2
3	346	331	62	47	7,0
5	325	311	53	41	7,6
4	680	650	90	70	9,3
6	376	359	14	11	34,1
7	523	500	48	37	13,4
8	409	391	27	21	19,0
9	416	398	60	47	8,6
10	396	379	62	48	7,9
11	305	292	12	9	31,9
15	361	345	37	28	12,2
Среднее значение	397	380	46	35	14,2
Стандартная ошибка среднего значения	30	28	6	5	2,6

Фиг. 4В3

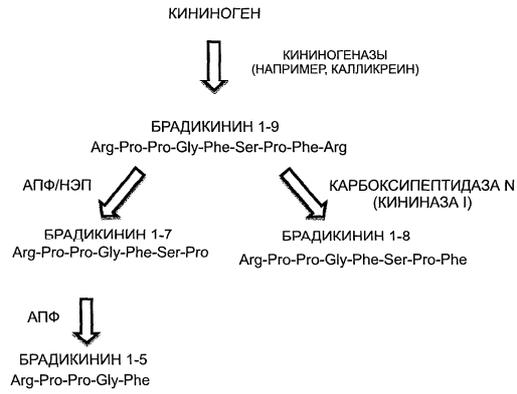


Фиг. 4С1



Фиг. 4С2

СИСТЕМА БРАДИКИНИНА



Фиг. 5

СИСТЕМА БРАДИКИНИНА

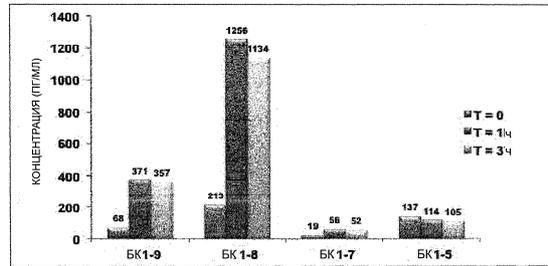
	[пг/мл] БК 1-9	[пг/мл] БК1-8	[пг/мл] БК 1-7	[пг/мл] БК1-5
T = 0ч	68	213	19	137
T = 1ч	371	1256	56	114
T = 3ч	357	1134	52	105

РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВАЯ СИСТЕМА

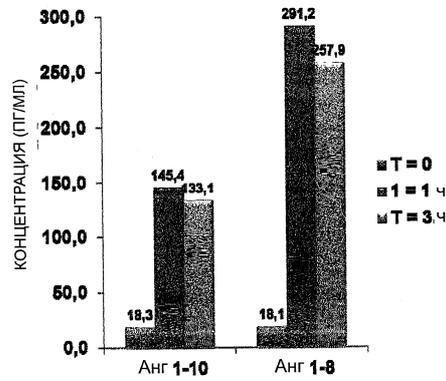
	[пг/мл] Анг1-10	[пг/мл] Анг1-8	[пг/мл] Анг1-7	[пг/мл] Анг1-5	[пг/мл] Анг2-8	[пг/мл] Анг3-8	[пг/мл] Анг2-7	[пг/мл] Анг3-7	[пг/мл] Анг1-9	[пг/мл] Анг 2-10
T = 0ч	18,3	18,1	<	<	<	<	<	<	<	<
T = 1ч	145,4	291,2	7,0	10,0	12,0	8,9	<	2,3	<	9,0
T = 3ч	133,1	257,9	7,8	8,0	13,0	11,5	<	1,7	<	10,1

Фиг. 6

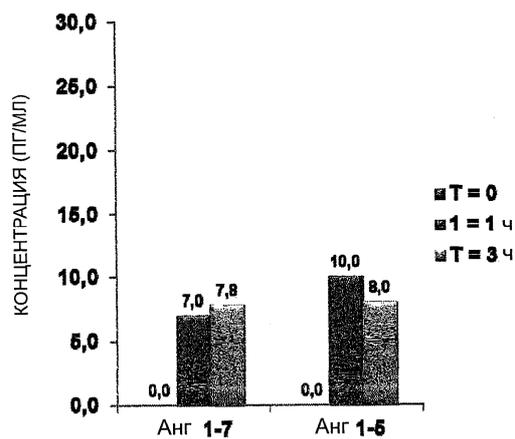
ФИНГЕРПРИНТ РАВНОВЕСНОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ БРАДИКИНИНА



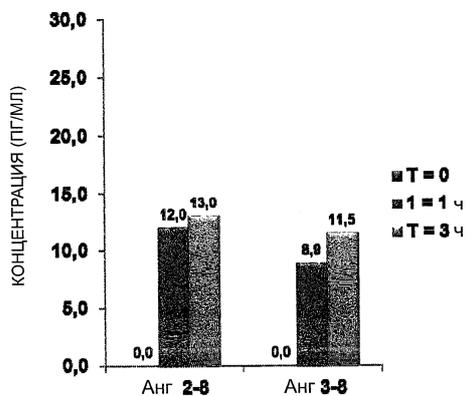
Фиг. 7А



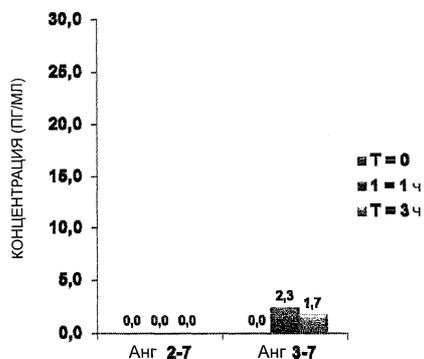
Фиг. 7В1



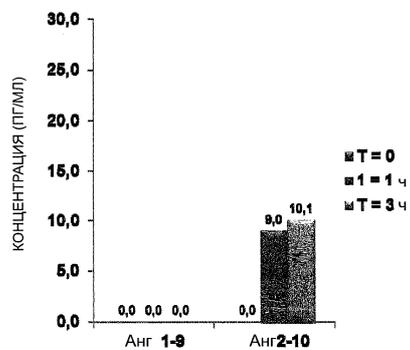
Фиг. 7В2



Фиг. 7В3



Фиг. 7В4



Фиг. 7В5

