



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.25

(21) Номер заявки
201690796

(22) Дата подачи заявки
2014.10.17

(51) Int. Cl. **G01N 33/74** (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ПЕРВИЧНОГО ГИПЕРАЛЬДОСТЕРОНИЗМА

(31) 13189386.9; 14152763.0

(32) 2013.10.18; 2014.01.28

(33) EP

(43) 2016.08.31

(86) PCT/EP2014/072339

(87) WO 2015/055825 2015.04.23

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

(72) Изобретатель:
**Поглич Марко, Швагер Корнелиа,
Фан Ойен Дунья, Ляйтнер Мартин
(АТ)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) KATO M. ET AL.: "Responses of plasma norepinephrine and renin-angiotensin-aldosterone system to dynamic exercise in patients with congestive heart failure", JOURNAL OF CARDIAL FAILURE, CHURCHILL LIVINGSTONE, NAPERVILLE, IL, US, vol. 2, no. 2, 1 June 1996 (1996-06-01), pages

103-110, XP004680556, ISSN: 1071-9164, DOI: 10.1016/S1071-9164(96)80028-5 abstract; table 4

LIM PITT O. ET AL.: "The neurohormonal natural history of essential hypertension: towards primary or tertiary aldosteronism?" JOURNAL OF HYPERTENSION, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, LTD, US/UK, vol. 20, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 11-15, XP009174679, ISSN: 0263-6352 abstract page 13, left-hand column, paragraph 1; figure 2

WISGERHOF M. ET AL.: "Increased adrenal sensitivity to angiotensin II in idiopathic hyperaldosteronism", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 47, no. 5, 1 November 1978 (1978-11-01), pages 938-943, XP009174704, ISSN: 0021-972X abstract; figure 1 page 942, right-hand column, last paragraph

MCKENNA T.J. ET AL.: "Diagnosis under random conditions of all disorders of the renin-angiotensin-aldosterone axis, including primary hyperaldosteronism", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 73, no. 5, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 952-957, XP009174678, ISSN: 0021-972X abstract

(57) Изобретение касается способа для диагностики первичного гиперальдостеронизма (ПГА). Данный способ основан на применении нового диагностического параметра, который заключается в соотношении между равновесным уровнем Ang II в стационарном состоянии и уровнем альдостерона в биологическом образце. Способ по изобретению предусматривает следующую последовательность действий: измерение уровня альдостерона и уровня ангиотензина II (Ang II) в биологическом образце субъекта, причем измеряют уровень ангиотензина II в состоянии равновесия; вычисление соотношения между уровнем альдостерона и уровнем Ang II (отношения альдостерона к Ang II - AA2R). Первичный гиперальдостеронизм диагностируется, если определенное значение AA2R выше по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА. Если значение AA2R ниже по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА, то это указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма. Предлагаемый способ имеет явные преимущества перед используемыми в настоящее время методами диагностики и, в частности, характеризуется повышенной чувствительностью и специфичностью.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается способа диагностики первичного гиперальдостеронизма (ПГА). В частности, настоящее изобретение касается применения нового диагностического параметра, который заключается в соотношении между уровнем ангиотензина II (Ang II или Ang 1-8), в частности равновесным уровнем Ang II в стационарном состоянии и уровнем альдостерона в биологическом образце, таком, например, как плазма. Соотношение двух измеряемых параметров используется для диагностики ПГА у пациентов и имеет явные преимущества перед используемыми в настоящее время диагностическими методами.

Уровень техники

ПГА, т.е. первичный гиперальдостеронизм, характеризуется гиперпродукцией минералокортикоидного гормона альдостерона, которая не является следствием избыточной секреции ренина. Альдостерон вызывает увеличение задержки натрия и воды и выведения калия в почках, что приводит к артериальной гипертензии. Диагностика ПГА у больных с артериальной гипертензией является существенной аналитической проблемой из-за взаимодействия существующих тестов с противогипертопическими средствами и недостаточной диагностической способности применяющихся методов. ПГА имеет много причин, включая гиперплазию коры надпочечников и карциному надпочечников. Когда это происходит из-за одиночной секретирующей альдостерон аденомы надпочечников, которая является разновидностью доброкачественной опухоли и является самой частой причиной ПГА (66% случаев), то это известно как синдром Конна. Другие причины ПГА включают двустороннюю идиопатическую гиперплазию коры надпочечников (30% случаев), первичную (одностороннюю) гиперплазию коры надпочечников (2% случаев), продуцирующую альдостерон аденокортикальную карциному (<1% случаев), семейный гиперальдостеронизм (FH), поправимый глюкокортикоидами альдостеронизм (FH тип I, <1% случаев), FH тип II (<2% случаев) и внепочечную продуцирующую альдостерон аденому или карциному (<0,1% случаев) (Williams Textbook of Endocrinology (11th ed.). Philadelphia: Saunders/Elsevier. 2008. ISBN 978-1-4160-2911-3). Однако вследствие ограниченности диагностических возможностей данные о распространенности субформ ПГА расходятся. Недавние исследования показали, что встречаемость альдостеронизма в связи с двусторонней идиопатической гиперплазией надпочечников (IAG) выше, чем ранее считалось, вплоть до 75% случаев ПГА. После постановки диагноза ПГА обычно лечат путем хирургического вмешательства.

Измерение одного лишь альдостерона считается недостаточным для диагностики первичного гиперальдостеронизма. Известно, что в отличие от измерения уровня одного лишь альдостерона, диагностическая специфичность и чувствительность при выявлении ПГА можно улучшить путем измерения активности или концентрации ренина и альдостерона и объединения этих двух параметров в виде арифметического соотношения, т.е. отношения альдостерона к ренину (ARR), которое в настоящее время применяется для диагностики ПГА (Tiu S., Choi C., Shek C., Ng Y., Chan F., Ng C., Kong A. (2005). "The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling". J. Clin. Endocrinol. Metab. 90(1): 8. doi:10.1210/jc.2004-1149. PMID 15483077). Отношение альдостерона к ренину (ARR) есть масс-концентрация альдостерона, деленная на активность ренина и/или концентрацию ренина в плазме крови. Отношение альдостерона к ренину может выражаться в нг/дл на нг/(мл·ч), т.е. нанограмм альдостерона на децилитр на 1 нанограмм ренина на (миллилитр × час). Также оно может выражаться в пмоль/л на 1 мкг/(л·ч), где альдостерон приводится в молярной концентрации. Первое может быть преобразовано в последнее путем умножения на 27,6. Кроме того, иногда приводится обратная величина, т.е. отношение ренина к альдостерону, которое представляет собой мультипликативную инверсию соотношения альдостерона к ренину. Соотношения между альдостероном и ренином также можно рассчитывать и в других единицах концентрации (единицах массы на мл и/или единицах количества на мл) для любого из этих двух параметров, что дает различные абсолютные значения соотношения, но содержит аналогичную информацию. Концентрация ренина при расчетах ARR также может выражаться в мкг UIE/мл, т.е. в единице, которая часто применяется в клинической диагностике и также отражает концентрацию ренина.

На предел (или порог) отсеечения нормальных лиц от лиц с первичным гиперальдостеронизмом на основании ARR существенно влияют условия испытания, как-то положение тела и время суток. В среднем считается, что предел отсеечения по ARR в 23,6 нг/дл на 1 нг/(мл·ч) или же в альтернативных единицах в 650 пмоль/л на 1 мкг/(л·ч) дает чувствительность в 97% и специфичность в 94% (Tiu et al., см. выше). Значения ARR у лиц, которые выше предела отсеечения, на предшествующем уровне техники считаются признаком первичного гиперальдостеронизма.

При использовании обратного соотношения (т.е. ренина к альдостерону) признаком первичного гиперальдостеронизма считаются значения ниже предела отсеечения.

Однако широкий диапазон значений ARR у пациентов, страдающих ПГА, не позволяет провести четкое и надежное различие между гипертопической болезнью и ПГА, что приводит к ложноположительным и/или ложноотрицательным результатам диагностики и решениям по лечению. Для улучшения диагностической способности ARR при подтверждающей процедуре тестирования после скрининга по ARR необходим прием специальных препаратов и особая диета наряду со сложной методикой испыта-

ний, включающей вливание физраствора.

Эндокринологическим сообществом предлагается проводить скрининг на ПГА в группах подверженных риску пациентов, включая пациентов с гипертензией 2-й степени ($>160/179/100-109$ мм рт.ст.), 3-й степени ($>180/110$ мм рт.ст.) согласно Joint National Commission или устойчивой к лекарствам гипертензией; гипертензией и спонтанной или вызванной диуретиками гипокалиемией; гипертензией со случайно выявленной опухолью надпочечников (incidentaloma); или гипертензией и семейной историей раннего начала гипертензии или инсульта в молодом возрасте (<40 лет). У гипертоников - родственников первой степени больных ПГА также проявляется повышенный риск возникновения ПГА. Стандартный способ диагностики ПГА в соответствии с клиническими рекомендациями вплоть до решения о хирургическом вмешательстве считается трудоемким и представляет некоторый риск для пациентов.

Обоснованием для измерения ARR при диагностике ПГА служат физиологические пути, ответственные за секрецию альдостерона в коре надпочечников. Ренин является ключевым ферментом ренин-ангиотензиновой системы (RAS), вырабатывающим ангиотензин I из ангиотензиногена, который превращается в Ang II под действием других пептидаз. Как известно, Ang II связывается с рецепторами AT1 (AT1R), что приводит к секреции альдостерона, которая и вызывает его физиологические эффекты в почках и других тканях. В здоровом состоянии RAS регулирует уровень альдостерона в плазме крови. В условиях ПГА выработка альдостерона становится частично независимой от RAS, а это значит, что ренин уже больше не нужен для поддержания продукции альдостерона. Измерение ARR является попыткой воспользоваться этой дерегуляцией ренина и альдостерона. У больных ПГА обычно повышается уровень альдостерона в плазме. Поэтому некоторые исследователи считают, что для положительного скрининг-теста на ПГА в дополнение к повышению ARR требуется и повышение уровня альдостерона (обычно альдостерон >15 нг/дл).

Процесс диагностики ПГА начинается с теста на выявление случаев ARR в группах пациентов, приведенных выше (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281). В случае, если это первое измеренное значение ARR превышает определенный порог, то пациент подвергается дальнейшему тестированию с тем, чтобы обеспечить достоверность полученных результатов. Отметим, что точное значение порога ARR все еще обсуждается в литературе из-за частой встречаемости ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Хотя и есть несколько антигипертензивных препаратов, которые вроде как оказывают лишь ограниченное влияние на измеряемую величину ARR, но многие антигипертензивные препараты, как известно, сильно мешают тестированию на ARR. Основной причиной помех представляется сильное воздействие этих препаратов на концентрацию ренина и активность ренина, что ведет к изменению результатов ARR. Вследствие этого, обычно перед подтверждающим тестированием необходима фаза вымывания антигипертензивных препаратов, что представляет значительный риск для пациентов-гипертоников. Само подтверждающее тестирование заключается в отнимающей много времени и дорогостоящей клинической процедуре, которая предназначается для снижения уровня ренина у пациентов в ответ на осмотические или лекарственные воздействия, в сочетании с тестированием на ARR до и после процедуры.

Очень распространенный подтверждающий тест на ПГА представляет собой тест со вливанием физраствора, когда пациенту вводят два литра 0,9% раствора соли на протяжении 4 ч. Увеличение объема должно привести к снижению активности и концентрации ренина. Уровень альдостерона после тестирования ниже 50 пг/мл считается признаком отсутствия ПГА, тогда как уровень альдостерона после тестирования выше 100 пг/мл считается вероятным признаком ПГА. Значения между 50 пг/мл и 100 мкг/мл считаются неопределенными (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281).

Положительный результат подтверждающего теста влечет за собой дальнейшие клинические тесты, включающие методы визуализации надпочечников, такие, например, как компьютерная томография (СТ) и отбор проб из вен надпочечников (AVS), чтобы определить источник избыточной и независимой от ренина продукции альдостерона. После классификации подтипа можно проводить одностороннюю адреналэктомию или лечение антагонистами минералокортикоидных рецепторов.

Ключевым шагом в процессе диагностики является выявление случаев заболевания у пациентов-гипертоников с высоким риском. ARR в качестве теста для выявления случаев может легко давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты, так как было показано, что среди пациентов-гипертоников распределение значений ARR у больных ПГА перекрывается с распределением значений ARR у не болеющих ПГА пациентов (Gary L. Schwartz and Stephen T. Turner, Clinical Chemistry 51, No. 2, 2005), что может легко привести к ненужному и неправильному лечению пациентов. В случае ложноположительных такое неправильное лечение может привести к серьезным осложнениям, так как фаза вымывания препарата в несколько недель у пациентов-гипертоников, несмотря на прием как минимум трех антигипертензивных препаратов, представляет значительный риск летальных сердечно-сосудистых явлений во время этого периода неконтролируемого давления крови. К тому же подтверждающее тестирование обычно требует госпитализации и постоянного контроля со стороны врачей, что отнимает много времени и денег у пациента и системы здравоохранения. В случае ложноотрицательного результата больной ПГА продолжит жить с устойчивой гипертензией, что дает летальный прогноз вследствие силь-

ного повышения риска развития опасных для жизни сердечно-сосудистых явлений типа инсультов или инфарктов.

Настоящим изобретением предусмотрен способ диагностики первичного гиперальдостеронизма у субъекта, который включает получение биологического образца от субъекта, измерение уровня альдостерона и уровня Ang II и вычисление их соотношения (отношения альдостерона к ангиотензину II, AA2R). Данный способ имеет существенные преимущества перед описанными выше существующими методами диагностики на основе ARR.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение касается способа диагностики первичного гиперальдостеронизма у субъекта, который включает

измерение уровня альдостерона и уровня ангиотензина II (Ang II) в биологическом образце субъекта, причем измеряют уровень ангиотензина II в состоянии равновесия,

вычисление соотношения между уровнем альдостерона и уровнем Ang II (отношения альдостерона к Ang II - AA2R).

В данном способе первичный гиперальдостеронизм диагностируется, если определенное значение AA2R выше по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА. Если значение AA2R ниже по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА, то это указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма.

В частном воплощении данного способа соотношение значений между одним или несколькими подтвержденными положительными по ПГА субъектами и одним или несколькими подтвержденными отрицательными по ПГА субъектами (т.е. коэффициент различия) на основе AA2R выше, чем соотношение альдостерона к ренину (ARR) для того же набора данных.

Согласно еще одному частному варианту воплощения специфичность и/или чувствительность способа выше, чем специфичность и/или чувствительность ARR у той же когорты пациентов.

Способ по изобретению подходит для анализа субъектов, которые проходят антигипертензивную терапию. Например, они могут получать лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, повышающими концентрацию и/или активность ренина. Или же субъекты получают лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, снижающими чувствительность и/или специфичность отношения альдостерона к ренину (ARR). Субъект, который может проходить диагностику согласно способу настоящего изобретения, может получать лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, которые не снижают чувствительность и/или специфичность AA2R. Или же данный субъект может получать лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, которые снижают чувствительность и/или специфичность ARR больше, чем чувствительность и/или специфичность AA2R. Еще в одном воплощении субъект получает лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, выбранными из ингибиторов ренина, ингибиторов ACE, ACE2, диуретиков и/или блокаторов кальциевых каналов.

Способ по изобретению может представлять собой диагностику в одну стадию и не требует подтверждающего тестирования.

Биологический образец, который подходит для проведения анализа согласно способу настоящего изобретения, может представлять собой образец крови или полученный из крови образец.

Для анализа уровня альдостерона или уровня ангиотензина в способе изобретения могут использоваться методы масс-спектрометрии. В еще одном варианте осуществления уровень альдостерона и/или уровень ангиотензина измеряется количественными методами на основе антител.

Также изобретением предусмотрено следующее воплощение способа по изобретению, где

AA2R сравнивают с двумя или более значениями AA2R у подтвержденных как не страдающих ПГА субъектов и двумя или более AA2R значениями у субъектов-людей, страдающих ПГА, и

определяют порог на основе значения распределения AA2R в когорте пациентов, включающей субъектов-людей, подтвержденных как не страдающих ПГА, и на основе значения распределения AA2R в когорте пациентов, включающей субъектов-людей, подтвержденных как страдающих ПГА, и

этих субъектов диагностируют как ПГА-позитивные, если значение AA2R является порогом, или в котором субъекты диагностируют как ПГА-негативные, если AA2R значения ниже этого порога.

Специфичность и/или чувствительность способа по изобретению выше, чем специфичность и/или чувствительность ARR в той же когорте пациентов.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - левая панель: соотношение Ang II к PRA у 14 здоровых добровольцев; правая панель: соотношение Ang II к PRC в плазме крови здоровых добровольцев, не получавших или получавших ингибитор ACE;

фиг. 2 - левая панель: соотношение Ang II к PRA у здоровых добровольцев, не получавших или получавших ингибитор ACE (n=14); средняя панель: PRA у здоровых добровольцев, не получавших или получавших ингибитор ACE (n=14); правая панель: соотношение Ang II к PRC у здоровых добровольцев, не получавших или получавших ингибитор ACE (n=4);

фиг. 3 - сравнение ARR и AA2R у одного пациента без ПГА и одного пациента с подтвержденным

ПГА до и через 4 ч после подтверждающего теста с вливанием физраствора. Левая панель: значения приведены в процентах от сигнала до вливания у пациента без ПГА; правая панель: представлено сравнение специфичных для ARR и AA2R коэффициентов различия между пациентом без ПГА и больным ПГА по каждой временной точке;

фиг. 4 - влияние антигипертензивной терапии на концентрацию активного ренина. Образцы плазмы брали у здоровых добровольцев до (predose) и через 4 ч после введения однократной дозы ингибитора ACE (слева), ингибитора ренина (посередине) или блокатора рецепторов ангиотензина (ARB, справа). На графиках представлены средние значения $\pm$ SEM у 5 здоровых добровольцев;

фиг. 5 - сравнение влияния введения блокатора RAS на ARR (верхняя панель) и AA2R (нижняя панель). Брали образцы плазмы у здоровых добровольцев до (predose) и через 4 ч после введения однократной дозы ингибитора ACE (слева), ингибитора ренина (посередине) или блокатора рецепторов ангиотензина (ARB, справа). Измеряли концентрацию альдостерона, равновесную концентрацию ангиотензина II и концентрацию активного ренина в плазме и рассчитывали ARR и AA2R для каждого образца. Для расчета ARR концентрацию альдостерона в нг/л делили на концентрацию активного ренина в плазме в нг/л. Для расчета AA2R концентрацию альдостерона в пмоль/л делили на концентрацию Ang II в пмоль/л. На графиках представлены средние значения $\pm$ SEM у 5 здоровых добровольцев.

Подробное описание изобретения

В существующих способах диагностики ПГА у пациентов используется корреляция между активностью ренина в плазме или концентрацией ренина в плазме и концентрацией альдостерона в плазме. Было показано, что расчеты отношения альдостерона к ренину (ARR) позволяют частичное различие между пациентами без ПГА и больными ПГА. Тем не менее, часто встречаются как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Ренин, как известно, отвечает за выработку ангиотензина I (Ang I), который служит субстратом для образования Ang II другими протеолитическими ферментами типа химазы или ангиотензин-превращающего фермента (ACE). Ang II является основным эффекторным гормоном системы RAS и в основном отвечает за опосредованные RAS физиологические функции, включая регуляцию баланса жидкости и кровяного давления. Считается общепринятым, что активность и концентрация ренина служат суррогатными маркерами для активности RAS (Swales J.D. and Thurston H.J., Clin. Endocrinol. Metab. 1977 Jul, 45(1): 159-63), что используется для поддержки применения ARR в качестве диагностического маркера ПГА.

Неожиданно оказалось, что уровни Ang II, измеренные в уравновешенных образцах плазмы (т.е. уровни Ang II, измеренные методом равновесия в стационарном состоянии (SSE), как описано ниже, которые также называются равновесными уровнями Ang II), проявляют плохую корреляцию с активностью ренина в плазме (PRA) и концентрацией ренина в плазме (PRC), о чем свидетельствует огромная изменчивость в соотношениях Ang II к PRA и Ang II к PRC при сравнении индивидуальных субъектов (фиг. 1, левая и правая панели). Брали кровь у 14 здоровых добровольцев без антигипертензивной терапии. Выделяли плазму центрифугированием и измеряли равновесные уровни Ang II в стабилизированных образцах после 60 мин уравнивания плазмы при 37°C. Методы измерения уровня RAS при равновесии в стационарном состоянии подробно описаны в WO 2013/182237. Для измерения PRA аналогичные образцы подвергали анализу на образование ангиотензина I, как описано (Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569). Количественно определяли ангиотензин I методом масс-спектрометрии и рассчитывали активность ренина в плазме в (нг Ang I/мл)/ч. На графике представлено соотношение равновесного Ang II к активности ренина. Эти соотношения у 14 доноров находились в диапазоне от 48 до 1022 [пг Ang II/мл]/[(нг Ang I/мл)/ч], что составляет 11 и 232% от среднего значения у всех 14 доноров.

Во втором подходе определяли концентрацию ренина в плазме (PRC) у 4 не получавших и 4 получавших ингибитор ACE добровольцев, используя коммерчески доступный и применяемый в клинике анализ ренина на основе антител (Diasorin). Измеряли равновесные уровни Ang II методом масс-спектрометрии после 60 мин уравнивания плазмы при 37°C и стабилизации образцов. Рассчитывали соотношение равновесного Ang II к PRC, которое представлено на графике для не получавших и получавших ингибитор ACE пациентов. Это соотношение приведено в единицах [пг Ang II/мл]/[мкг UIE ренина/мл]. Во всех исследованных группах пациентов соотношения Ang II к PRA и Ang II к PRC оказались очень изменчивыми. Кроме того, применение ингибитора ACE приводило к значительному уменьшению и отношения Ang II к PRC (фиг. 2, правая панель), и отношения Ang II к PRA (фиг. 2, левая панель).

В заключение, близкие результаты по концентрации и/или активности ренина при различных концентрациях Ang II у индивидуальных доноров указывают на то, что активность и/или концентрация ренина является плохим маркером для физиологической активности RAS. Вследствие этого ARR недостаточно отражает связанный с активностью RAS уровень альдостерона, что ставит под вопрос пригодность ARR как инструмента скрининга на ПГА. Эти соображения дополнительно объясняют ограничения при выявлении случаев ПГА по измерениям ARR, которые склонны к ложноположительным и ложноотрицательным результатам и сильно зависят от терапевтического фона пациентов (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281; и Gary L. Schwartz and Stephen T. Turner, Clinical

Chemistry 51, No. 2, 2005).

Более того, на соотношения Ang II к PRA и Ang II к PRC существенно влияет применение ингибитора ACE (фиг. 1, правая панель; фиг 2, левая и правая панели). Вне ожидания, хотя применение ингибитора ACE и повышает активность и концентрацию ренина, но соотношение Ang II к ренину значительно снижается (фиг. 2, средняя панель).

Поэтому мы пришли к выводу, что слабая корреляция концентрации и активности ренина с уровнем Ang II в отсутствие и в присутствии антигипертензивного препарата типа ингибитора ACE может вызывать ограничение прогностической способности ARR при диагностике ПГА.

Напротив, настоящее изобретение касается способа диагностики первичного гиперальдостеронизма у субъекта, включающего измерение уровня альдостерона и уровня ангиотензина II (Ang II) в биологическом образце, взятом у субъекта, и вычисления соотношения между уровнем альдостерона и уровнем Ang II (отношение альдостерона к ангиотензину II, AA2R). В одном воплощении настоящее изобретение касается способа диагностики первичного гиперальдостеронизма у субъекта, включающего получение биологического образца от субъекта, измерение уровня альдостерона и уровня ангиотензина II и объединение их в виде арифметического соотношения (отношения альдостерона к ангиотензину II, AA2R).

Термин "уровень" в настоящем изобретении относится к концентрации вещества (например, такого компонента RAS, как ренин, Ang II, альдостерон и пр.) в биологическом образце, таком, например, как кровь, плазма или сыворотка. Данная концентрация может выражаться в моль/л, ммоль/мл, мкг UIЕ/мл, нг/мл, пг/мл или в любых других единицах концентрации.

В одном воплощении высокое значение AA2R указывает на первичный гиперальдостеронизм, а низкое AA2R указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма. В одном воплощении высокое значение AA2R по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА указывает на первичный гиперальдостеронизм, а/или низкое значение AA2R по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма. В одном воплощении величина AA2R, близкая к AA2R у одного или нескольких подтвержденных пациентов без ПГА, указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма, а/или величина AA2R, близкая к AA2R у одного или нескольких подтвержденных пациентов с ПГА, указывает на первичный гиперальдостеронизм. В одном воплощении используемый выше термин "близкий" означает, что разность между соответствующими соотношениями (т.е. значениями AA2R) составляет менее 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5%.

Как оказалось, AA2R проявляет лучшее соотношение положительных к отрицательным при сравнении одного гипертоника без ПГА с больным ПГА гипертоником до и после теста с вливанием физраствора (SIT) (пример 1, фиг. 3). На левой панели результаты тестирования по каждому отдельному тесту (ARR и AA2R) соотнесены со значением до SIT и выражены в процентах. Больной ПГА был четко положительным в соответствии с критериями теста ARR, с уровнями альдостерона в плазме до и после теста с вливанием физраствора (SIT) в 471 пг/мл и 548 пг/мл соответственно, что дает значения ARR до и после (соотношение альдостерона к PRC) в 588,8 и 421,5 соответственно (PRC до SIT: 0,8 мкг UIЕ/мл; PRC после SIT: 1,3 мкг UIЕ/мл). Пациент без ПГА проявлял концентрацию альдостерона в плазме до и после SIT в 190 пг/мл и 64 пг/мл соответственно, со значениями ARR до и после SIT в 19,2 и 16,4 соответственно, которые четко отрицательны в соответствии с критериями тестирования (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281). Кроме того, рассчитывали специфические к методам коэффициенты различения в качестве меры диагностических возможностей (или диагностической способности) и сравнивали их для ARR и AA2R (фиг. 3, правая панель). Коэффициент различения применяется для сравнения различных тестов путем измерения двух идентичных образцов в обоих испытаниях, причем один из них является истинно отрицательным образцом, а другой истинно положительным. Коэффициент различения представляет собой соотношение между истинно положительным сигналом и истинно отрицательным сигналом. Высокий коэффициент различения означает, что разница между истинно отрицательным и истинно положительным образцом высока, что означает лучшую диагностическую способность по сравнению с тестом с более низким коэффициентом различения, полученным для аналогичных образцов. При соотнесении значения ARR до SIT у пациента с подтвержденным ПГА со значением ARR до SIT у подтвержденного пациента без ПГА получили коэффициент различения 30,7 между подтвержденным пациентом без ПГА (истинно отрицательный) и подтвержденным пациентом с ПГА (истинно положительный). Коэффициент различения после SIT между пациентом без ПГА и больным ПГА составил 25,5 при анализе по ARR.

Неожиданно, анализ идентичных образцов от тех же двух пациентов по AA2R показал коэффициент различения 150,8 для образцов до SIT и коэффициент различения между пациентом без ПГА и больным ПГА в 325,0 для образцов после SIT (фиг. 3, правая панель). Мы пришли к выводу, что использование AA2R вместо ARR сильно повышает коэффициент различения между отрицательным и положительным сигналами, что ведет к заметному улучшению диагностических показателей.

В одном воплощении настоящего изобретения соотношение значений между одним или несколькими подтвержденными положительными по ПГА субъектами и одним или несколькими подтвержденными отрицательными по ПГА субъектами (т.е. коэффициент различения) на основе AA2R выше, чем меж-

ду теми же наборами данных на основе ARR. Соответственно, в одном воплощении соотношение между значениями AA2R у одного или нескольких подтвержденных положительных по ПГА субъектов и AA2R у одного или нескольких подтвержденных отрицательных по ПГА субъектов будет выше, чем отношение из того же набора данных на основе ARR. Иными словами, соотношение между значениями AA2R у одного или нескольких подтвержденных положительных по ПГА субъектов и AA2R у одного или нескольких подтвержденных отрицательных по ПГА субъектов будет выше, чем соотношение между значениями ARR у тех же одного или нескольких подтвержденных положительных по ПГА субъектов и ARR у тех же одного или нескольких подтвержденных отрицательных по ПГА субъектов.

Термин "коэффициент различения" в настоящем изобретении может означать соотношение диагностических параметров (например, ARR или AA2R) у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА (или подтвержденных положительных по ПГА субъектов) к диагностическим параметрам (например, ARR или AA2R) у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА (или подтвержденных отрицательных по ПГА субъектов), либо по одному или нескольким средним значениям таких параметров, например среднему значению ARR или AA2R у когорты подтвержденных субъектов с ПГА и среднему значению ARR или AA2R у когорты подтвержденных субъектов без ПГА. Соответственно, коэффициент различения есть отношение значений ARR у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА к ARR у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА либо значений AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА к AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА. Коэффициент различения является мерой диагностических возможностей (или диагностической способности) соответствующего диагностического параметра или теста. Чем выше это соотношение, тем выше диагностическая способность и тем меньше риск получения ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов.

Термин "подтвержденный субъект с ПГА" относится к субъектам, страдающим от ПГА, которым был поставлен положительный диагноз либо стандартными способами (например, первый скрининг-тест с измерением ARR и по меньшей мере один подтверждающий тест с измерением ARR во второй или третий раз или несколько раз, необязательно до и после SIT), либо положительный диагноз был поставлен способами настоящего изобретения (например, по измерениям AA2R, не требующим подтверждающего тестирования) и/или даже мог быть подтвержден хирургически и/или методами визуализации (например, СТ и/или отбором проб из вен надпочечников). Термин "подтвержденный субъект без ПГА" относится к субъектам, не страдающим ПГА, которым был поставлен отрицательный диагноз либо стандартными способами (например, первый скрининг-тест с измерением ARR и по меньшей мере один подтверждающий тест с измерением ARR во второй или третий раз или несколько раз, необязательно до и после SIT), либо отрицательный диагноз был поставлен способами настоящего изобретения (например, по измерениям AA2R, не требующим подтверждающего тестирования или иных подтверждающих мероприятий, таких, например, как методы визуализации). В способах по изобретению можно использовать один или несколько образцов от одного или нескольких "подтвержденных субъектов без ПГА" или от одного или нескольких "подтвержденных субъектов с ПГА" в качестве нормального контроля для сравнения с исследуемым образцом, т.е. можно использовать один или несколько образцов от одного или нескольких "подтвержденных субъектов без ПГА" в качестве отрицательного контроля и/или можно использовать один или несколько образцов от одного или нескольких "подтвержденных субъектов с ПГА" в качестве положительного контроля. Например, высокое значение AA2R по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА означает первичный гиперальдостеронизм, а/или низкое значение AA2R по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА означает отсутствие первичного гиперальдостеронизма. Если в качестве отрицательного и/или положительного контроля используются два или несколько образцов, то можно определять среднее значение (т.е. среднее арифметическое) или медиану соответствующих образцов. На основе таких контрольных образцов или их значений можно определить порог различения (или предел отсечения), выше которого субъекту ставится положительный диагноз на ПГА, а ниже которого субъекту ставится отрицательный диагноз на ПГА. Такое пороговое значение можно установить и на основании распределения значений AA2R в когорте пациентов, включающей ПГА-положительных и ПГА-отрицательных субъектов. Порог может быть установлен отдельно для разных когорт пациентов (например, можно установить различные пороговые значения для групп пациентов, получающих различные антигипертензивные препараты). Любой из описанных выше параметров, который может использоваться для определения порогового значения (или уровня для сравнения), может использоваться либо по отдельности, либо в сочетании с одним или несколькими другими параметрами с тем, чтобы получить окончательный порог.

Хотя способы настоящего изобретения могут и не требовать подтверждающего тестирования, как уже было сказано выше, тем не менее, подтверждающее тестирование может проводиться (например, по желанию врача или пациента). Более того, сами способы по изобретению могут применяться в качестве подтверждающего тестирования, т.е. могут применяться после того, как был проведен первый скрининг классическими методами на основе ARR.

В одном воплощении коэффициент различения для одной или нескольких заданных пар данных или наборов данных (например, одного или нескольких подозреваемых или подтвержденных субъектов с

ПГА в сравнении с одним или несколькими подозреваемыми или подтвержденными субъектами без ПГА, либо средних значений у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении со средним значением у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов без ПГА) при определении на основе AA2R будет выше коэффициента различения для тех же пар данных или наборов данных при определении на основе ARR, в частности на основе значений ARR из скрининг-теста (т.е. первого измерения ARR и/или значений ARR до любого подтверждающего тестирования) и/или на основе значений ARR из подтверждающего теста (т.е. второго или дальнейшего измерения ARR и/или значений ARR после любого скрининг-теста). В одном воплощении коэффициент различения для одной или нескольких заданных пар данных или наборов данных (например, одного или нескольких подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении с одним или несколькими подозреваемыми или подтвержденными субъектами без ПГА, либо средних значений у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении со средним значением у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов без ПГА) при определении на основе AA2R будет выше, в частности, значительно выше коэффициента различения для тех же пар данных или наборов данных при определении на основе ARR, в частности на основе значений ARR из скрининг-теста (т.е. первого измерения ARR и/или значений ARR до любого подтверждающего тестирования) и/или на основе значений ARR из подтверждающего теста (т.е. второго или дальнейшего измерения ARR и/или значений ARR после любого скрининг-теста). В одном воплощении коэффициент различения для одной или нескольких заданных пар данных или наборов данных (например, одного или нескольких подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении с одним или несколькими подозреваемыми или подтвержденными субъектами без ПГА, либо средних значений у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении со средним значением у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов без ПГА) при определении на основе AA2R будет по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500% выше коэффициента различения для тех же пар данных или наборов данных при определении на основе ARR, в частности на основе значений ARR из скрининг-теста (т.е. первого измерения ARR и/или значений ARR до любого подтверждающего тестирования) и/или на основе значений ARR из подтверждающего теста (т.е. второго или дальнейшего измерения ARR и/или значений ARR после любого скрининг-теста). В одном воплощении коэффициент различения для одной или нескольких заданных пар данных или наборов данных (например, одного или нескольких подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении с одним или несколькими подозреваемыми или подтвержденными субъектами без ПГА, либо средних значений у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов с ПГА в сравнении со средним значением у когорты подозреваемых или подтвержденных субъектов без ПГА) при определении на основе AA2R будет по меньшей мере на 50%, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз выше коэффициента различения для тех же пар данных или наборов данных при определении на основе ARR, в частности на основе значений ARR из скрининг-теста (т.е. первого измерения ARR и/или значений ARR до любого подтверждающего тестирования) и/или на основе значений ARR из подтверждающего теста (т.е. второго или дальнейшего измерения ARR и/или значений ARR после любого скрининг-теста).

Термин "подозреваемый субъект с ПГА" относится к субъектам с подозрением на ПГА, которым еще не поставлен положительный диагноз либо стандартными способами (например, первый скрининг-тест с измерением ARR и по меньшей мере один подтверждающий тест с измерением ARR во второй или третий раз или несколько раз, необязательно до и после SIT), либо положительный диагноз не был поставлен способами настоящего изобретения (например, по измерениям AA2R, не требующим подтверждающего тестирования), или же диагноз был поставлен ранее, но без четкого исхода и/или прежний диагноз требует дальнейшего подтверждения. Термин "подозреваемый субъект без ПГА" относится к субъектам с подозрением на отсутствие ПГА, которым еще не поставлен отрицательный диагноз либо стандартными способами (например, первый скрининг-тест с измерением ARR и необязательно один или несколько подтверждающих тестов с измерением ARR во второй или третий раз или несколько раз, необязательно до и после SIT), либо отрицательный диагноз еще не был поставлен способами настоящего изобретения (например, по измерениям AA2R, не требующим подтверждающего тестирования), или же диагноз был поставлен ранее, но без четкого исхода и/или прежний диагноз требует дальнейшего подтверждения.

Перед сравнением селективности и/или чувствительности между AA2R и ARR можно подвергнуть когорту пациентов критериям предварительного отбора (например, минимальное кровяное давление, минимальный уровень альдостерона, определенное медикаментозное лечение). Например, некоторые исследователи, проводящие скрининг-тесты на основе ARR, требуют минимального уровня альдостерона в 15 нг/дл для положительного результата скрининг-теста, что может привести к изменению чувствительности и/или специфичности по сравнению с когортой пациентов без предварительного отбора.

В одном воплощении специфичность способа по изобретению в определенной когорте пациентов будет равна или выше, чем специфичность классических методов по ARR в той же когорте пациентов, в частности, на основании значений ARR из скрининг-теста (т.е. первого измерения ARR и/или значений ARR до любого подтверждающего тестирования). Специфичность может выражаться в процентах, при этом

$$\text{специфичность [\%]} = \frac{\text{количество истинно отрицательных}}{(\text{кол-во истинно отрицательных} + \text{кол-во ложноположительных})} \times 100.$$

В одном воплощении специфичность способа по изобретению будет выше, чем специфичность классических методов по ARR, в частности значительно выше, чем классических методов по ARR. В одном воплощении специфичность будет выше чем 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном воплощении специфичность способа составляет по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном воплощении специфичность способа составляет 100%.

В одном воплощении чувствительность способа по изобретению в определенной когорте пациентов будет равна или выше, чем специфичность классических методов по ARR в той же когорте пациентов, в частности, на основании значений ARR из скрининг-теста (т.е. первого измерения ARR и/или значений ARR до любого подтверждающего тестирования).

Чувствительность может выражаться в процентах, при этом

$$\text{чувствительность [\%]} = \frac{\text{количество истинно положительных}}{(\text{кол-во истинно положительных} + \text{кол-во ложноотрицательных})} \times 100.$$

В одном воплощении чувствительность способа по изобретению будет выше, чем чувствительность классических методов по ARR, в частности значительно выше, чем классических методов по ARR. В одном воплощении чувствительность способа составляет по меньшей мере 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном воплощении чувствительность способа будет выше чем 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном воплощении чувствительность способа составляет 100%.

В одном воплощении по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% всех подтвержденных субъектов с ПГА имеют большее значение AA2R, чем по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% всех подтвержденных субъектов без ПГА. С помощью способов и наборов по настоящему изобретению можно четко проводить различие между субъектами с ПГА и без ПГА, так как степень перекрытия распределения значений AA2R у субъектов с ПГА и без ПГА существенно ниже, чем перекрытие значений ARR у субъектов с ПГА и без ПГА. В одном воплощении перекрытие составляет 10% или меньше, 9% или меньше, 8% или меньше, 7% или меньше, 6% или меньше, 5% или меньше, 4% или меньше, 3% или меньше, 2% или меньше, 1% или меньше.

Субъекты, которые предположительно страдают ПГА, как правило, находятся под антигипертензивным лечением. Например, во время постановки диагноза ПГА субъект получал и/или получает одну или несколько фармацевтических композиций (которые также именуются лекарственными препаратами) или лекарственных средств, в частности антигипертензивных фармацевтических композиций и/или средств. Взаимное влияние теста на ARR с антигипертензивным лечением представляет собой хорошо известное препятствие для диагностики ПГА у больных-гипертоников. Резистентные пациенты-гипертоники представляют группу высокого риска для ПГА и по определению получают по меньшей мере три антигипертензивных препарата одновременно, но все равно страдают от патологически высокого кровяного давления. Многие из используемых в клинике антигипертензивных препаратов, как известно, оказывают влияние на уровни ренина и альдостерона, причем ренин обычно подвергается влиянию сильнее, чем альдостерон, что вызывает непредсказуемые сдвиги в результатах теста на ARR, ведущие к ложноотрицательным и ложноположительным диагностическим решениям (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281).

Широко используемая в клинике группа антигипертензивных средств - блокаторы RAS. Блокаторы RAS взаимодействуют с RAS так, что они либо снижают уровень Ang II (например, ингибиторы ренина, ингибиторы ACE), либо блокируют действие Ang II на AT₁-рецепторы (например, блокаторы ангиотензиновых рецепторов, ARB). Наряду с блокаторами RAS в качестве антигипертензивных средств могут использоваться активаторы RAS. Например, для лечения гипертонии могут применяться ингибиторы ACE2, как описано, например, в WO 2004/000367 и WO 2008/151347.

Препараты и/или средства, которые влияют, в особенности повышают активность ренина и/или концентрацию ренина, влияют, в особенности снижают величину ARR. Диагностическая способность ARR уменьшается такими препаратами и/или средствами. Обработка 5 здоровых добровольцев однократными дозами различных антигипертензивных средств (пример 2) приводила к очень значительному, в 3-10 раз, повышению концентрации активного ренина в плазме (фиг. 4). Эти вызванные лекарствами изменения концентрации активного ренина сильно повлияли на величину ARR у этих лиц.

Введение однократной дозы ингибитора ACE (10 мг эналаприла), ингибитора ренина (150 мг алискирена) или ARB (50 мг лозартана) приводило к очень значительному и сильному снижению ARR (фиг. 5, верхняя панель), что ведет к сильному уменьшению диагностической способности ARR в присутствии этих антигипертензивных препаратов.

Низкие значения ARR, вызванные антигипертензивной терапией, приводят к ложным отрицательным результатам. В отличие от ARR большинство антигипертензивных препаратов не оказывают существенного влияния на AA2R, за исключением ARB (фиг. 5, нижняя панель). Сравнение значений AA2R до и после введения препаратов показало, что ни введение ингибитора ACE, ни введение ингибитора

ренина не приводит к значительным изменениям AA2R, тогда как ARR значительно снижается в ответ на введение препаратов. Единственным препаратом, вызывающим значительное снижение AA2R, был ARB, который предотвращает связывание Ang II с AT₁-рецепторами и тем самым ведет к накоплению Ang II вместе с повышением концентрации активного ренина, тогда как на ARR существенно влиял каждый из исследуемых антигипертензивных препаратов.

Активность ренина и/или концентрация ренина контролируется по нескольким физиологическим регуляторным механизмам. Любой препарат, который взаимодействует с таким регуляторным механизмом, может повлиять на активность и/или концентрацию ренина. Например, диуретики являются общим классом антигипертензивных препаратов, которые снижают артериальное давление путем усиления диуреза. Усиление диуреза приводит к повышению активности и/или концентрации ренина. Таким образом, лечение субъектов диуретиками уменьшает ARR. Примеры имеющих клиническое применение диуретиков: фуросемид, торсемид, гидрохлоротиазид, ацетазоламид, метазоламид, эплеренон, спиронолактон, амилорид и триамтерен.

Эффекты на активность и/или концентрацию ренина также могут быть опосредованы косвенно путем блокирования одной или нескольких стадий в каскаде RAS, следующих ниже от ренина. Например, блокировка превращения Ang I в Ang II ингибиторами ACE имеет отношение к ARR, так как она приводит к повышению активности и/или концентрации ренина через физиологический механизм компенсации. Этот эффект на ренин, а тем самым и на ARR может иметь место и в случае других препаратов, препятствующих таким ферментативным реакциям RAS, как превращение Ang I в Ang 2-10 аминокислотами и/или превращение Ang I в Ang 1-9 под действием ACE2. Соответственно, один или несколько препаратов или средств, влияющих на одну или несколько из этих стадий RAS, будут мешать диагностике на основе ARR и приводить к ложноположительным и/или ложноотрицательным результатам. Таким образом, при диагностике способами на основе ARR субъект не должен принимать один или несколько таких препаратов или средств.

В отличие методов на основе ARR способы по изобретению также применимы к субъектам, получающим один или несколько таких влияющих на RAS препаратов и/или средств, как описано выше, например один или несколько препаратов или средств, приводящих к снижению диагностической способности ARR (таких, например, как ингибиторы ACE, ACE2, ингибиторы ренина и т.п.). В частности, способы по изобретению также применимы к субъектам, получающим средства, влияющие на (особенно повышающие) активность и/или концентрацию ренина, т.е. способы по изобретению не зависят от таких обработок, которые влияют (особенно повышают) активность и/или концентрацию ренина. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, уменьшающих диагностическую способность ARR. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, уменьшающих диагностическую способность ARR, причем данная терапия либо не уменьшает диагностическую способность AA2R, либо уменьшает диагностическую способность AA2R в меньшей степени.

В одном воплощении субъект проходит лечение, т.е. он получал и/или получает одну или несколько фармацевтических композиций или терапий. В одном воплощении субъект проходит данное лечение во время диагностики, например во время измерения AA2R и/или взятия образца у субъекта. В одном воплощении данное лечение воздействует на RAS, например введение одной или нескольких воздействующих на RAS или влияющих на RAS фармацевтических композиций. В одном воплощении субъект проходит антигипертензивную терапию.

Однако в одном воплощении субъект не получает одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств, влияющих на физиологическую связь между Ang II и секрецией альдостерона (в частности, сигнализацию через AT₁-рецепторы), таких, например, как ARB. Соответственно, в одном воплощении изобретения субъект не получает блокаторы ангиотензиновых рецепторов (ARB). В одном воплощении способ не зависит от одной или нескольких антигипертензивных терапий у субъекта, за исключением терапии блокаторами ангиотензиновых рецепторов (ARB).

В одном воплощении субъект проходит антигипертензивную терапию, за исключением ARB. В одном воплощении субъект проходит антигипертензивную терапию, за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключающих опосредованные Ang II и/или ренином эффекты на уровень альдостерона. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, повышающих концентрацию и/или активность ренина. В одном воплощении субъект проходит антигипертензивную терапию, за исключением ARB и за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключая композиции, вызывающие опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона.

В одном воплощении термины "получает/получают" (или "не получает/не получают") или "проходит лечение" в настоящем описании относятся к таким субъектам (или пациентам), которые получают (или не получают), соответственно, один или несколько препаратов и/или средств во время диагностики, например во время измерения AA2R и/или взятия образца у субъекта. Диагностика может представлять собой одну стадию диагностики, такую, например, как измерение AA2R в один момент времени, или же первый диагноз или любую последующую диагностику, включая подтверждающее тестирование. В дру-

гом воплощении субъект получает (или не получает) данные препараты или средства во время диагностики и в течение определенного времени до диагностики. В одном воплощении данный период времени составляет по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и/или 14 дней.

Термин "воздействовать" в данном описании означает то, что параметр, такой, например, как активность, уровень или соотношение, подвергается (или нет) влиянию, меняется или изменяется, например повышается или уменьшается. В частности, параметр существенно изменяется (или нет). В одном воплощении параметр изменяется (или нет) более чем на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. В одном воплощении, если один параметр изменяется (или нет) больше или меньше, чем другой, то этот параметр изменяется (или нет) по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50, 60, 70, 80, 90 или на 100% больше, чем другой. В одном воплощении параметр повышается (или нет) более чем на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. В одном воплощении параметр уменьшается (или нет) более чем на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

Другой класс антигипертензивных препаратов или средств, влияющих на ARR и/или AA2R, представлен такими фармацевтическими композициями или средствами, которые влияют (в частности, существенно и/или непосредственно влияют) на уровень альдостерона, например фармацевтические композиции, которые влияют на биосинтез, период полураспада и/или деградацию альдостерона, что приводит к изменению уровня альдостерона. Итак, такие препараты или средства, которые изменяют ARR и/или AA2R через их влияние на уровень альдостерона в плазме, также могут быть исключены из лечения субъекта, подлежащего диагностике способами по изобретению. В частности, препараты или средства, которые влияют на AA2R таким образом, что диагностическая способность AA2R при данном лечении снижается по сравнению с диагностической способностью ARR при таком же лечении, следует исключать из способов по изобретению. Соответственно, в одном воплощении субъект может получать один или несколько антигипертензивных препаратов или средств, как описано выше, за исключением ARB и/или препаратов, влияющих на биосинтез, период полураспада и/или деградацию альдостерона.

Поскольку препараты или средства, влияющие на Ang II (например, ингибиторы ACE), могут влиять на уровень альдостерона, во избежание сомнений следует уточнить, что такие препараты или средства, снижающие альдостерон путем снижения уровня Ang II, и тем самым уменьшающие его действие на AT₁-рецепторы и приводящие к снижению секреции альдостерона, не нужно исключать.

Например, терапевтическое введение ингибитора ACE каптоприла приводит к снижению уровня Ang II, тогда как уровень ренина повышается. Таким образом, лечение ингибитором ACE приводит к снижению уровня альдостерона и повышению активности и/или концентрации ренина. Такое лечение не должно бы существенно уменьшить или даже должно увеличить диагностическую способность AA2R, но могло бы уменьшить диагностическую способность ARR, поэтому его не нужно исключать из способов по изобретению, и на самом деле оно составляет предпочтительные воплощения изобретения.

Из способов по изобретению можно исключить только те фармацевтические композиции и/или средства, которые влияют или изменяют AA2R таким образом, что диагностическая способность AA2R будет снижаться по сравнению с диагностической способностью ARR в аналогичных условиях применения (или таким образом, что коэффициент различия для данной пары данных при тестировании по AA2R будет ниже коэффициента различия для аналогичной пары данных при тестировании по ARR).

Соответственно, в одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, снижающих диагностическую способность ARR, но не диагностическую способность AA2R, или же субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, снижающих диагностическую способность ARR и/или AA2R, но при этом диагностическая способность AA2R все-таки будет выше, чем диагностическая способность ARR, на что может указывать более высокий коэффициент различия, большая специфичность и/или избирательность.

Субъект может проходить или не проходить один или несколько видов лечения, включая антигипертензивное лечение (т.е. субъект может подвергаться терапии, например, антигипертензивной терапии) во время диагностики и/или перед диагностикой. В случае, если диагностическая способность при таком лечении будет ниже для AA2R в сравнении с ARR, то субъект не должен подвергаться одной или нескольким таким терапиям или же такие терапии должны быть прекращены с последующей фазой отмывки от такой терапии перед диагностикой на основе AA2R, как описано далее. В одном воплощении субъект, подлежащий диагностике способами по изобретению, может получать одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств за исключением тех средств, которые снижают диагностическую способность AA2R так, что она будет ниже в сравнении с диагностической способностью ARR при аналогичном лечении. В одном воплощении способ не зависит от одной или нескольких терапий (в особенности не зависит от одной или нескольких антигипертензивных терапий) у субъекта за исключением терапии блокаторами ангиотензиновых рецепторов (ARB) и/или препаратами, влияющими на биосинтез, период полураспада и/или деградацию альдостерона.

В одном воплощении субъект, подлежащий диагностике способами по изобретению, может получать одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств, не влияющих на альдостерон и/или Ang II. В одном воплощении субъект может получать одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств, не влияющих существенно на альдостерон и/или Ang II. В одном воплощении

субъект может получать одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств, не влияющих на AA2R. В одном воплощении субъект может получать одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств, не влияющих существенно на AA2R. В одном воплощении субъект может получать одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств, влияющих на один или несколько данных параметров AA2R (т.е. Ang II и/или уровень альдостерона) и/или их соотношение (т.е. AA2R) не более чем на 5, 10, 15 или 20%. Например, субъект, подлежащий диагностике способами по изобретению, может получать одно или несколько антигипертензивных средств (например, один или несколько ингибиторов RAS), которые по отдельности и/или в сочетании приводят к тому, что коэффициент различения на основе AA2R будет (все еще) выше, чем коэффициент различения на основе ARR.

Лечение антигипертензивными препаратами даже может повысить AA2R, что могло бы привести к смещению порога различения. В другом воплощении настоящего изобретения субъект получает один или несколько препаратов или средств, повышающих AA2R.

Как описано здесь, одним важным преимуществом способа по изобретению является то, что AA2R гораздо менее предрасположен к воздействию антигипертензивной терапии, чем ARR. Иными словами, на ARR влияют (и даже значительно его изменяют) намного больше антигипертензивных препаратов и/или средств, чем на AA2R. Даже если бы AA2R и зависел от антигипертензивной терапии, то способы по изобретению обеспечивают улучшение диагностической способности AA2R по сравнению с ARR, на что указывает более высокий коэффициент различения. Только те определенные фармацевтические композиции и/или средства, которые нужно исключать из диагностики на основе AA2R (как это описано в приведенных выше воплощениях), должны быть вымыты из кровеносной системы субъекта перед диагностикой. Соответственно, субъект может либо прекратить такое лечение и/или терапию, либо заменить одну или несколько фармацевтических композиций и/или средств другими подходящими фармацевтическими композициями и/или средствами, в частности другими антигипертензивными фармацевтическими композициями и/или средствами, не влияющими (или существенно не влияющими) на AA2R.

Во избежание сомнений, если говорится об эффекте одной или нескольких фармацевтических композиций и/или средств либо о том, что одна или несколько фармацевтических композиций и/или средств влияют (или не влияют) на какой-то параметр и/или соотношение, то это значит, что эффект вызывается (или не вызывается) либо одной фармацевтической композицией или средством по отдельности, либо комбинацией из двух или нескольких фармацевтических композиций и/или средств, т.е. одна или несколько фармацевтических композиций и/или средств вызывают (или не вызывают) данный эффект либо по отдельности, либо в комбинации.

В одном воплощении субъект получает один или несколько препаратов или средств, изменяющих ARR. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, снижающих диагностическую способность ARR. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, снижающих диагностическую способность ARR, но не снижающих диагностическую мощность способности AA2R или снижающих диагностическую способность AA2R в меньшей степени, чем ARR. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, повышающих диагностическую способность ARR, но в большей степени повышающих диагностическую способность AA2R. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, повышающих диагностическую способность AA2R. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, приводящих к повышению диагностической способности AA2R по сравнению с диагностической способностью ARR. В одном воплощении субъект получает одну или несколько фармацевтических композиций, выбранных из ингибиторов ренина, ингибиторов ACE, ACE2, диуретиков и/или блокаторов кальциевых каналов либо их комбинаций. В одном воплощении субъект получает один или несколько ингибиторов ACE. В другом воплощении субъект получает один или несколько ингибиторов ренина.

В одном воплощении лекарственные средства и/или фармацевтические композиции влияют на один или несколько параметров ARR (т.е. концентрацию и/или активность ренина и/или уровень альдостерона) и/или на их соотношение (т.е. ARR) более чем на 5, 10, 15 или 20%. В одном воплощении средства и/или фармацевтические композиции влияют на один или несколько параметров ARR (т.е. концентрацию и/или активность ренина и/или уровень альдостерона) и/или на их соотношение (т.е. ARR) более чем на 5, 10, 15 или 20%, но влияют на данные параметры AA2R (т.е. Ang II и/или уровень альдостерона) и/или их соотношение (т.е. AA2R) не более чем на 5, 10, 15 или 20%. В одном воплощении субъект не получает один или несколько препаратов или средств, снижающих коэффициент различения по AA2R в сравнении с ARR. В одном воплощении субъект получает один или несколько препаратов или средств, изменяющих ARR, но не AA2R.

Специалист в данной области сможет легко определить, влияет или нет лечение на один или оба параметра, используемых для диагностики (например, уровень ренина и/или активность ренина и/или уровень альдостерона при диагностике на основе ARR и уровень Ang II и/или альдостерона при диагностике на основе AA2R по изобретению). Например, для многих антигипертензивных средств на рынке их эффекты на RAS и/или один или несколько его компонентов описаны в литературе (например, см. табл. 4 в Funder et al., см. выше). Кроме того, эти эффекты могут быть определены стандартными методами, на-

пример путем измерения уровня одного или нескольких параметров в биологических образцах до и во время или после терапии или же сравнения групп пациентов, получающих различное лечение, с помощью статистических методов. С другой стороны, эффекты терапии могут быть определены методом "отпечатка пальцев" RAS, т.е. измерения уровня одного или нескольких компонентов RAS, особенно при равновесии в стационарном состоянии, как описано выше и в WO 2013/182237.

Диагностическая способность может быть определена, как описано здесь или на предшествующем уровне техники. Так, специалист сможет легко определить диагностическую способность ARR и AA2R и сравнить их между собой.

В одном воплощении лечение включает в себя введение по меньшей мере одной фармацевтической композиции, влияющей на ренин-ангиотензиновую систему (RAS), за исключением ARB. В одном воплощении лечение включает в себя введение по меньшей мере одной фармацевтической композиции, влияющей на ренин-ангиотензиновую систему (RAS), за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключающих опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона. В одном воплощении лечение включает в себя введение по меньшей мере одной фармацевтической композиции, влияющей на ренин-ангиотензиновую систему (RAS), за исключением ARB и за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключающих опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона. В одном воплощении фармацевтическая композиция, влияющая на ренин-ангиотензиновую систему (RAS), прямо или косвенно влияет на (или взаимодействует с) RAS. В одном воплощении фармацевтическая композиция, влияющая на (или взаимодействующая с) ренин-ангиотензиновую систему (RAS), представляет собой композицию, которая влияет на экспрессию и/или активность ренина (или мешает этому), прямо или косвенно. Такие взаимодействующие с RAS препараты могут включать один или несколько N- или C-концевых ингибиторов ACE, ингибиторов ренина, ингибиторов аминопептидаз и/или другие соединения, влияющие на экспрессию и/или секрецию эндогенных ферментов RAS в кровоток. В одном воплощении воздействующие на RAS препараты могут включать лизиноприл, капроприл, алискирен, амастатин, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), нейтральной эндопептидазы, который называется неприлизин (NEP), и/или другие соединения, оказывающие влияние на экспрессию и/или секрецию эндогенных ферментов RAS и/или их комбинации. В одном воплощении лечение также может включать в себя определенную диету, например диету с пониженным содержанием соли и/или диету DASH (диетический подход - стоп-гипертония). Однако по меньшей мере один из параметров, используемых для текущей диагностики ПГА на основе ARR, часто подвергается влиянию одной или нескольких таких терапий.

В отличие от ARR на AA2R не влияет большинство антигипертензивных терапий, особенно лечение блокаторами RAS. Во время лечения блокаторами RAS ренин возрастает по хорошо известному регуляторному механизму обратной связи, который запускается при отсутствии Ang II и ведет к секреции ренина. Подавление Ang II также приводит к снижению зависимой от ангиотензина секреции альдостерона, вследствие чего AA2R остается стабильными, тогда как ARR падает из-за возрастания ренина.

Например, терапия ингибиторами ACE связана с повышением активности и концентрации ренина, что мы подтвердили при сравнении PRA между необработанными пациентами и принимавшими ингибитор ACE (фиг. 2, средняя панель). Вследствие повышения активности и концентрации ренина в ответ на терапию ингибиторами ACE, ARR не подходит для скрининга пациентов, проходящих такую терапию, так как ARR сильно уменьшается при снижении ренина, что приводит к возрастанию числа ложноотрицательных результатов теста и тем самым к снижению чувствительности анализа. Поскольку скрининг на ПГА проводится главным образом у пациентов-гипертоников, то взаимодействие с антигипертензивными препаратами встречается очень часто и хорошо известно (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281). Описанные ранее взаимодействия с препаратами поднимают вопрос о необходимости подтверждающих тестов, которые служат для повышения качества тестирования, но явно возлагают значительный сердечно-сосудистый риск на пациентов, поскольку приходится приостанавливать антигипертензивную терапию на несколько недель до подтверждающего тестирования, что ведет к тяжелой гипертензии, которая может вызвать летальные сердечно-сосудистые явления типа инсульта и сердечной недостаточности.

Очень распространенным подтверждающим тестом на ПГА является описанный выше тест с вливанием физраствора. Для подтверждения ПГА применяется тест на ARR при этих определенных условиях, которые служат для повышения качества анализа и диагностической способности ARR (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281).

Например, обычная обработка субъектов и факторы или терапии, которые влияют на ARR, т.е. текущий диагностический параметр, описаны в руководстве по клинической практике Funder et al. 2008, приведенном выше. Более того, такая терапия может повлиять как на уровень альдостерона, так и на уровень ренина. Таким образом, тест на ARR дает ложноположительные и/или ложноотрицательные результаты, приводящие к неадекватному лечению. Во многих случаях эти два параметра, т.е. уровень ренина и уровень альдостерона, даже изменяются разнонаправленно, что может крайне фальсифицировать данное соотношение, а тем самым и результаты диагностики. Однако способ настоящего изобретения не зависит от такой терапии, за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдо-

стерона, но не исключаяющих опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона, а также за исключением терапии блокаторами ангиотензиновых рецепторов (ARB). Антигипертензивные препараты этого класса (ARB) непосредственно связываются с AT₁-рецепторами и тем самым предотвращают передачу сигналов Ang II. Изложенный выше механизм обратной связи ведет к повышению концентрации и активности ренина, что приводит к накоплению Ang II. Это могло бы искусственно понизить AA2R, что следует учитывать в будущем при тестировании на ПГА по AA2R. Однако принимающий ARB пациент мог бы легко переключиться на другой блокатор RAS типа ингибитора ACE перед измерением AA2R. С другой стороны, перед применением способа диагностики по изобретению можно провести вымывание одного или нескольких ARB и/или одной или нескольких фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключаяющих опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона (как описано более подробно выше).

В одном воплощении измеряется равновесный уровень ангиотензина II в стационарном состоянии. Термин "равновесие в стационарном состоянии" (SSE), или "метод SSE", или "равновесный уровень", или "равновесная концентрация" в настоящем описании означает такое измерение по меньшей мере одного пептидного продукта деградации (например, Ang II) из протеолитического каскада (например, RAS) в биологическом образце, в особенности образце крови или полученном из крови образце, при котором образец инкубируют до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие в стационарном состоянии для данного по меньшей мере одного пептидного продукта деградации, задействованного в данном протеолитическом каскаде, причем в образце определяется концентрация данного по меньшей мере одного пептидного продукта деградации при равновесии в стационарном состоянии (или равновесная концентрация). В частности, термин "равновесие в стационарном состоянии" (SSE) в настоящем описании означает, что фактическая общая скорость деградации по меньшей мере одного пептидного продукта деградации, задействованного в протеолитическом каскаде, равняется фактической общей скорости образования данного пептидного продукта деградации, что приводит к стабильной концентрации данного пептидного продукта деградации, т.е. к равновесной концентрации пептида в стационарном состоянии, которая существенно не изменяется за определенный период времени, как это подробно изложено ниже. При таком равновесии в стационарном состоянии фактическая общая скорость образования пептидного продукта деградации определяется суммой фактических скоростей оборота всех ферментов, участвующих в образовании данного пептидного продукта деградации, т.е. данный пептидный продукт деградации является непосредственным продуктом данных ферментов. Фактическая общая скорость деградации пептидного продукта деградации определяется суммой фактических скоростей оборота всех ферментов, участвующих в деградации данного пептидного продукта деградации, т.е. данный пептидный продукт деградации является непосредственным субстратом данных ферментов. Равновесие в стационарном состоянии подробно описано в WO 2013/182237.

Термин "фактическая" в настоящем описании означает фактическую (или эффективную) скорость образования или деградации пептида типа Ang II или же фактическую или эффективную скорость оборота фермента типа ACE, ACE2 и/или аминопептидазы в тех условиях, которые имеются в образце.

Термин "равняется" в настоящем описании означает то, что концентрация пептида при таких равных скоростях образования и деградации данного пептида ("равновесная концентрация пептида в стационарном состоянии" или "равновесный уровень пептида в стационарном состоянии") или при таких равных скоростях оборота по меньшей мере двух ферментов, участвующих в образовании и деградации данного пептида ("равновесная скорость оборота фермента в стационарном состоянии"), изменяется не более чем на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% за период времени по меньшей мере в 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. Соответственно, фактическая общая скорость оборота ферментов, участвующих в деградации данного пептида, определяется фактическими общими скоростями образования их пептидных субстратов с тем, что любой новый или дополнительно образовавшийся субстрат подвергается деградации. Однако это не обязательно означает то, что общая концентрация данного пептида равна нулю, а то, что общая концентрация в образце при равновесии в стационарном состоянии существенно не изменяется, как это подробно описано выше.

Соответственно, в одном воплощении изобретения концентрация данного по меньшей мере одного пептидного продукта деградации (например, Ang II) из протеолитического каскада (например, RAS) остается в постоянных пределах в течение всего периода равновесия в стационарном состоянии, несмотря на непрерывный процесс образования и деградации. В одном воплощении изобретения концентрация данного по меньшей мере одного пептидного продукта деградации при равновесии в стационарном состоянии изменяется не более чем на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% за период времени по меньшей мере в 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. В одном воплощении концентрация данного по меньшей мере одного пептидного продукта деградации при равновесии в стационарном состоянии изменяется не более чем на 15% или не более чем на 10% за 60 мин. Соответственно, данный пептид не будет ни существенно накапливаться, ни значительно уменьшаться за эти приведенные выше периоды времени.

В одном воплощении образец инкубируют вплоть до 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или до 300 мин перед определением равновесной концентрации в стационарном состоянии по мень-

шей мере одного пептидного продукта деградации (в частности, Ang II) в образце. В другом воплощении образец может инкубироваться более 6 ч, особенно вплоть до 8, 12, 18, 24 или до 48 ч. Подходящее время инкубации в основном зависит от данного протеолитического каскада, от подлежащих определению пептидных аналитов, от природы образца и от параметров инкубации. Такой период времени инкубации может быть легко определен специалистом в данной области. В одном воплощении равновесие в стационарном состоянии консервируется (или стабилизируется или замораживается или гасится) после инкубации. Термины "консервируется", "стабилизируется", "замораживается" и "гасится" в настоящем изобретении означают сохранение биохимического статуса, например сохранение уровня пептидов, например, путем ингибирования протеолитической деградации. Стабилизация равновесного уровня пептидов в стационарном состоянии (или уровня пептидов *in vivo*) может осуществляться путем добавления одного или нескольких ингибиторов протеаз, особенно путем добавления коктейля ингибиторов протеаз. Соответственно, после инкубации можно добавлять один или несколько ингибиторов протеаз, пока не будет достигнуто равновесие в стационарном состоянии по меньшей мере для одного пептидного продукта деградации (в частности, Ang II). Подходящие ингибиторы протеаз или их комбинации могут быть выбраны специалистами и могут, например, содержать комбинацию из специфичных или неспецифичных ингибиторов ферментов либо их комбинации. Один или несколько ингибиторов протеаз либо коктейль ингибиторов протеаз гарантирует, что в особенности протеолитические стадии каскада, представляющие интерес (т.е. ферменты образования и деградации подлежащего измерению пептида, т.е. Ang II), либо каждый фермент протеолитического каскада будут полностью заингибированы.

В одном воплощении ингибируется каждая стадия протеолитического каскада, т.е. каждый фермент, участвующий в протеолитическом каскаде, ингибируется по меньшей мере одним компонентом коктейля ингибиторов протеаз. В другом воплощении коктейль ингибиторов протеаз содержит по меньшей мере один специфичный или неспецифичный ингибитор для каждого класса протеаз, участвующих в протеолитическом каскаде. Коктейль ингибиторов протеаз может содержать один или несколько ингибиторов, ингибирующих один или несколько ферментов, участвующих в протеолитическом каскаде. Примеры таких ингибиторов RAS - лизиноприл (ингибитор ACE) и алискирен (ингибитор ренина). Коктейль ингибиторов протеаз также может содержать один или несколько ингибиторов, ингибирующих одну или несколько групп ферментов, участвующих в протеолитическом каскаде, таких, например, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, ингибирует металлопротеазы). Кроме того, коктейль ингибиторов протеаз может содержать один или несколько неспецифичных ингибиторов. В одном воплощении коктейль ингибиторов протеаз включает комбинацию по меньшей мере двух из указанных выше классов ингибиторов. В другом воплощении коктейль ингибиторов протеаз содержит один или несколько ингибиторов питающего каскад фермента, в особенности специфичных ингибиторов питающего каскад фермента (feeding enzyme).

Например, в образец добавляют по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре ингибитора протеаз. В одном воплощении коктейль ингибиторов протеаз включает пепстатин А, 1,10-фенантролин, ЭДТА, *n*-гидроксимеркурибензойную кислоту и ингибитор ренина - пептид Z-Arg-Arg-Pro-Phe-His-Sta-Ile-His-Lys (Z-Arg).

С другой стороны, наряду с использованием одного или нескольких ингибиторов протеаз или коктейля ингибиторов протеаз равновесие в стационарном состоянии может консервироваться путем добавления одного или нескольких хаотропных средств, таких как иодид натрия, перхлорат натрия, перхлорат лития, хлорид магния, гуанидин тиоцианат (GTC), гуанидиния хлорид, фенол, пропанол, бутанол, этанол, додецилсульфат натрия, тиомочевина, мочевина и др.

С другой стороны, наряду с использованием одного или нескольких ингибиторов протеаз или коктейля ингибиторов протеаз равновесие в стационарном состоянии может консервироваться и другими средствами физической инактивации ферментов в образце, например денатурацией фермента, вызванной нагреванием, солью, рН или детергентом; или же охлаждением, например, помещая образцы на лед сразу после инкубации. Для одной или нескольких дальнейших стадий обработки образцов, например отделения плазмы или сыворотки и разделения методом твердофазной экстракции (SPE, например, для истощения матрикса и/или обогащения пептида), можно выбрать и соответствующую температуру окружающей среды, которая гарантирует, что все ферменты в образце будут неактивны. Например, любая предварительная обработка образцов или обработка образцов до анализа проб может проводиться при температуре 4°C (или ниже), по крайней мере, вплоть до полной денатурации или инактивации ферментов, участвующих в протеолитическом каскаде (например, до элюирования из колонки или картриджа SPE).

Напротив, классические методы анализа ренина в плазме (PRA) направлены на полное ингибирование путей деградации ангиотензина I (Ang I) сразу же после взятия образца, и активность фермента рассчитывается по скорости накопления пептида, образованного данным ферментом. Даже если ингибирование путей деградации Ang I при таком анализе PRA и будет неполным, он все еще далек от равновесия в стационарном состоянии по изобретению, так как общая концентрация ангиотензина I существенно изменяется с течением времени. При анализе PRA, как описано, например, у Bystrom et al. (Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569), концентрация ангиотензина I значительно возрастает со временем. Более того, существующие методы анализа стремятся оценить общую активность RAS путем измерения конформаци-

онно активированной формы ренина в образцах плазмы методами на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и радиоиммуноанализа (RIA) (DRG Diagnostics, <http://www.drg-diagnostics.de/49-1-DRG+Renin+active+ELISA.html>). В отличие от измерений SSE, описанных выше, эти методы критически зависят от специфичности используемого антитела и не позволяют делать выводы о концентрации эффекторных пептидов в образцах, которые отвечают за физиологические эффекты RAS. Причиной этого является наличие множественных ферментов, влияющих на уровень эффекторных пептидов. Все эти пептиды можно анализировать одновременно по измерениям SSE, тогда как существующие методы сосредоточены на активности или концентрации лишь одного фермента в образце.

В одном воплощении изобретения при равновесии в стационарном состоянии фактическая скорость оборота питающего каскад фермента максимальна, т.е. питающий субстрат присутствует в огромном молярном избытке по сравнению с питающим ферментом и любое добавление питающего субстрата извне не привело бы к дальнейшему увеличению фактической скорости оборота питающего фермента. Соответственно, питающим ферментом протеолитического каскада является фермент, который отвечает за реакцию питающего каскад превращения, т.е. стадию, лимитирующую скорость последующего протеолитического каскада (или узкое место протеолитического каскада). Для протеолитического каскада RAS в физиологических условиях питающим ферментом является ренин, который отвечает за превращение ангиотензиногена в ангиотензин I. В физиологических системах (например, в организме, в крови, образцах плазмы или сыворотки) ангиотензиноген в качестве субстрата для ренина присутствует в огромном молярном избытке к ренину. Однако в одном воплощении изобретения один или несколько или же все другие ферменты протеолитического каскада RAS, такие, например, как аминопептидазы (AP), особенно аминопептидаза A (APA) и/или аминопептидаза N (APN), дипептидил-аминопептидазы (DAP), карбоксипептидазы (особенно ACE2), дипептидил-карбоксипептидазы (особенно ACE) и/или эндопептидазы (особенно нейтральная эндопептидаза, называемая также неприлизин), присутствуют в образце в концентрации, достаточной для деградации, и тем самым позволяют установиться равновесию в стационарном состоянии для данных ферментов и пептидов во время инкубации, т.е. их фактические общие скорости оборота определяются фактическими общими скоростями образования их пептидных субстратов.

В соответствии с настоящим изобретением термин "питающий фермент" означает фермент с максимальной фактической скоростью оборота, т.е. с такой фактической скоростью оборота, которая максимально достижима для данного фермента в образце. Термин "максимальная достижимая скорость оборота" означает такую скорость оборота фермента, содержащегося в образце, которая может быть достигнута при заданных условиях в образце, если пептидный субстрат будет присутствовать в огромном молярном избытке по сравнению с ферментом (или в практически неисчерпаемом количестве), по крайней мере, до тех пор, пока не установится равновесие в стационарном состоянии. Соответственно, фактическая скорость оборота питающего фермента не может еще больше повыситься при добавлении субстрата извне, так как питающий субстрат уже присутствует в огромном молярном избытке по сравнению с питающим ферментом. Например, если в образец добавляется извне какой-либо субстратный пептид (т.е. пептид, участвующий в протеолитическом каскаде) или аналог такого субстрата до или во время инкубации, пока не установится равновесие в стационарном состоянии, то в соответствии с настоящим определением это может привести к изменению стадий, лимитирующих скорость протеолитического каскада, а тем самым и питающих ферментов протеолитического каскада, если количество добавленного субстратного пептида будет достаточным для достижения максимально достижимой скорости оборота по меньшей мере одного фермента, участвующего в деградации данного субстратного пептида (т.е. другого фермента, чем питающий фермент в физиологических условиях). Например, при исследовании протеолитического каскада RAS, если в образец добавить большой молярный избыток Ang II (или его аналога, например Ang II, несущего метку или любую ковалентную модификацию, включая замену аминокислот) по сравнению с одним или несколькими или же всеми ферментами, участвующими в деградации Ang II, до или во время инкубации, пока не установится равновесие в стационарном состоянии, то по меньшей мере один или даже все ферменты, участвующие в деградации Ang II (например, ACE2, AP и/или DAP) могли бы достичь максимально достижимых скоростей оборота и тем самым стали бы лимитирующими скорость питающими стадиями для последующих протеолитических реакций каскада.

В одном воплощении изобретения в образец может быть добавлен питающий фермент. Добавление питающего фермента увеличит поток через каскад ферментов и тем самым приведет к увеличению абсолютных уровней пептидов, тогда как относительные уровни (соотношения пептидов) останутся неизменными. Соответственно, равновесные уровни в стационарном состоянии одного или нескольких пептидов по-прежнему будут отражать физиологическую ситуацию, т.е. активность ферментов, но общий уровень пептидов пропорционально возрастет. Это было бы полезно, к примеру, если уровни пептидов, измеренные без добавления питающего фермента, были бы ниже предела обнаружения метода, используемого для количественного определения пептидов. Необязательно может быть добавлен и питающий субстрат. Это должно гарантировать, что питающий субстрат останется в молярном избытке по сравнению с питающим ферментом и что питающий субстрат все еще будет присутствовать практически в неисчерпаемом количестве, поэтому скорость оборота питающего фермента останется стабильной в течение определенного времени, определяющего равновесие в стационарном состоянии, даже при добавлении пи-

тающего фермента.

В одном воплощении протеолитический каскад представлен RAS, а подлежащим анализу пептидом является Ang II. В данном воплощении фактическая скорость оборота данного разлагающего Ang II фермента при равновесии в стационарном состоянии равна фактической скорости оборота ACE, который является ферментом, образующим Ang II, если в образце "открыт" только один ферментативный путь деградации Ang II, т.е. активен только один разлагающий Ang II фермент. Если же в образце активны два или несколько ферментов деградации Ang II, то в данном воплощении сумма фактических скоростей оборота данных активных ферментов деградации Ang II (т.е. фактическая общая скорость деградации Ang II) будет равна фактической скорости оборота ACE (т.е. фактической общей скорости образования Ang II).

Соответственно, устанавливается равновесие в стационарном состоянии для пептида, например Ang II, и соответствующих ферментов, т.е. ферментов, образующих или разлагающих данный пептид (например, Ang II). Как описано выше, равновесие в стационарном состоянии достигается, если общая концентрация по меньшей мере одного пептида (в частности, Ang II), двух или нескольких пептидов либо всех пептидов, участвующих в протеолитическом каскаде, изменяется не более чем на 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% за период времени по меньшей мере в 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. Данное равновесие в стационарном состоянии достигается после инкубации образца в течение 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин либо в течение 8, 12, 18, 24 или 48 ч. Равновесие в стационарном состоянии продолжается по меньшей мере 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин.

В одном воплощении изобретения при равновесии в стационарном состоянии общая максимальная достижимая скорость деградации по меньшей мере одного пептида, участвующего в протеолитическом каскаде (например, Ang II), равна или выше, чем его фактическая общая скорость образования. В соответствии с изобретением максимальная достижимая скорость деградации пептида - такая общая скорость деградации, которая может быть достигнута при данных условиях в присутствии огромного молярного избытка данного пептида в сравнении с каждым ферментом, участвующим в деградации данного пептида (или практически неисчерпаемое количество данного пептида), т.е. при добавлении пептида извне. Соответственно, максимальная достижимая скорость деградации пептида представляет собой сумму максимальных достижимых скоростей оборота всех ферментов, участвующих в деградации данного пептида.

В одном воплощении в начале периода инкубации количество всех ферментов, участвующих в протеолитическом каскаде, превышает количество соответствующих субстратов, за исключением питающего протеолитический каскад фермента. В другом воплощении количество данных одного или нескольких ферментов или всех ферментов, участвующих в протеолитическом каскаде, превышает количество соответствующих субстратов в течение всего периода инкубации, за исключением питающего протеолитический каскад фермента.

В другом воплощении приведенные выше условия (т.е. что количество фермента превышает количество соответствующего субстрата и/или скорость образования пептида равна скорости его деградации при равновесии в стационарном состоянии) применимы по меньшей мере к одному или нескольким пептидам, подлежащим анализу (например, Ang II) и/или к соответствующим ферментам, которые образуют или разрушают данные подлежащие анализу пептиды (например, Ang II).

Например, если для изучения компонента протеолитического каскада RAS используется метод SSE настоящего изобретения, а пептид, подлежащий анализу, представлен Ang II, то это значит, что вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии фактическая скорость образования Ang II под действием ACE будет выше, чем сумма фактических скоростей деградации у всех ферментов, участвующих в деградации Ang II, в том числе без ограничения, ACE2, AP и/или DAP. Соответственно, концентрация Ang II будет возрастать, т.е. Ang II будет накапливаться вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии. При достижении равновесия в стационарном состоянии фактическая скорость образования Ang II будет равна сумме фактических скоростей оборота всех ферментов, участвующих в деградации Ang II (фактической общей скорости деградации Ang II).

Соответственно, в одном воплощении равновесия в стационарном состоянии по настоящему изобретению по меньшей мере одна из реакций протеолитической деградации должна быть активной или "открытой" для анализируемого пептида, например Ang II, в такой степени, которая позволяет, чтобы фактическая общая скорость деградации равнялась фактической общей скорости образования данного пептида, т.е. не была заингибирована или "закрыта", например, при помощи одного или нескольких ингибиторов протеаз, в такой степени, чтобы фактическая общая скорость образования превышала фактическую или максимально достижимую общую скорость деградации данного пептида.

В одном воплощении до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии не добавляются хелатирующие средства, такие, например, как EDTA, этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA), 8-гидроксихинолин, фенантролин и димеркапрол (также называется британский антилюизит или BAL), особенно в случае каскада RAS или других протеолитических каскадов, в которых участвуют металлопротеазы, так как хелатирующие средства оказывают ингибирующее дей-

вие на металлопротеазы путем хелатирования двухвалентных ионов.

В одном воплощении до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии не добавляются хаотропные средства, такие, например, как йодид натрия, перхлорат натрия, перхлорат лития, хлорид магния, гуанидин тиоцианат (GTC), гуанидиния хлорид, фенол, пропанол, бутанол, этанол, додецилсульфат натрия, тиомочевина, мочевина и/или др.

В одном воплощении равновесие в стационарном состоянии достигается при физиологических условиях для данного протеолитического каскада, что означает, что компоненты протеолитического каскада (ферменты и пептидные субстраты или продукты), их общие и/или относительные количества, какими они были в биологическом образце при взятии из организма, а также матрикс в отношении состава и/или pH образца не подвергаются или практически не подвергаются модификации до и/или во время инкубации, вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии. В одном воплощении концентрации ферментов и/или пептидов, участвующих в протеолитическом каскаде, какими они были в биологическом образце при взятии из организма, не изменяются до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии.

В другом воплощении до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии не добавляются субстраты или аналоги субстратов любых ферментов, участвующих в протеолитическом каскаде, такие, например, как внутренние стандарты или стандарты деградации, будь-то в исходном виде или модифицированные путем введения метки (например, изотопной и/или флуоресцентной метки) и/или аминокислотной модификации или замены по меньшей мере одной аминокислоты. В одном воплощении настоящего изобретения протеолитический каскад представлен RAS, а до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии не добавляется ни ангиотензиноген, ни ангиотензин I и/или Ang II, ни какие-либо их аналоги.

В другом воплощении до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии не добавляются другие вещества или реагенты, такие, например, как буферные вещества (Трис, PBS, MES, HEPES, цитрат, борат, карбонат или гидрокарбонат (или бикарбонат) и/или другие буферные вещества или соответствующие буферные растворы.

В следующем воплощении до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии не добавляются такие вещества или реагенты, например, как EDTA, EGTA, PMSF, AEBSF, BSA, малеиновая кислота, малеиновый ангидрид, муравьиная кислота и/или вода (в любом виде, например, деионизованная и/или дистиллированная и пр.).

Однако несмотря на вышесказанное, после достижения равновесия в стационарном состоянии и необязательно гашения можно добавить один или несколько таких вышеприведенных ингибиторов протеаз, хелатирующих средств, хаотропных средств, субстратов, стандартов, BSA, буферных веществ и/или других веществ или реагентов.

В частности, после достижения равновесия в стационарном состоянии и замораживания можно добавить один или несколько стандартов, например внутренних стандартов и/или стандартов деградации. Стандартами служат, к примеру, пептиды протеолитического каскада, модифицированные путем введения метки и/или химической маркировки (например, изотопной и/или флуоресцентной метки) и/или модификации аминокислот и/или замены по меньшей мере одной аминокислоты). Соответственно, внутренними стандартами служат помеченные стабильным изотопом внутренние стандарты, например, введенные в WO 03/016861 A. В одном воплощении биологический образец инкубируется в том виде, как он взят у субъекта (*ex vivo*), т.е. матрикс образца и/или концентрации компонентов протеолитического каскада, подлежащих анализу, не подвергаются модификации, но необязательно подвергаются дополнительной обработке (например, для получения плазмы или сыворотки), либо до, либо после достижения и стабилизации равновесия в стационарном состоянии. В биологический образец до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии необязательно можно добавлять антикоагулянты, т.е. вещества, предотвращающие коагуляцию (свертывание крови). Однако такие антикоагулянты не должны существенно влиять на протеазы протеолитического каскада, подлежащие анализу. Подходящим антикоагулянтом для применения в способе SSE по настоящему изобретению является гепарин.

Перед анализом образцы могут подвергаться предварительной обработке или дальнейшей обработке, например отделению плазмы или сыворотки (например, путем центрифугирования или активации коагуляции с последующим центрифугированием) и/или очистке методом твердофазной экстракции (SPE), например, для истощения матрикса и/или обогащения пептида. Соответственно, твердофазная экстракция может проводиться с помощью материала для обратнофазовой хроматографии, гидрофобной хроматографии, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, например материала для обратнофазовой хроматографии, в особенности материала типа C18, C8 или C6H5 (фенил).

В одном воплощении одно или несколько анализируемых веществ (аналитов, например Ang II) упаривают досуха после элюирования из твердой поверхности и могут быть восстановлены в растворителе, совместимом с жидкостной хроматографией высокого давления (также называется высокоэффективной жидкостной хроматографией, HPLC), что означает, что состав растворителя не препятствует связыванию одного или нескольких аналитов с колонкой для HPLC в сочетании с MS. Восстанавливающим растворителем

телем, например, служит водный растворитель, который может быть дополнен добавками, включающими пропанол, бутанол, 2-бутанол, пентанол, 2-пропанол, ацетон, метилэтилкетон, ацетонитрил, метанол, этанол, кислоты или щелочи, для повышения растворимости аналитов и/или облегчения связывания аналитов с колонкой для HPLC.

В другом воплощении способы SSE по изобретению включают следующие стадии: получение образца, обработанного антикоагулянтом; необязательно дальнейшая обработка образца для получения образца плазмы или сыворотки; инкубирование образца до достижения равновесия в стационарном состоянии по меньшей мере для одного пептидного продукта деградации, участвующего в протеолитическом каскаде; консервация данного равновесия в стационарном состоянии; необязательно добавление одного или нескольких внутренних стандартов после консервации равновесия в стационарном состоянии; проведение твердофазной экстракции с этим образцом и анализ образца. Отделение плазмы или сыворотки может проводиться либо до, либо после стадии инкубации, до достижения (и необязательно стабилизации) равновесия в стационарном состоянии, в зависимости от того, будет ли равновесие в стационарном состоянии исследоваться в плазме, сыворотке или цельной крови.

Анализ по меньшей мере одного пептидного продукта деградации необязательно при равновесной концентрации в стационарном состоянии, или уровня альдостерона может проводиться, например, методом масс-спектрометрии (MS); методом жидкостной хроматографии типа жидкостной хроматографии высокого давления (также называется высокоэффективной жидкостной хроматографией, HPLC); в особенности методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (LC-MS) и/или жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Например, в работе Cui et al. (Anal Biochem. 369 (2007), 27-33) изложены методы жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением и жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии для количественного определения ангиотензиновых пептидов. Можно измерять различные массовые переходы для каждого пептида или анализируемого вещества и соответствующих внутренних стандартов. Выполнение метода можно контролировать с помощью образцов для контроля качества.

Такие образцы для контроля качества могут включать, к примеру, биологические образцы с заданными концентрациями аналитов, а также синтетические образцы, содержащие смесь синтетических пептидов в заданных концентрациях. Например, образцом для контроля качества может служить сборный образец крови, плазмы или сыворотки либо сборный образец гомогената ткани с заданными концентрациями одного или нескольких пептидов. Концентрацию ангиотензиновых пептидов (например, концентрацию Ang II) можно рассчитать путем соотношения сигналов эндогенных пептидов с сигналами внутренних стандартов при условии, что интегрированные сигналы достигают соотношения сигнал-шум выше 10.

Кроме того, анализ может проводиться методом радиоиммуноанализа (RIA) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Необязательно перед определением пептидных продуктов деградации из протеолитического каскада на основе RIA или ELISA может выполняться стадия очистки методом HPLC.

В одном воплощении предварительная обработка образцов, дальнейшая обработка образцов и/или анализ образцов может проводиться в мультитулочном формате, например, на 96-луночных планшетах.

Равновесная концентрация в стационарном состоянии пептида (например, Ang II) в этом контексте означает то, что скорость его образования равняется скорости его деградации, при этом концентрация пептида (например, Ang II) не изменяется существенно или значительно по времени в течение определенного периода времени и сильно зависит от сродства ферментов к своим субстратам в данных условиях, а не от максимальной скорости ферментативных превращений, как это подробно описано выше. Поскольку настоящее изобретение имеет дело с биологическими системами, то ясно, что термин "равновесие в стационарном состоянии" не может рассматриваться как одна достижимая точка, но в большей степени как целевой кинетический диапазон концентрации пептидов, который не изменяется значительно по времени в течение определенного времени. Более точные периоды времени до достижения равновесной концентрации в стационарном состоянии в основном зависят от данного протеолитического каскада, от подлежащих определению пептидных аналитов, от характера образца и от параметров инкубации. Это можно легко определить для каждого каскада. В общем, "окно равновесия в стационарном состоянии", в котором может выполняться количественное определение по настоящему изобретению, является довольно большим, по крайней мере, для некоторых протеолитических каскадов, особенно в крови. Обычно равновесие в стационарном состоянии наступает после некоторого времени инкубации, которое определяется эмпирически (например, 30 мин для системы RAS), а затем остается стабильным в течение длительного времени (например, 6 ч для системы RAS). После этого равновесие в стационарном состоянии нарушается такими эффектами, как деградация и инактивация участвующих ферментов или отсутствие питающего субстрата в образце. Для данного каскада можно рассчитать время стабильности (t_s) на основе концентрации питающего субстрата путем деления концентрации питающего субстрата (или питающего пептида-предшественника) (C_i) за вычетом специфичной для фермента и образца константы, определяющей минимальную концентрацию субстрата для достижения максимальной скорости оборота пи-

тающего фермента в образце ($C_{\min}$), на скорость оборота питающего каскад фермента, которая определяет скорость питания (V_f) каскада

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

где t_s - время стабильности на основе концентрации питающего субстрата, ч,

C_f - концентрация питающего субстрата, моль/л,

$C_{\min}$ - специфичная для образца минимальная концентрация субстрата для достижения максимальной скорости оборота питающего фермента в образце, моль/л,

V_f - скорость питания каскада, [моль/л]/ч,

причем $C_{\min} = f \times C_E$, где f - коэффициент избытка, а C_E - концентрация питающего фермента.

Например, применение приведенных выше формул к RAS, где питающее каскад преобразование выполняется ренином, дает расчетное время стабильности на основе концентрации питающего субстрата при равновесии в стационарном состоянии RAS примерно от 60 до 200 ч исходя из различных опубликованных значений для PRA (активности ренина в плазме) и PRC (концентрации ренина в плазме), например, см. [Nishiyama et al. 2010; и Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569], при концентрации AGT, например, 70 мкг/мл плазмы и коэффициенте избытка, например, 1000. Конечно, данное расчетное время стабильности на основе концентрации питающего субстрата должно служить лишь в качестве приближенной теоретической контрольной точки, так как фактическое время стабильности при равновесии в стационарном состоянии может существенно отличаться в образцах.

В отличие от существующих методов, в которых с ограниченным успехом применяются ингибиторы для немедленной стабилизации пептидов, образуемых определенными ферментами [Bystrom et al., Clin. Chem. 56(2010), 1561-1569], согласно настоящему изобретению, образцу дают возможность достичь определяемого активностью ферментов равновесия в стационарном состоянии по меньшей мере для одного пептида, участвующего в протеолитическом каскаде, например Ang II. Этот инновационный подход позволяет получать хорошо воспроизводимую оценку Ang II в физиологическом матриксе образца при интеграции активности ферментов, участвующих в метаболизме Ang II. Другое преимущество перед существующими методами заключается в том, что концентрация субстратов при анализе по настоящему изобретению вообще остается ниже концентрации метаболизирующих ферментов (за исключением питающего фермента), принимая во внимание сродство фермента для каждого отдельного субстрата при данных условиях в образце (например, физиологических условиях), в отличие от анализа активности ферментов *in vitro*, где этим важным свойством пренебрегают ради упрощения путем использования избыточного количества субстрата.

Особенно в отношении образцов крови для достижения равновесия в стационарном состоянии по меньшей мере для одного пептида, вовлеченного в протеолитический каскад (например, Ang II), важно, чтобы протеазы протеолитического каскада, исследуемого настоящим способом SSE, не ингибировались добавлением ингибиторов протеаз в образец, по крайней мере, не до такой степени, которая не позволит по меньшей мере одному ферменту, участвующему в деградации данного по меньшей мере одного пептида, работать до достижения стационарного состояния для данного по меньшей мере одного пептида, т.е. по крайней мере один фермент деградации данного пептида должен быть активным в такой степени, чтобы обеспечить равновесие в стационарном состоянии для данного пептида. Поэтому в одном воплощении до и/или во время инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии в образец не добавляются ингибиторы протеаз с тем, чтобы активность протеаз, участвующих в образовании и деградации по меньшей мере одного подлежащего анализу пептида (например, Ang II), не ингибировалась значительно. В соответствии с таким воплощением образцы не смешивают с такими ингибиторами протеаз либо, если такие ингибиторы уже были добавлены, то такие ингибиторы подавляются (в их функции ингибиторов протеаз) или удаляются до и/или во время инкубации, вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии. Конечно, ингибиторы, не влияющие на протеазы соответствующего протеолитического каскада, который подлежит исследованию методом SSE по настоящему изобретению, но ингибирующие другие протеолитические активности (например, ингибиторы свертывания крови, если изучается RAS), можно добавлять в образец, потому что это не должно повлиять на способность соответствующего протеолитического каскада (т.е. подлежащего анализу каскада, например RAS) к достижению равновесия в стационарном состоянии по меньшей мере для одного пептида этого каскада.

Количественная оценка одного или нескольких продуктов протеолитической деградации (например, Ang II) при равновесии в стационарном состоянии предпочтительна. Она существенно отличается от методов предшествующего уровня техники, в которых обычно применяется определение аналитов в том состоянии протеолитического каскада, когда он стабилизируется сразу после взятия образцов (т.е. проб крови) у субъектов, т.е. не при равновесии в стационарном состоянии. Обычно такие образцы на предшествующем уровне техники обрабатываются ингибиторами протеаз сразу же после взятия проб для того, чтобы ингибировать нежелательные зависимые от ферментов изменения в каскаде. Однако в методе SSE такие зависимые от ферментов изменения используются при анализе физиологического или биохимического статуса субъекта в отношении протеолитического каскада, специально позволяя протеазам данного исследуемого каскада проявлять свою протеолитическую активность вплоть до достижения равновесия в

стационарном состоянии. Обычно это приводит к изменению количества и состава пептидных продуктов распада в исследуемом протеолитическом каскаде по сравнению с образцом, стабилизированным сразу же после взятия образца у субъекта. Специфичная к образцу протеолитическая активность приводит к равновесию в стационарном состоянии, которое гораздо более показательнее для биохимического статуса субъекта в отношении этого каскада, чем при немедленной стабилизации образца (без стадии инкубации вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии).

Как уже отмечалось выше, равновесие в стационарном состоянии по настоящему изобретению представляет собой не одну, количественно точно определенную и изолированную точку, а состояние, при котором в образце существенно уменьшаются изменения относительных соотношений. Обычно такое равновесие в стационарном состоянии достигается путем применения обычных условий инкубации для данных образцов и исследуемого каскада. Как указано выше, образцы можно инкубировать в течение 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 или 300 мин. Для системы RAS и/или брадикининовой системы образцы можно инкубировать по меньшей мере от 30 до 300 мин, или по меньшей мере от 30 до 180 мин, или по меньшей мере от 30 до 120 мин, или по меньшей мере от 30 до 90 мин, или по меньшей мере от 30 до 60 мин. Подходящими температурами инкубации являются присутствующие в физиологической системе или те, при которых протеазы исследуемого протеолитического каскада обладают оптимальной температурой для активности, например, при температуре от 30 до 50°C, от 35 до 40°C и особенно около 37°C (в частности, для крови человека или полученных из крови образцов).

Поскольку метод SSE по настоящему изобретению применяется к протеолитическим активностям, содержащимся в образцах, то эти один или несколько образцов, особенно проб крови, должны быть свободными от добавления ингибиторов протеаз для протеолитического каскада вплоть до достижения равновесия в стационарном состоянии.

Такие ингибиторы протеаз можно добавлять после инкубации для достижения и стабилизации равновесия в стационарном состоянии. Это гарантирует, что концентрации пептидов (в частности, концентрация Ang II), отражающие равновесие в стационарном состоянии, все еще будут присутствовать на стадии количественного определения (хотя равновесие в стационарном состоянии, как правило, стабильно в течение определенного времени, это обеспечивает дополнительные гарантии качества для метода SSE).

Метод SSE зависит от точного и правильного определения пептидных продуктов деградации. Поскольку многие образцы, особенно образцы крови, содержат белки, соли, кислоты, основания, липиды, фосфолипиды или другие компоненты, которые могут помешать определению пептидов, то могут применяться методы предварительной обработки образцов перед количественным определением.

В одном воплощении субъектом является субъект, страдающий гипертензией, и/или устойчивый к антигипертензивной терапии, и/или с подозрением на ПГА, и/или нуждающийся в положительном или отрицательном диагнозе ПГА. В одном воплощении субъектом является человек. В другом воплощении субъектом является животное, например кошка, собака, лошадь, крыса, мышь, кролик, свинья и/или крупный рогатый скот.

Как описано выше, методы предшествующего уровня техники обычно включают в себя одну фазу скрининга, при этом ARR определяется один раз, с последующим подтверждающим тестированием, в котором ARR или только альдостерон определяется, по меньшей мере, во второй раз, пока не будет поставлен диагноз ПГА с достаточной чувствительностью и специфичностью. Причиной такой стратегии является частое возникновение ложноположительных результатов. Описанный выше подтверждающий тест с вливанием физраствора даже может включать определение ARR три раза (один раз при скрининге, второй раз при подтверждающем тестировании перед вливанием физраствора и третий раз после вливания физраствора). Напротив, способы настоящего изобретения позволяют поставить диагноз на основании одного теста или стадии, например, измерения AA2R только один раз.

Соответственно, в одном воплощении способ представляет собой диагностику в одну стадию. В одном воплощении диагностика включает в себя только одно измерение AA2R (в один момент времени). В одном воплощении уровень ангиотензина II и/или уровень альдостерона измеряется только один раз.

В одном воплощении такая диагностика в одну стадию дает подтвержденный диагноз. В одном воплощении такая диагностика в одну стадию не требует никакого подтверждающего тестирования типа второго или дальнейшего измерения AA2R или других параметров. В одном воплощении не требуется тестирования с вливанием физраствора.

В одном воплощении биологический образец представляет собой образец крови или полученный из крови образец. Например, образцом крови или полученным из крови образцом служит цельная кровь, сыворотка, плазма с ЭДТА, плазма с гепарином, плазма с цитратом, гепаринизованная кровь, кровь с ЭДТА или кровь с цитратом. В одном воплощении по меньшей мере один из уровней измеряется методом масс-спектрометрии. В одном воплощении по меньшей мере один из уровней измеряется методом на основе определения антител, таким, например, как ELISA. В одном воплощении оба уровня измеряются методом масс-спектрометрии. В одном воплощении оба уровня измеряются методом на основе определения антител. Это легко осуществимо, так как есть коммерчески доступные наборы для обоих индивидуальных анализов. Однако масс-спектрометрия имеет значительные преимущества перед методами на

основе определения антител в отношении избирательности и воспроизводимости.

В другом аспекте настоящее изобретение касается наборов для диагностики ПГА, включающих стандарт ангиотензина II и стандарт альдостерона.

В одном воплощении набор может дополнительно включать в себя руководство, один или несколько растворителей, один или несколько детергентов и/или один или несколько картриджей для твердофазной экстракции.

В одном воплощении руководство содержит описание способа по изобретению, в частности описание любых из описанных выше воплощений способа. В одном воплощении набор содержит меченный изотопом стандарт ангиотензина II и/или меченный изотопом стандарт альдостерона. В одном воплощении набор содержит антитела к ангиотензину II и/или антитела к альдостерону.

Изобретение дополнительно представлено следующими воплощениями, которые легко сочетаются с любым из пп. 1-15.

1. Способ диагностики первичного гиперальдостеронизма у субъекта, включающий измерение уровня альдостерона и уровня Ang II и объединение их в виде арифметического соотношения (отношения альдостерона к Ang II, AA2R), или способ, приведенный в формуле изобретения, в частности в п. 1.

2. Способ по воплощению 1, где высокое значение AA2R указывает на первичный гиперальдостеронизм, а низкое значение AA2R указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма.

3. Способ по воплощению 1 или 2, где коэффициент различения на основе AA2R для данной пары данных или набора данных будет выше коэффициента различения на основе ARR для той же пары данных или набора данных.

4. Способ по любому из воплощений 1-3, где специфичность метода превышает 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

5. Способ по любому из предыдущих воплощений, где чувствительность метода составляет по меньшей мере 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

6. Способ по любому из предыдущих воплощений, где по меньшей мере 95% всех подтвержденных субъектов с ПГА имеют более высокие значения AA2R, чем по меньшей мере 95% всех подтвержденных субъектов без ПГА.

7. Способ по любому из предыдущих воплощений, когда способ не зависит от какой-либо терапии у субъекта, за исключением ARB и за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключающих опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона.

8. Способ по воплощению 7, в котором терапия представляет собой взаимодействующую с RAS терапию.

9. Способ по любому из предыдущих воплощений, в котором измеряется равновесный уровень ангиотензина II в стационарном состоянии.

10. Способ по любому из предыдущих воплощений, где субъектом является человек.

11. Способ по любому из предыдущих воплощений, где субъект проходит антигипертензивную терапию, за исключением ARB и за исключением фармацевтических композиций, влияющих на уровень альдостерона, но не исключающих опосредованные Ang II эффекты на уровень альдостерона.

12. Способ по воплощению 11, в котором терапия включает введение по меньшей мере одной фармацевтической композиции, влияющей на ренин-ангиотензиновую систему (RAS).

13. Способ по любому из предыдущих воплощений, который представляет собой диагностику в одну стадию и не требует никакого подтверждающего тестирования.

14. Способ по любому из предыдущих воплощений, где уровни измеряются только один раз.

15. Способ по любому из предыдущих воплощений, в котором не требуется тестирования с вливанием физраствора.

16. Способ по любому из предыдущих воплощений, где биологический образец представляет собой образец крови или полученный из крови образец.

17. Способ по любому из предыдущих воплощений, где образцом крови или полученным из крови образцом служит цельная кровь, сыворотка, плазма, гепаринизованная кровь, кровь с ЭДТА или кровь с цитратом.

18. Способ по любому из предыдущих воплощений, где по меньшей мере один из уровней измеряется методом масс-спектрометрии.

19. Способ по любому из предыдущих воплощений, где по меньшей мере один из уровней измеряется методом на основе определения антител.

20. Набор для диагностики ПГА, включающий стандарт ангиотензина II, стандарт альдостерона и руководство.

21. Набор по воплощению 20, дополнительно включающий один или несколько растворителей, детергентов и/или картриджей для твердофазной экстракции.

22. Набор по воплощению 20 или 21, в котором руководство содержит описание способа по любому из воплощений 1-19.

23. Набор по любому из воплощений 20-22, который предназначен для количественного анализа по меньшей мере одного уровня методом на основе определения антител и содержит антитела к ангиотен-

зину II и/или антитело к альдостерону.

Примеры

Пример 1. Измерение AA2R в плазме крови пациентов-гипертоников.

Тест с вливанием физраствора (SIT) и сбор образцов.

Одного пациента без ПГА и одного пациента с ПГА подвергали тесту SIT. Пациенты проходили SIT в соответствии с рекомендациями Эндокринологического общества (John W. Funder et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. September 2008, 93(9):3266-3281). Вкратце, пациенту вводили 2 л 0,9% солевого раствора в течение 4 ч (тест с вливанием физраствора, SIT). Брали пробы крови с ЭДТА и крови с гепарином до (пре-SIT) и через 4 ч после вливания физраствора (после SIT). Образцы крови центрифугировали в охлажденной центрифуге при 3000×g в течение 10 мин и замораживали при -80°C до проведения анализа методом масс-спектрометрии.

Измерение равновесного уровня Ang II.

Равновесный уровень Ang II определяли путем измерения уровня ангиотензиновых пептидов в стационарном состоянии в уравновешенных образцах плазмы с гепарином. Для этого размороженные образцы плазмы с гепарином инкубировали 30 мин при 37°C на водяной бане. После уравнивания уровень ангиотензиновых пептидов в плазме стабилизировали добавлением ингибиторов протеаз, после чего определяли равновесные уровни пептидов методом масс-спектрометрии. Для этого в стабилизированные образцы плазмы добавляли меченный стабильным изотопом Ang II в концентрации 200 пг/мл для внутренней стандартизации. После твердофазной экстракции на основе C18 образцы подвергали масс-спектрометрическому анализу на обратнофазовой аналитической колонке (Acquity UPLC® C18, Waters), подключенной к тройному квадрупольному масс-спектрометру XEVO TQ-S (Waters) в режиме MRM. Измеряли два различных массовых перехода для аналита и стандарта и рассчитывали концентрации путем соотношения эндогенных сигналов с сигналами внутренних стандартов с учетом соответствующих коэффициентов чувствительности, определяемых по калибровочным кривым в холостых пробах плазмы человека.

Измерение уровня альдостерона в плазме.

В стабилизированные образцы плазмы добавляли меченный стабильным изотопом альдостерон в концентрации 500 пг/мл для внутренней стандартизации. После твердофазной экстракции на основе C18 образцы подвергали масс-спектрометрическому анализу на обратнофазовой аналитической колонке (Acquity UPLC® C18, Waters), подключенной к тройному квадрупольному масс-спектрометру XEVO TQ-S (Waters) в режиме MRM. Измеряли два различных массовых перехода для аналита и стандарта и рассчитывали концентрации путем соотношения эндогенных сигналов с сигналами внутренних стандартов с учетом соответствующих коэффициентов чувствительности, определяемых по калибровочным кривым в холостых пробах плазмы человека.

Вычисление.

Полученные концентрации альдостерона делили на полученные концентрации Ang II в каждом образце плазмы.

Пример 2. Измерение AA2R у здоровых добровольцев, получающих различную антигипертензивную терапию.

Терапия и сбор образцов.

Пяти здоровым добровольцам вводили однократные дозы трех различных антигипертензивных препаратов в 3 различных дня терапии с интервалом в 1 неделю. Через 4 ч после введения однократной дозы 10 мг эналаприла (ингибитор ACE), 50 мг лозартана (ARB) или 150 мг алискирена (ингибитор ренина) брали гепаринизованную кровь путем венозной пункции и отделяли плазму центрифугированием. Образцы замораживали при -80°C до проведения анализа.

Измерение равновесного уровня Ang II.

Равновесный уровень Ang II определяли путем измерения уровня ангиотензиновых пептидов в стационарном состоянии в уравновешенных образцах плазмы с гепарином. Для этого размороженные образцы плазмы с гепарином инкубировали 60 мин при 37°C на водяной бане. После уравнивания уровень ангиотензиновых пептидов в плазме стабилизировали добавлением ингибиторов протеаз, после чего определяли равновесные уровни пептидов методом масс-спектрометрии. Для этого в стабилизированные образцы плазмы добавляли меченный стабильным изотопом Ang II в концентрации 200 пг/мл для внутренней стандартизации. После твердофазной экстракции на основе C18 образцы подвергали масс-спектрометрическому анализу на обратнофазовой аналитической колонке (Acquity UPLC® C18, Waters), подключенной к тройному квадрупольному масс-спектрометру XEVO TQ-S (Waters) в режиме MRM. Измеряли два различных массовых перехода для аналита и стандарта и рассчитывали концентрации путем соотношения эндогенных сигналов с сигналами внутренних стандартов с учетом соответствующих коэффициентов чувствительности, определяемых по калибровочным кривым в холостых пробах плазмы человека.

Измерение уровня альдостерона в плазме.

В стабилизированные образцы плазмы добавляли меченный стабильным изотопом альдостерон в кон-

центрации 500 пг/мл для внутренней стандартизации. После твердофазной экстракции на основе C18 образцы подвергали масс-спектрометрическому анализу на обратнофазовой аналитической колонке (Acquity UPLC® C18, Waters), подключенной к тройному квадрупольному масс-спектрометру XEVO TQ-S (Waters) в режиме MRM. Измеряли два различных массовых перехода для аналита и стандарта и рассчитывали концентрации путем соотношения эндогенных сигналов с сигналами внутренних стандартов с учетом соответствующих коэффициентов чувствительности, определяемых по калибровочным кривым в холостых пробах плазмы человека.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики первичного гиперальдостеронизма (ПГА) у субъекта, включающий измерение уровня альдостерона и уровня ангиотензина II (Ang II) в биологическом образце субъекта, причем измеряют уровень ангиотензина II в состоянии равновесия, вычисление соотношения между уровнем альдостерона и уровнем Ang II (отношения альдостерона к Ang II - AA2R),

где если определенное значение AA2R выше по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов без ПГА, то это указывает на первичный гиперальдостеронизм, а/или значение AA2R ниже по сравнению с AA2R у одного или нескольких подтвержденных субъектов с ПГА, то это указывает на отсутствие первичного гиперальдостеронизма.

2. Способ по п.1, в котором соотношение значений между одним или несколькими подтвержденными положительными по ПГА субъектами и одним или несколькими подтвержденными отрицательными по ПГА субъектами (т.е. коэффициент различения) на основе AA2R выше, чем отношение альдостерона к ренину (ARR) для того же набора данных.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором специфичность и/или чувствительность способа выше, чем специфичность и/или чувствительность ARR у той же когорты пациентов.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором субъект проходит антигипертензивную терапию.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором субъект получает лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, повышающими концентрацию и/или активность ренина.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором субъект получает лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, снижающими чувствительность и/или специфичность отношения альдостерона к ренину (ARR).

7. Способ по п.6, в котором субъект получает лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, которые не снижают чувствительность и/или специфичность AA2R.

8. Способ по п.6, в котором субъект получает лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, которые снижают чувствительность и/или специфичность ARR больше, чем чувствительность и/или специфичность AA2R.

9. Способ по п.6, в котором субъект получает лечение одной или несколькими фармацевтическими композициями, выбранными из ингибиторов ренина, ингибиторов ACE, ACE2, диуретиков и/или блокаторов кальциевых каналов.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором субъект не получает лечение блокаторами ангиотензиновых рецепторов (ARB).

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, который представляет собой диагностику в одну стадию и не требует подтверждающего тестирования.

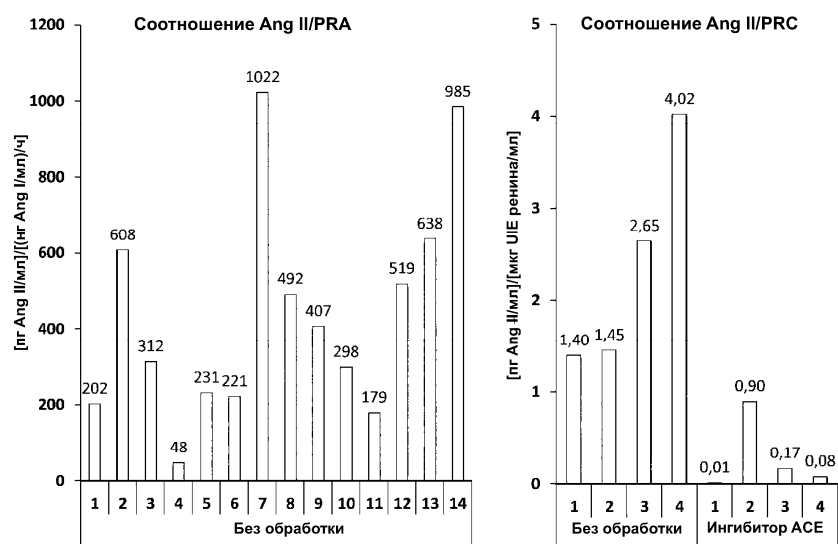
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором биологический образец представляет собой образец крови или полученный из крови образец.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором по меньшей мере один из уровней измеряется методом масс-спектрометрии.

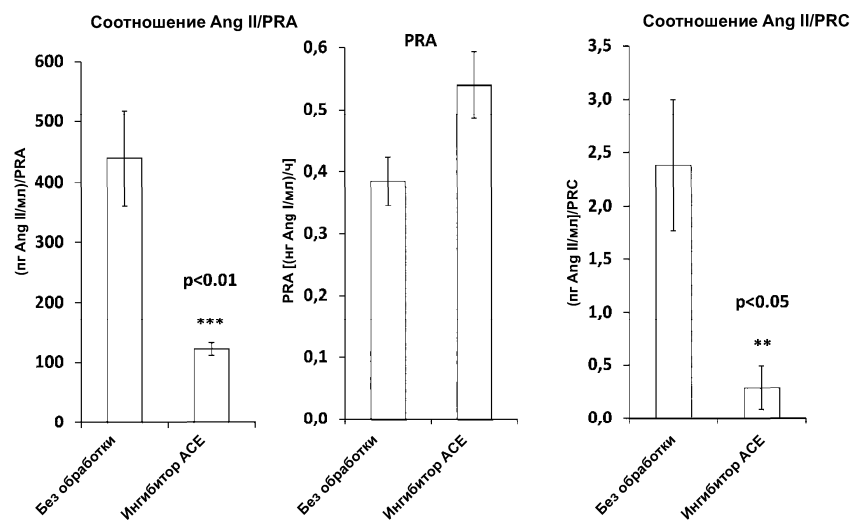
14. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором по меньшей мере один из уровней измеряется количественными методами на основе антител.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором AA2R сравнивают с двумя или более значениями AA2R у подтвержденных как не страдающих ПГА субъектов и двумя или более AA2R значениями у субъектов-людей, страдающих ПГА, и определяют порог на основе значения распределения AA2R в когорте пациентов, включающей субъектов-людей, подтвержденных как не страдающих ПГА, и на основе значения распределения AA2R в когорте пациентов, включающей субъектов-людей, подтвержденных как страдающих ПГА, и этого субъекта диагностируют как ПГА-позитивного, если значение AA2R является порогом, или в котором субъекта диагностируют как ПГА-негативного, если AA2R значения ниже этого порога.

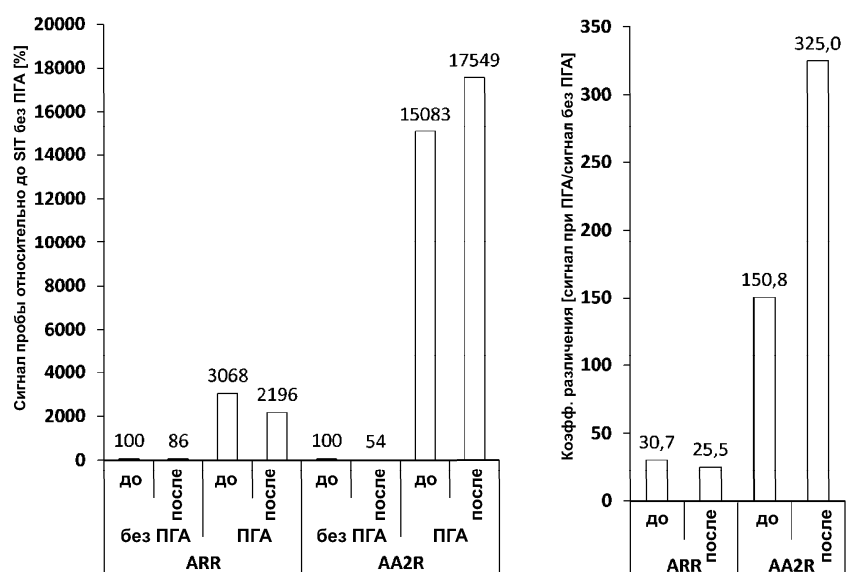
16. Способ по п.15, в котором специфичность и/или чувствительность способа выше, чем специфичность и/или чувствительность ARR в той же когорте пациентов.



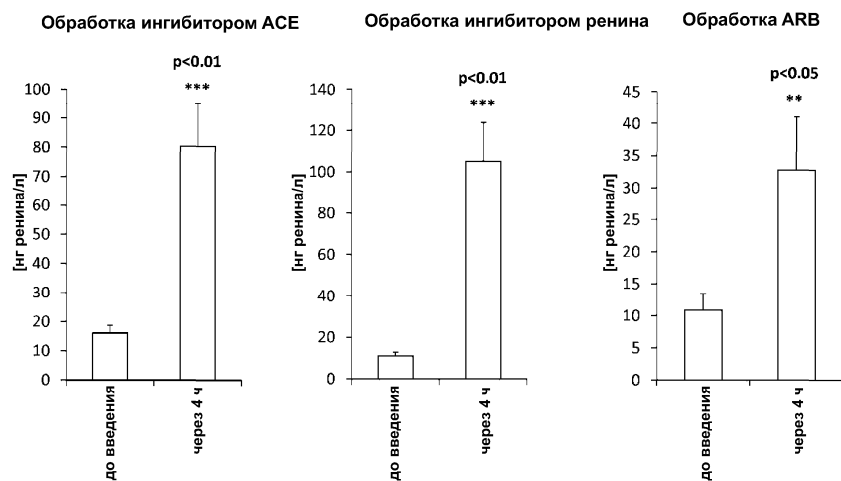
Фиг. 1



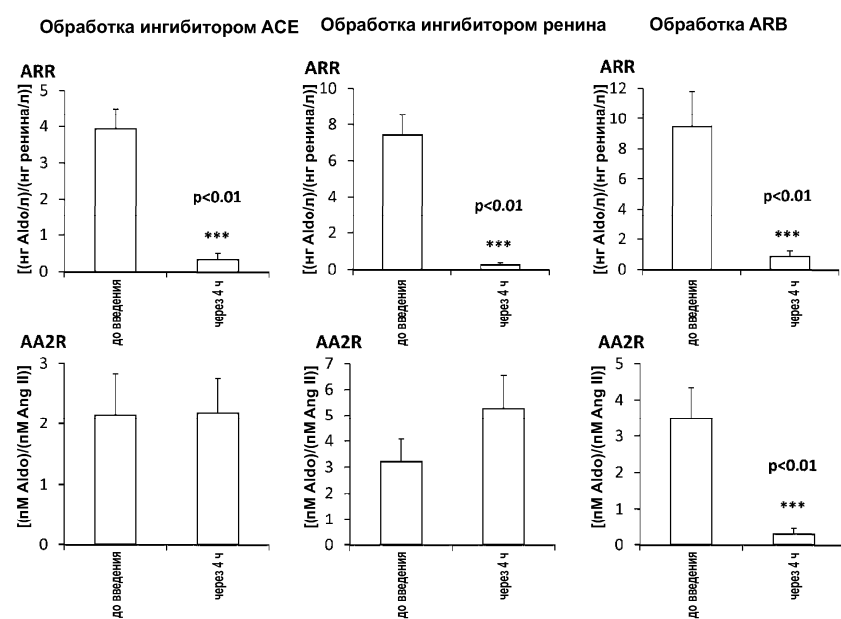
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

