



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0917497-4 B1



(22) Data do Depósito: 07/08/2009

(45) Data de Concessão: 28/01/2020

(54) Título: MÉTODOS PARA MEDIR A QUANTIDADE DE ANGIOTENSINA 1 E A ATIVIDADE DA RENINA EM UMA AMOSTRA

(51) Int.Cl.: G01N 33/68.

(52) CPC: G01N 33/6848; G01N 2333/96416.

(30) Prioridade Unionista: 08/08/2008 US 12/189,092.

(73) Titular(es): QUEST DIAGNOSTICS INVESTMENTS INCORPORATED.

(72) Inventor(es): CORY E. BYSTROM; RICHARD E. REITZ; NIGEL J. CLARKE.

(86) Pedido PCT: PCT US2009053189 de 07/08/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/017499 de 11/02/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/02/2011

(57) Resumo: ENSAIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA RENINA NO PLASMA. A presente invenção refere-se a métodos para medir a atividade da renina em uma amostra de plasma usando a espectrometria de massa. Os métodos em geral envolvem ionizar a angiotensina 1 purificada a partir da amostra e detectar a quantidade de íons de angiotensina 1 gerados. A quantidade de íons de angiotensina 1 detectados é então relacionada à quantidade de angiotensina 1 gerada na amostra, a qual, por sua vez, é relacionada à atividade da renina na amostra.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MÉTODOS PARA MEDIR A QUANTIDADE DE ANGIOTENSINA 1 E
A ATIVIDADE DA RENINA EM UMA AMOSTRA".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se à medição da atividade da renina. Em um aspecto particular, a invenção refere-se aos métodos para a medição da atividade da renina no plasma por HPLC-espectrometria de massa.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A descrição a seguir dos antecedentes da invenção é proporcionada simplesmente como um auxílio no entendimento da invenção e não é permitida para descrever ou constituir técnica anterior para a invenção.

[0003] Conforme discutido em Fredline e col. *Clin. Chem.* **45**: 659-664 (1999), a renina é uma enzima proteolítica secretada no sangue pelas células justaglomerulares do rim. A renina atua sobre o angiotensinogênio para produzir um decapeptídeo referido como angiotensina 1 (Ang1). A Ang1 é adicionalmente clivada pela enzima conversora de angiotensina para formar um octapeptídeo, referido como angiotensina 2 (Ang2). A Ang2 estimula o crescimento da célula, o transporte de sódio pelo túbulo renal, e a liberação de aldosterona. A Ang2 é um dos vasopressores mais potentes nos seres humanos e desempenha um papel importante na regulação da pressão sanguínea. A medição direta da Ang2 é difícil por causa de suas concentrações circulantes muito baixas e meia-vida extremamente curta. A Ang1, que é mais estável do que a Ang2, proporciona um melhor analito para medir o estado do sistema de renina-angiotensina. A determinação de uma "atividade da resina no plasma" (PRA) a partir da taxa de geração de Ang1 é usada clinicamente para a diagnose e o controle da hipertensão.

[0004] O método clássico para a determinação da PRA é o

radioimunoensaio (RIA), vide Scaley, *Clin. Chem.* **37**:1811-1819 (1991); Shionoiri e col., *Horm Res.* **37**:171-175 (1992). Um radioimunoensaio típico é efetuado pela preparação simultânea de uma série de misturas padrões e desconhecidas em tubos de teste, cada um contendo concentrações idênticas de antígeno marcado e anticorpo específico. Após um tempo de reação apropriado, as frações ligadas ao anticorpo (B) e livres (F) do antígeno marcado são separadas por uma de uma variedade de técnicas. As razões de B/F nos padrões são representadas graficamente como uma função da concentração do antígeno não marcado (curva padrão) e a concentração desconhecida do antígeno é determinada comparando-se a razão de B/F observada com a curva padrão. Os métodos de radioimunoensaio são baseados em princípios de ligação competitiva e os anticorpos usados podem sofrer ligação não específica com outras proteínas plasmáticas, tais como as angiotensinas endógenas. Esta reatividade cruzada potencial pode causar superestimação da PRA. Uma outra abordagem é usar a HPLC para isolar a Ang1 das outras angiotensinas, antes da quantificação com o RIA (vide os exemplos de Meng e col., *J. Am. Soc. Nephrol.* **6**: 1209-1215 (1995); Meng e col., *J. Chromatogr.* **21**, 614(1): 19-25 (1993); Kohara e col., *Peptides* **12**: 1135-1141 (1991)). Estes métodos de HPLC para a quantificação da Ang1 foram desenvolvidos usando detecção por ultravioleta, fluorescência e espectrômetro de massa (ver os exemplos de Klickstein e col. *Anal. Biochem* **120**: 146-150 (1982); Miyazaki e col. *J Chromatogr.* **490**: 43-51 (1989) e Fredline e col. *Clin. Chem.* **45**: 659-664 (1999)).

[0005] Por exemplo, Fredline e col. descrevem a medição da atividade da renina no plasma com o uso de HPLC-eletropulverização-espectrometria de massa em tandem. Ao fazer esta medição, Fredline e col. incubam as amostras de plasma na presença de um inibidor de enzima sensível à água (isto é, o fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF))

e medem a quantidade de angiotensina 1 gerada durante a incubação por observação da dissociação induzida por colisão dos íons do precursor com uma (m/z) de 649.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] A presente invenção proporciona métodos para medir a quantidade de angiotensina 1 e para medir a atividade da renina no plasma em uma amostra por espectrometria de massa, incluindo a espectrometria de massa em tandem.

[0007] Em um aspecto, proporcionam-se métodos para medir a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra. Os métodos podem incluir: (a) ionizar a angiotensina 1 na amostra para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; (b) detectar a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 por espectrometria de massa, onde os íons são selecionados a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$, $647,4 \pm 0,5$ e $1297 \pm 0,5$; e (c) usar a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na amostra. Em algumas modalidades, o limite de quantificação dos métodos é menor do que, ou igual a, 0,1 ng/mL; tal como menor do que, ou igual a, 0,05 ng/mL; tal como cerca de 0,03 ng/mL. Nas modalidades adicionais, o método compreende purificar a angiotensina 1 a partir da amostra por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em algumas modalidades, os métodos adicionalmente compreendem purificar a angiotensina 1 na amostra com uma coluna de extração em fase sólida. Em outras modalidades, a quantidade do(s) íon(s) de angiotensina 1 é relacionada à quantidade de angiotensina 1 na amostra por comparação a um padrão interno. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[0008] Em um outro aspecto, proporcionam-se métodos para medir

a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra. Os métodos podem incluir: (a) ionizar a angiotensina 1 a partir da amostra para produzir um ou mais íons; e (b) detectar a quantidade de pelo menos um dito íon por espectrometria de massa, onde o dito íon é selecionado a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$, $647,4 \pm 0,5$ e $1297 \pm 0,5$; e onde a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 detectado(s) proporciona uma medida da quantidade de angiotensina 1 na amostra. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[0009] Em um outro aspecto, proporcionam-se métodos para medir a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra. Os métodos podem incluir: (a) incubar a amostra pré-misturada com um inibidor de protease estável em água que não seja efetivo contra a renina sob as condições adequadas para a geração da angiotensina 1 pela renina na amostra; (b) purificar a angiotensina 1 a partir da amostra por cromatografia líquida; (c) ionizar a angiotensina 1 purificada para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; (d) detectar a quantidade de um ou mais íons de angiotensina por espectrometria de massa; e (e) usar a quantidade de íon(s) detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na amostra. Em algumas modalidades, o limite de quantificação do método é menor do que, ou igual a, $0,1 \text{ ng/mL}$; tal como menor do que, ou igual a, $0,05 \text{ ng/mL}$; tal como cerca de $0,03 \text{ ng/mL}$. Nas modalidades adicionais, os íons gerados por espectrometria de massa são selecionados a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$, $647,4 \pm 0,5$ e $1297 \pm 0,5$. Nas modalidades relacionadas, os íons compreendem um íon do precursor com uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e um ou mais íons do fragmento selecionados a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $619,4 \pm 0,5$ e $647,4 \pm 0,5$.

Em outras modalidades, a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 é relacionada à quantidade de angiotensina 1 na amostra de teste por comparação a um padrão interno. Em outras modalidades preferidas, os métodos adicionalmente compreendem purificar a angiotensina 1 na amostra com uma coluna de extração em fase sólida. Em outras modalidades preferidas, o inibidor de protease estável em água é o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[00010] Em um outro aspecto, proporcionam-se métodos para medir a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra. Os métodos podem incluir: (a) incubar a amostra sob condições adequadas para a geração de angiotensina 1 pela renina na amostra; (b) purificar a angiotensina 1 a partir da dita amostra por extração em fase sólida; (c) adicionalmente purificar a angiotensina 1 após a etapa (b) por cromatografia líquida com processamento em linha; (d) ionizar a angiotensina 1 purificada da etapa (c) para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; e (e) detectar a quantidade de um ou mais íons de angiotensina 1 por espectrometria de massa; (f) usar a quantidade de íon(s) detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na amostra. Em algumas modalidades preferidas, a cromatografia líquida é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em outras modalidades, o limite de quantificação dos métodos é menor do que, ou igual a, 0,1 ng/mL; tal como menor do que, ou igual a, 0,05 ng/mL; tal como cerca de 0,03 ng/mL. Nas modalidades adicionais, os métodos incluem gerar íons que compreendem um ou mais íons selecionados a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$, $647,4 \pm 0,5$ e $1297 \pm 0,5$. Nas modalidades relacionadas, os métodos incluem gerar íons do precursor de angiotensina 1, nos quais pelo menos um dos íons do precursor tem

uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$. Nas modalidades preferidas relacionadas, os métodos podem incluir gerar um ou mais íons do fragmento de um íon do precursor de angiotensina 1, em que pelo menos um dos íons do fragmento tem uma razão de massa/carga de $619,4 \pm 0,5$ ou $647,4 \pm 0,5$. Nas modalidades adicionais, a incubação ocorre na presença de um inibidor de protease estável em água que não é efetivo contra a renina. Em certas modalidades preferidas, o inibidor de protease estável em água é o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila. Em algumas modalidades, a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 é relacionada à quantidade de angiotensina 1 na amostra de teste por comparação a um padrão interno. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[00011] Em um outro aspecto, proporcionam-se métodos para medir a atividade da renina em uma amostra. Os métodos podem incluir: (a) incubar a amostra sob condições adequadas para a geração da angiotensina 1 pela renina na amostra; (b) purificar a angiotensina 1 a partir da amostra por extração em fase sólida; (c) adicionalmente purificar a angiotensina 1 por cromatografia líquida com processamento em linha; (d) ionizar a angiotensina 1 purificada para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; (e) detectar a quantidade de um ou mais íons de angiotensina 1 por espectrometria de massa; (f) usar a quantidade de íon(s) detectado(s) para a quantidade de angiotensina 1 na amostra; e (g) usar a quantidade de angiotensina 1 na amostra para calcular a atividade da renina na amostra. Em algumas modalidades preferidas, a cromatografia líquida é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em outras modalidades, o limite de quantificação dos métodos é menor do que, ou igual a, 0,1 ng/mL; tal como menor do que, ou igual a, 0,05 ng/mL; tal como cerca de 0,03 ng/mL. Nas modalidades adicionais, os métodos

incluem gerar íons do precursor de angiotensina 1, nos quais pelo menos um dos íons do precursor tem uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e gerar um ou mais íons do fragmento de um íon do precursor de angiotensina 1 selecionados a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $619,4 \pm 0,5$ ou $647,4 \pm 0,5$. Em algumas modalidades, a incubação ocorre na presença de um inibidor de protease estável em água. Nas modalidades relacionadas preferidas, o inibidor de protease estável em água é o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila. Em algumas modalidades, a quantidade do(s) íon(s) de angiotensina 1 é relacionada à quantidade de angiotensina 1 na amostra de teste por comparação a um padrão interno. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[00012] Em um outro aspecto, proporcionam-se métodos para medir a atividade da renina em uma amostra. Os métodos incluem: (a) incubar a amostra pré-misturada com um inibidor de protease estável em água que não seja efetivo contra a renina sob as condições adequadas para a geração da angiotensina 1 pela renina na amostra; (b) purificar a angiotensina 1 por cromatografia líquida; (c) ionizar a angiotensina 1 purificada para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; (d) detectar a quantidade de um ou mais íons de angiotensina 1 por espectrometria de massa; (e) usar a quantidade de íon(s) detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na dita amostra; (f) usar a quantidade de angiotensina 1 na amostra para calcular a atividade da renina na amostra. Em algumas modalidades preferidas, a cromatografia líquida é a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Em outras modalidades, o limite de quantificação dos métodos é menor do que, ou igual a, 0,1 ng/mL; tal como menor do que, ou igual a, 0,05 ng/mL; tal como cerca de 0,03 ng/mL. Nas modalidades adicionais, os métodos incluem gerar íons do precursor de angiotensina

1, nos quais pelo menos um dos íons do precursor tem uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e gerar um ou mais íons do fragmento de um íon do precursor de angiotensina 1 a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $619,4 \pm 0,5$ ou $647,4 \pm 0,5$. Em algumas modalidades preferidas, a etapa (b) compreende a purificação da angiotensina 1 a partir da amostra com uma coluna de extração em fase sólida. Nas modalidades adicionais, o inibidor de protease estável em água é o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[00013] Em um outro aspecto, proporcionam-se métodos para medir a atividade da renina em uma amostra. Os métodos incluem: (a) incubar a amostra sob condições adequadas para a geração de angiotensina 1 pela renina na amostra; (b) purificar a angiotensina 1 na amostra por cromatografia líquida; (c) ionizar a angiotensina 1 purificada para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; (d) detectar a quantidade do(s) íon(s) de angiotensina por espectrometria de massa, em que o(s) íon(s) é(são) selecionado(s) a partir do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$, $647,4 \pm 0,5$ e $1297 \pm 0,5$; (e) usar a quantidade de íon(s) detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na dita amostra; e (f) usar a quantidade de angiotensina 1 na amostra para calcular a atividade da renina na amostra. Em algumas modalidades, o limite de quantificação dos métodos é menor do que, ou igual a, $0,1 \text{ ng/mL}$; tal como menor do que, ou igual a, $0,05 \text{ ng/mL}$; tal como cerca de $0,03 \text{ ng/mL}$. Em algumas modalidades, a incubação ocorre na presença de um inibidor de protease estável em água. Nas modalidades relacionadas preferidas, o inibidor de protease estável em água é o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila. Em algumas modalidades, a cromatografia líquida é a cromatografia líquida de alto desempenho

(HPLC). Em algumas modalidades, a etapa (b) do método adicionalmente compreende a purificação da angiotensina 1 com uma coluna de extração em fase sólida. Nas modalidades adicionais, a quantidade do(s) íon(s) de angiotensina 1 é relacionada à quantidade de angiotensina 1 na amostra de teste por comparação a um padrão interno. Em algumas modalidades, um padrão de degradação pode ser usado para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração.

[00014] Em algumas modalidades, se a PRA for menor do que 0,65 ng de angiotensina por mL por h após cerca de 3 horas de incubação, a amostra de teste pode ser incubada por um período mais longo de tempo (por exemplo, até cerca de 18 horas) para estabelecer o protocolo de geração de PRA.

[00015] As modalidades preferidas utilizam a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), sozinha ou em combinação com um ou mais métodos de purificação, por exemplo, porém não limitados a uma técnica de extração em fase sólida ou precipitação de proteína, para purificar a angiotensina 1 nas amostras.

[00016] Em certas modalidades preferidas dos métodos divulgados neste documento, a espectrometria de massa é efetuada no modo de íon positivo. Alternativamente, a espectrometria de massa pode ser efetuada no modo de íon negativo. Nas modalidades particularmente preferidas, a angiotensina 1 é medida usando o modo de íon tanto positivo quanto negativo. Em certas modalidades preferidas, a angiotensina 1 é medida usando a ionização por electrospray (ESI) ou a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) no modo positivo ou negativo.

[00017] Nas modalidades preferidas, os íons de angiotensina 1 detectáveis em um espectrômetro de massa são selecionados a partir do grupo que consiste nos íons com uma razão de massa/carga (m/z)

de $1297 \pm 0,5$, $756 \pm 0,5$, $649 \pm 0,5$, $647,4 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$, $534 \pm 0,5$, $506 \pm 0,5$, $433,0 \pm 0,5$, $343 \pm 0,5$, $255 \pm 0,5$, e $110 \pm 0,5$. Nas modalidades particularmente preferidas, os íons do precursor têm uma razão de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e os íons do fragmento têm uma razão de massa/carga de $619,4 \pm 0,5$ ou $647,4 \pm 0,5$.

[00018] Nas modalidades preferidas, uma angiotensina 1 marcada com isótopo separadamente detectável é adicionada à amostra como um padrão interno. Nestas modalidades, toda ou uma parte tanto da angiotensina 1 endógena quanto do padrão interno, presentes na amostra, é ionizada para produzir uma pluralidade de íons detectáveis em um espectrômetro de massa, e um ou mais íons produzidos a partir de cada um são detectados por espectrometria de massa. Nas modalidades relacionadas, a angiotensina 1 marcada com isótopo pode compreender as subunidades de valina, arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina prolina, ou suas combinações, marcadas com o isótopo de ^{13}C e ^{15}N . Nas modalidades preferidas adicionais, a angiotensina 1 marcada com isótopo tem a subunidade de valina onde os átomos de carbono são substituídos pelos isótopos de ^{13}C e o átomo de nitrogênio é substituído pelos isótopos de ^{15}N , resultando em um aumento na massa de 6 Da em relação à angiotensina 1 natural. Nas modalidades preferidas relacionadas, a angiotensina 1 marcada com isótopo tem as subunidades de valina e isoleucina onde os átomos de carbono são substituídos pelos isótopos de ^{13}C e os átomos de nitrogênio são substituídos pelos isótopos de ^{15}N . A massa desta angiotensina 1 marcada com isótopo é nominalmente 13 Da maior do que a angiotensina 1 natural.

[00019] Nas modalidades preferidas, a presença e/ou a quantidade do(s) íon(s) de angiotensina 1 é relacionada à presença e/ou à quantidade de angiotensina 1 na amostra de teste por comparação com o padrão interno.

[00020] Em certas modalidades preferidas dos aspectos divulgados neste documento, o limite de quantificação (LOQ) da angiotensina 1 é menor do que, ou igual a, 0,1 ng/mL; tal como menor do que, ou igual a, 0,05 ng/mL; tal como cerca de 0,03 ng/mL; e o limite superior de quantificação (ULOQ) da angiotensina 1 é maior do que, ou igual a, 100.000 fmols/mL.

[00021] Em um outro aspecto, proporcionam-se kits para um ensaio de quantificação da angiotensina 1. Os kits compreendem o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila (AEBSF) em solução de salina tamponada com fosfato, onde o dito AEBSF na solução de salina tamponada com fosfato está presente em quantidades suficientes para pelo menos um ensaio. Os kits podem adicionalmente compreender o padrão interno e o ácido maleico em quantidades suficientes para pelo menos um ensaio.

[00022] Conforme usado neste documento, salvo indicação em contrário, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem a referência plural. Assim, por exemplo, uma referência a "uma proteína" inclui uma pluralidade de moléculas de proteínas.

[00023] Conforme usado neste documento, o termo "purificação" ou "purificar" não se refere a remover todos os materiais da amostra, exceto o(s) analito(s) de interesse. Ao contrário, a purificação refere-se a um procedimento que enriquece a quantidade de um ou mais analitos de interesse em relação aos outros componentes na amostra que podem interferir com a detecção do analito de interesse. As amostras podem ser purificadas neste documento por diversos meios para permitir a remoção de uma ou mais substâncias interferentes, por exemplo, uma ou mais substâncias que interfeririam com a detecção dos íons do progenitor ou do derivado de angiotensina 1 selecionados por espectrometria de massa.

[00024] Conforme usado neste documento, o termo "amostra de teste" refere-se a qualquer amostra que possa conter angiotensinas.

Conforme usado neste documento, o termo "fluido corpóreo" significa qualquer fluido que possa ser isolado do corpo de um indivíduo. Os exemplos de fluidos corpóreos incluem o sangue, o plasma, o soro, a bile, a saliva, a urina, as lágrimas, a transpiração, e similares.

[00025] Conforme usado neste documento, o termo "cromatografia" refere-se a um processo no qual uma mistura química carregada por um líquido ou gás é separada em componentes, como resultado da distribuição diferencial das entidades químicas à medida que elas fluem em torno de, ou sobre, uma fase estacionária líquida ou sólida.

[00026] Conforme usado neste documento, o termo "cromatografia líquida" ou "LC" significa um processo de retardo seletivo de um ou mais componentes de uma solução fluida à medida que o fluido uniformemente percola através de uma coluna de uma substância finamente dividida, ou através de corredores capilares. O retardo resulta da distribuição dos componentes da mistura entre uma ou mais fases estacionárias e a grande quantidade de fluido (isto é, a fase móvel), à medida que este fluido se move em relação à(s) fase(s) estacionária(s). Os exemplos de técnicas de separação que empregam a "cromatografia líquida" incluem a cromatografia líquida de fase reversa (RPLC), a cromatografia líquida de alta desempenho (HPLC), e a cromatografia líquida de fluxo turbulento (TFLC) (algumas vezes conhecida com cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC) ou cromatografia líquida de alto rendimento). Em algumas modalidades, uma coluna de SPE pode ser usada em combinação com uma coluna de LC. Por exemplo, uma amostra pode ser purificada com uma coluna de extração de TFLC, seguida por purificação adicional com uma coluna analítica de HPLC.

[00027] Conforme usado neste documento, o termo "cromatografia líquida de alta desempenho" ou "HPLC" (algumas vezes conhecida como "cromatografia líquida de alta pressão") refere-se à cromatografia

líquida na qual o grau de separação é aumentado forçando a fase móvel sob pressão através de uma fase estacionária, tipicamente uma coluna densamente recheada.

[00028] Conforme usado neste documento, o termo "cromatografia líquida de fluxo turbulento" ou "TFLC" (algumas vezes conhecida como cromatografia líquida de alta turbulência ou cromatografia líquida de alto rendimento) refere-se a uma forma de cromatografia que utiliza o fluxo turbulento do material que está sendo testado através do recheio da coluna como a base para efetuar a separação. A TFLC tem sido aplicada na preparação de amostras contendo dois fármacos inominados antes da análise por espectrometria de massa. Vide, por exemplo, Zimmer e col., *J Chromatogr A* 854: 23-35 (1999); ver também as Patentes U.S. Nºs 5.968.367, 5.919.368, 5.795.469, e 5.772.874, que adicionalmente explicam a TFLC. As pessoas de habilidade comum na técnica entendem o "fluxo turbulento". Quando o fluido flui lenta e uniformemente, o fluxo é chamado "fluxo laminar". Por exemplo, o fluido que se move através de uma coluna de HPLC em baixas vazões é laminar. No fluxo laminar, o movimento das partículas de fluido está ordenado com as partículas que se movem geralmente em linhas retas. Nas velocidades mais rápidas, a inércia da água supera as forças de atrito do fluido e resulta o fluxo turbulento. O fluido não em contato com o limite irregular "ultrapassa" aquele que é retardado pelo atrito ou desviado por uma superfície irregular. Quando um fluido estiver fluindo turbulentamente, ele flui em remoinhos e turbilhões (ou vórtices), com mais "obstrução" do que quando o fluxo for laminar. Estão disponíveis muitas referências para auxiliar na determinação quando o fluxo do fluido é laminar ou turbulento (por exemplo, Turbulent Flow Analysis: Measurement and Prediction, P.S. Bernard e J.M. Wallace, John Wiley & Sons, Inc., (2000); An Introduction to Turbulent Flow, Jean Mathieu e Julian Scott, Cambridge University Press (2001)).

[00029] Conforme usado neste documento, o termo "extração em fase sólida" ou "SPE" refere-se a um processo no qual uma mistura química é separada em componentes como resultado da afinidade dos componentes dissolvidos ou suspensos em uma solução (por exemplo, a fase móvel) por um sólido através ou em torno do qual se passa a solução (isto é, a fase sólida). Em algumas situações, à medida que a fase móvel passa através ou em torno da fase sólida, os componentes indesejados da fase móvel podem ser retidos pela fase sólida, resultando em uma purificação do analito na fase móvel. Em outras situações, o analito pode ser retido pela fase sólida, permitindo que os componentes indesejados da fase móvel passem através ou em torno da fase sólida. Nestas situações, utiliza-se então uma segunda fase móvel para eluir o analito retido fora da fase sólida para processamento ou análise adicional. A SPE, incluindo a utilização de uma coluna de cromatografia líquida de fluxo turbulento (TFLC) como uma coluna de extração, pode operar por meio de um mecanismo de modo unitário ou misto. Os mecanismos de modo misto utilizam a troca iônica ou a retenção hidrofóbica na mesma coluna; por exemplo, a fase sólida de uma coluna de SPE de modo misto pode exibir troca aniônica e retenção hidrofóbica fortes; ou pode exibir troca catiônica e retenção hidrofóbica fortes.

[00030] Conforme usado neste documento, o termo "coluna analítica" refere-se a uma coluna de cromatografia tendo placas cromatográficas suficientes para efetuar uma separação de materiais em uma amostra que elui da coluna, suficientes para permitir uma determinação da presença ou da quantidade de um analito. Tais colunas são frequentemente distinguidas das "colunas de extração", as quais têm o propósito geral de separar ou extrair o material retido dos materiais não retidos, para obter uma amostra purificada para análise adicional. Em uma modalidade preferida, a coluna analítica contém

partículas de aproximadamente 4 μm de diâmetro.

[00031] Conforme usado neste documento, o termo "em linha" ou "na linha", por exemplo, como usado em "modo automatizado em linha" ou "extração em linha", refere-se a um procedimento efetuado sem a necessidade por intervenção do operador. Por exemplo, por seleção cuidadosa das válvulas e da tubulação do conector, as colunas de extração em fase sólida e de cromatografia líquida podem ser conectadas, conforme necessário, de modo tal que o material seja passado de uma para a seguinte, sem a necessidade por quaisquer etapas manuais. Nas modalidades preferidas, a seleção das válvulas e da tubulação é controlada por um computador pré-programado para efetuar as etapas necessárias. Mais preferivelmente, o sistema de cromatografia é também conectado em um tal modo em linha ao sistema de detector, por exemplo, um sistema de MS. Assim, um operador pode colocar uma bandeja de amostras de múltiplos poços ou múltiplos tubos em um autoamostrador e as operações restantes são efetuadas sob controle do computador, resultando na purificação e na análise de todas as amostras selecionadas. Em contraste, o termo "fora de linha", como usado neste documento, refere-se a um procedimento que requer a intervenção manual de um operador. Assim, se as amostras forem submetidas à precipitação, e os sobrenadantes forem então manualmente carregados para um autoamostrador, as etapas de precipitação e carregamento são fora de linha das etapas subsequentes. Em diversas modalidades dos métodos, podem ser efetuadas uma ou mais etapas em um modo automatizado em linha.

[00032] Conforme usado neste documento, o termo "espectrometria de massa" ou "MS" refere-se a uma técnica analítica para identificar os compostos por sua massa. A MS refere-se aos métodos de filtrar, detectar, e medir os íons com base em sua razão de massa para carga, ou "m/z". A tecnologia de MS geralmente inclui (1) ionizar os compostos

para formar compostos carregados; e (2) detectar o peso molecular dos compostos carregados e calcular uma razão de massa para carga. Os compostos podem ser ionizados e detectados por qualquer meio adequado. Um "espectrômetro de massa" geralmente inclui um ionizador e um detector de íons. Em geral, ioniza-se uma ou mais moléculas de interesse, e introduzem-se subsequentemente os íons em um instrumento espectrográfico de massa onde, devido a uma combinação de campos magnético e elétrico, os íons seguem uma trajetória no espaço que é dependente da massa ("m") e da carga ("z"). Vide, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 6.204.500, intitulada "Mass Spectrometry From Surfaces"; 6.107.623, intitulada "Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry"; 6.268.144, intitulada "DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry"; 6.124.137, intitulada "Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes"; Wright e col., *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2:264-76 (1999); e Merchant e Weinberger, *Electrophoresis* 21:1164-67 (2000).

[00033] Conforme usado neste documento, o termo "operando no modo de íon positivo" refere-se àqueles métodos de espectrometria de massa onde os íons positivos são gerados e detectados. O termo "operando no modo de íon negativo", conforme usado neste documento, refere-se àqueles métodos de espectrometria de massa onde os íons negativos são gerados e detectados.

[00034] Conforme usado neste documento, o termo "ionização" ou "ionizar" refere-se ao processo de gerar um íon de analito tendo uma carga elétrica líquida igual a uma ou mais unidades de elétrons. Os íons negativos são aqueles tendo uma carga negativa líquida de uma ou mais unidades de elétrons, enquanto os íons positivos são aqueles tendo uma carga positiva líquida de uma ou mais unidades de elétrons.

[00035] Conforme usado neste documento, o termo "ionização de

elétrons" ou "EI" refere-se aos métodos nos quais um analito de interesse em uma fase gasosa ou de vapor interage com um fluxo de elétrons. O impacto dos elétrons com o analito produz íons de analito, os quais podem então ser submetidos a uma técnica de espectrometria de massa.

[00036] Conforme usado neste documento, o termo "ionização química" ou "CI" refere-se aos métodos nos quais um gás reagente (por exemplo, a amônia) é submetido ao impacto de elétrons, e os íons de analito são formados pela interação dos íons de gás reagente e as moléculas de analito.

[00037] Conforme usado neste documento, o termo "bombardeio rápido de átomos" ou "FAB" refere-se aos métodos nos quais um feixe de átomos de alta energia (frequentemente Xe ou Ar) impacta uma amostra não volátil, dessorvendo e ionizando as moléculas contidas na amostra. As amostras de teste são dissolvidas em uma matriz de líquido viscoso, tal como glicerol, tioglicerol, álcool *m*-nitrobenzílico, éter de coroa 18-coroa-6, éter 2-nitrofeniloctílico, sulfolano, dietanolamina, e trietanolamina. A escolha de uma matriz apropriada para um composto ou amostra é um processo empírico.

[00038] Conforme usado neste documento, o termo "ionização/dessorção a laser assistida por matriz" ou "MALDI" refere-se aos métodos nos quais uma amostra não volátil é exposta à irradiação de laser, que dessorve e ioniza os analitos na amostra por diversas vias de ionização, incluindo a fotoionização, a protonação, a desprotonação, e a desintegração de aglomerados. Para a MALDI, a amostra é misturada com uma matriz absorvedora de energia, que facilita a dessorção das moléculas de analito.

[00039] Conforme usado neste documento, o termo "ionização/dessorção a laser acentuada pela superfície" ou "SELDI" refere-se a um outro método no qual uma amostra não volátil é exposta

à irradiação de laser, que desorve e ioniza os analitos na amostra por diversas vias de ionização, incluindo a fotoionização, a protonação, a desprotonação, e a desintegração de aglomerados. Para a SELDI, a amostra é tipicamente ligada a uma superfície que preferencialmente retém um ou mais analitos de interesse. Como na MALDI, este processo pode também empregar um material absorvedor de energia para facilitar a ionização.

[00040] Conforme usado neste documento, o termo "ionização por electrospray" ou "ESI" refere-se aos métodos nos quais uma solução é passada ao longo do comprimento curto de um tubo capilar, à cuja extremidade é aplicada um alto potencial elétrico positivo ou negativo. A solução que atinge a extremidade do tubo é vaporizada (nebulizada) até um jato ou spray de gotículas muito pequenas de solução em vapor de solvente. Esta névoa de gotículas flui através de uma câmara de evaporação, a qual é aquecida ligeiramente para impedir a condensação e para evaporar o solvente. À medida que as gotículas tornam-se menores, a densidade de carga superficial elétrica aumenta até um tempo tal que a repulsão natural entre cargas iguais faça com que íons, assim como moléculas neutras, sejam liberados.

[00041] Conforme usado neste documento, o termo "ionização química em pressão atmosférica" ou "APCI" refere-se aos métodos de espectroscopia de massa que são similares à ESI; entretanto, a APCI produz íons por reações entre íons-moléculas que ocorrem dentro de um plasma na pressão atmosférica. O plasma é mantido por uma descarga elétrica entre o capilar de pulverização e um contraeletrodo. Então os íons são tipicamente extraídos para o analisador de massa por utilização de uma série de estágios diferencialmente bombeados de escumadeira. Um contrafluxo de gás N₂ seco e pré-aquecido pode ser usado para melhorar a remoção do solvente. A ionização em fase de gás na APCI pode ser mais efetiva do que a ESI para analisar espécies

menos polares.

[00042] O termo "Fotoionização em Pressão Atmosférica" ou "APPI", conforme usado neste documento, refere-se à forma de espectroscopia de massa onde o mecanismo para a fotoionização da molécula M é a absorção de fótons e a ejeção de elétrons para formar o íon molecular M⁺. Porque a energia do fóton tipicamente está exatamente acima do potencial de ionização, o íon molecular é menos suscetível à dissociação. Em muitos casos, pode ser possível analisar as amostras sem a necessidade por cromatografia, assim economizando tempo e gasto significativos. Na presença de vapor de água ou solventes próticos, o íon molecular pode extrair H para forma MH⁺. Isto tende a ocorrer se M tiver uma alta afinidade por prótons. Isto não afeta a exatidão da quantificação porque a soma de M⁺ e MH⁺ é constante. Os compostos de fármacos em solventes próticos são normalmente observados como MH⁺, enquanto os compostos apolares, tais como o naftaleno ou a testosterona, normalmente formam M⁺. Vide, por exemplo, Robb e col., Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72(15)**: 3653-59 (2000).

[00043] Conforme usado neste documento, o termo "plasma indutivamente acoplado" ou "ICP" refere-se aos métodos nos quais uma amostra interage com um gás parcialmente ionizado, em uma temperatura suficientemente alta, de modo tal que a maior parte dos elementos seja atomizada e ionizada.

[00044] Conforme usado neste documento, o termo "dessorção por campo" refere-se aos métodos nos quais uma amostra de teste não volátil é colocada sobre uma superfície de ionização, e um campo elétrico intenso é usado para gerar íons de analito.

[00045] Conforme usado neste documento, o termo "dessorção" refere-se à remoção de um analito de uma superfície e/ou a entrada de

um analito em uma fase gasosa.

[00046] Conforme usado neste documento, o termo "limite de quantificação" ou "LOQ" refere-se ao ponto onde as medições se tornam quantitativamente expressivas. A resposta do analito neste LOQ é identificável, distinta e reproduzível, com uma precisão de 20% e uma exatidão de 80% a 120%. O limite superior de quantificação refere-se à faixa linear quantificável superior da resposta do analito.

[00047] Conforme usado neste documento, o termo "limite de detecção" ou "LOD" é o ponto no qual o valor medido é maior do que a incerteza associada com ele. O LOD é definido arbitrariamente como 3 desvios padrões (DP) a partir da concentração zero.

[00048] O termo "cerca de", conforme usado neste documento em referência às medições quantitativas que não incluem a medição da massa de um íon, refere-se ao valor indicado, mais ou menos 10%. Os instrumentos de espectrometria de massa podem variar ligeiramente na determinação da massa de um dado analito. O termo "cerca de", no contexto da massa de um íon ou da razão de massa/carga de um íon, refere-se a $\pm 0,5$ unidade de massa atômica.

[00049] O sumário da invenção descrita acima é não limitativo e outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da descrição detalhada da invenção a seguir, e a partir das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00050] A figura 1 mostra os espectros por varredura total da dissociação induzida por colisão para a Ang1 ($m/z = 433,0$).

[00051] A figura 2 mostra os espectros por varredura total da dissociação induzida por colisão para o padrão interno ($m/z = 434,8$).

[00052] A figura 3 mostra uma curva de calibração ilustrativa para a detecção espectrométrica de massa da Ang1.

[00053] As figuras 4 A, B, e C mostram os cromatogramas de massa

ilustrativos da Ang1 ($m/z = 433,0 \pm 0,5$), do padrão interno ($m/z = 434,8 \pm 0,5$), e do padrão de degradação ($m/z = 437,3 \pm 0,5$), respectivamente, para um calibrador de baixa concentração.

[00054] As figuras 5 A, B, e C mostram os cromatogramas de massa ilustrativos da Ang1 ($m/z = 433,0 \pm 0,5$), do padrão interno ($m/z = 434,8 \pm 0,5$), e do padrão de degradação ($m/z = 437,3 \pm 0,5$), respectivamente, para uma amostra do paciente demonstrando 0,1 ng/mL/h.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00055] Descrevem-se métodos para medir a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra. Mais especificamente, descrevem-se métodos para detectar e quantificar a angiotensina 1 relacionada à atividade da renina em uma amostra de plasma. Os métodos utilizam a cromatografia líquida (LC), mais preferivelmente a HPLC, para efetuar uma purificação dos analitos selecionados, e combinar esta purificação com os métodos únicos de espectrometria de massa (MS), com isso proporcionando um sistema de ensaio de alto rendimento para detectar e quantificar a angiotensina 1 em uma amostra de teste. As modalidades preferidas são particularmente bem adequadas para a aplicação em grandes laboratórios clínicos para o ensaio da PRA automatizado. Os métodos proporcionados têm sensibilidade aumentada e são efetuados em menos tempo e com menos preparação da amostra do que requerido em outros ensaios de PRA.

[00056] As amostras de teste adequadas incluem qualquer amostra de teste que possa conter o analito de interesse. Em algumas modalidades preferidas, uma amostra é uma amostra biológica; ou seja, uma amostra obtida a partir de qualquer fonte biológica, tal como um animal, uma cultura de células, uma cultura de órgãos, etc. Em certas modalidades preferidas, as amostras são obtidas a partir de um animal mamífero, tal como um cão, gato, cavalo, etc. Os animais mamíferos particularmente preferidos são os primatas, mais preferivelmente os

seres humanos machos ou fêmeos. As amostras particularmente preferidas incluem o sangue, o plasma, o soro, a saliva, o fluido cerebrospinal, ou outra amostra de tecido. Tais amostras podem ser obtidas, por exemplo, a partir de um paciente; ou seja, uma pessoa viva, homem ou mulher, apresentando-se em um ambiente clínico para a diagnose, a prognose, ou o tratamento de uma doença ou condição. A amostra de teste é preferivelmente obtida a partir de um paciente, por exemplo, o soro sanguíneo ou o plasma. Para evitar a criação irreversível da pró-renina no plasma, as amostras devem ser processadas imediatamente na temperatura ambiente ou armazenadas completamente congeladas e rapidamente descongeladas exatamente antes do uso.

[00057] Podem ser usadas diversas condições de incubação para facilitar a preparação e a geração da angiotensina 1 pela renina antes da análise da amostra por cromatografia e/ou MS, de modo que a análise possa ser automatizada. A presente invenção incorpora uma única adição de um coquetel de reagentes, adequado para efetuar a geração da angiotensina 1. O coquetel de reagentes é feito pré-misturando todos os reagentes em uma etapa simples. Esta única geração de um coquetel de reagentes é atingida substituindo o inibidor de enzima sensível à água utilizado, por exemplo, o fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), por um estável em água, por exemplo, o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila (AEBSF). Isto é especialmente útil na automação para uma grande quantidade de amostra porque a configuração de ensaio intensiva em mão de obra requer a mistura dos reagentes à base de água e um inibidor de enzima sensível à água, por exemplo, o PMSF. Esta adição sequencial requer agitação vigorosa entre cada etapa para assegurar a homogeneidade na solução de reagentes antes da incubação. Além disso, o PMSF deve ser preparado recentemente porque o PMSF é instável em meios aquosos. O AEBSF

tem o benefício adicional de ser muito menos tóxico do que o PMSF. De acordo com a presente invenção, o coquetel de reagentes compreendendo o AEBSF estável em água tem um perfil de estabilidade longo, inesperado, comparado a uma solução de estoque de PMSF. O coquetel de reagentes contendo o AEBSF pode ser armazenado a -20° C por até aproximadamente 6 meses ou na temperatura ambiente por aproximadamente uma semana.

[00058] A presente invenção contempla os kits para um ensaio de quantificação da angiotensina 1. Um kit para um ensaio de quantificação da angiotensina 1 da presente invenção pode incluir um kit compreendendo o AEBSF em solução de salina tamponada com fosfato, em quantidades suficientes para pelo menos um ensaio. Os kits contemplados pela presente invenção podem também compreender o padrão interno marcado com isótopo e o ácido maleico. Se for desejada a inclusão de um padrão de degradação nos kits, pode ser incluído um tampão de geração que compreende o ácido maleico, o AEBSF e o padrão de degradação. Tipicamente, os kits também incluirão instruções registradas em uma forma tangível (por exemplo, contidas sobre papel ou um meio eletrônico) quanto à utilização das soluções acondicionadas para uso em um ensaio de medição, para determinar a quantidade de angiotensina 1.

[00059] A calibração e as misturas de QC foram preparadas usando soro falso consistindo em solução salina tamponada com fosfato, suplementada com soro albumina bovina a 45 mg/mL. Nenhuma fonte de plasma humano ou não humano ou soro limpo foi identificado que não contivesse quantidades mensuráveis de angiotensina 1.

[00060] Tipicamente, as amostras congeladas de plasma e os controles são descongelados rapidamente para impedir a crioativação da pró-renina em renina, antes da incubação. A amostra é incubada a 37° C por até cerca de 3 h. Se a amostra resultante não produzir uma

medição da PRA satisfatória, o tempo de incubação pode ser prolongado até cerca de 18 h. As amostras são então congeladas (por exemplo, levadas até uma temperatura de cerca de -20° C) para interromper a incubação e armazenadas neste estado até a análise. De acordo com a presente invenção, a renina no plasma pode ser incubada a 37° C $\pm$ 1° com o substrato de renina endógena (angiotensinogênio), em pH 5,7, por cerca de 1 a 2 horas, na presença de enzima conversora, padrão de degradação (angiotensina 1 com valina e isoleucina marcada com isótopo) e inibidores de angiotensinase (EDTA e AEBSF).

[00061] Após a conclusão da incubação, as amostras podem ser submetidas à extração de líquido-líquido ou à extração em fase sólida antes da purificação por LC. Na presente invenção, a extração da angiotensina 1 é adaptada utilizando uma coluna de extração em fase sólida, acoplada (em linha ou fora de linha) a HPLC. De acordo com as modalidades preferidas, o método envolve adicionar o ácido fórmico a cada amostra, após a incubação, e carregar as amostras diretamente para a coluna de extração em fase sólida acoplada a HPLC-espectrômetro de massa.

[00062] A cromatografia líquida (LC), que inclui a cromatografia líquida de alta desempenho (HPLC), vale-se da tecnologia de fluxo laminar, relativamente lento. A análise tradicional por HPLC vale-se do acondicionamento da coluna, em que o fluxo laminar da amostra através da coluna é a base para a separação do analito de interesse da amostra. O técnico versado entenderá que a separação em tais colunas é um processo de difusão e pode selecionar os instrumentos e as colunas de HPLC que forem adequados para uso com a angiotensina 1. A coluna cromatográfica tipicamente inclui um meio (isto é, um material de acondicionamento) para facilitar a separação das porções químicas (isto é, fracionamento). O meio pode incluir partículas minúsculas. As partículas incluem uma superfície ligada que interage com as diversas

porções químicas para facilitar a separação das porções químicas. Uma superfície ligada adequada é uma superfície ligada hidrofóbica, tal como uma superfície de alquila ligada. As superfícies de alquilas ligadas podem incluir grupos alquila ligados de C-4, C-8, C-12, ou C-18, preferivelmente grupos ligados de C-8 ou C-18. A coluna cromatográfica inclui uma abertura de entrada para receber uma amostra direta ou indiretamente da coluna de SPE e uma abertura de saída para descarregar um efluente que inclui a amostra fracionada. Em uma modalidade, a amostra (ou a amostra pré-purificada) pode ser aplicada à coluna na abertura de entrada, eluída com um solvente ou uma mistura de solventes, e descarregada na abertura de saída. Podem ser selecionados diferentes modos de solventes para eluir o(s) analito(s) de interesse. Por exemplo, a cromatografia líquida pode ser efetuada usando um modo de gradiente, um modo isocrático, ou um modo polítipo (isto é, misto). Durante a cromatografia, a separação dos materiais é efetuada por variáveis tais como a escolha do eluente (também conhecido como uma "fase móvel"), o modo de eluição, as condições do gradiente, a temperatura, etc.

[00063] Em certas modalidades, um analito pode ser purificado por aplicação de uma amostra a uma coluna, sob condições onde o analito de interesse seja reversivelmente retido pelo material de acondicionamento da coluna, enquanto um ou mais outros materiais não sejam retidos. Nestas modalidades, pode ser empregada uma primeira condição da fase móvel, onde o analito de interesse é retido pela coluna, e pode subsequentemente ser empregada uma segunda condição da fase móvel para remover o material retido da coluna, logo que os materiais não retidos forem lavados completamente. Alternativamente, um analito pode ser purificado por aplicação de uma amostra a uma coluna, sob as condições da fase móvel onde o analito de interesse elui em uma taxa diferencial em comparação com um ou mais outros

materiais. Tais procedimentos podem enriquecer a quantidade de um ou mais analitos de interesse em relação a um ou mais outros componentes da amostra.

[00064] Em uma outra modalidade, a coluna de extração em fase sólida (SPE) pode ser empregada antes da HPLC em um sistema cromatográfico de coluna hidrofóbico. Em certas modalidades preferidas, uma coluna compreendendo os absorventes poliméricos pode ser acoplada em linha com um sistema de HPLC. Em certas modalidades preferidas, a purificação da amostra com uma coluna de SPE e a HPLC é efetuada usando o ácido fórmico a 0,1% em água Grau Ultra Puro para HPLC e o ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila como as fases móveis. De preferência, a coluna de SPE usada nestas modalidades é capaz de recuperar mais do que 80% da angiotensina do plasma.

[00065] Por seleção cuidadosa das válvulas e da tubulação do conector, uma ou mais colunas de extração em fase sólida e cromatográficas podem ser conectadas, conforme necessário, de modo tal que o material seja passado de uma para a seguinte, sem a necessidade por quaisquer etapas manuais. Nas modalidades preferidas, a seleção das válvulas e da tubulação é controlada por um computador pré-programado para efetuar as etapas necessárias. Mais preferivelmente, o sistema de cromatografia é também conectado em um tal modo em linha ao sistema de detector, por exemplo, um sistema de MS. Assim, um operador pode colocar uma bandeja de amostras em um autoamostrador, e as operações restantes são efetuadas sob controle do computador, resultando na purificação e na análise de todas as amostras selecionadas.

[00066] A espectrometria de massa é efetuada usando um espectrômetro de massa, o qual inclui uma fonte de íons para ionizar a amostra fracionada e criar moléculas carregadas para a análise

adicional. Em diversas modalidades, a angiotensina 1 presente em uma amostra de teste pode ser ionizada por qualquer método conhecido para o técnico versado. Por exemplo, a ionização da amostra pode ser efetuada por ionização por elétrons, ionização química, ionização por electrospray (ESI), ionização por fótons, ionização química em pressão atmosférica (APCI), fotoionização, fotoionização em pressão atmosférica (APPI), bombardeio rápido de átomos (FAB), ionização secundária líquida (LSI), ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização por campo, dessorção por campo, ionização por termospray/plasmaspray, ionização/dessorção a laser acentuada pela superfície (SELDI), plasma indutivamente acoplado (ICP) e ionização de feixes de partículas. O técnico versado entenderá que a escolha do método de ionização pode ser determinada com base no analito a ser medido, tipo de amostra, no tipo de detector, uma escolha do modo positivo *versus* negativo, etc.

[00067] Nas modalidades preferidas, a angiotensina 1 pode ser ionizada através de ionização por electrospray (ESI) ou ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Nas modalidades preferidas adicionais, a angiotensina 1 é ionizada através de ionização por electrospray aquecida (HESI) no modo positivo.

[00068] Após a amostra ter sido ionizada, os íons positivamente carregados ou negativamente carregados com isso criados podem ser analisados para determinar uma razão de massa para carga. Os analisadores adequados para determinar as razões de massa para carga incluem os analisadores triplos quadrupolos, analisadores quadrupolos, analisadores de capturas de íons ("íons traps"), analisadores de transformada de fourier, analisadores orbitrap e analisadores de tempo de voo. Os íons podem ser detectados usando diversos modos de detecção. Por exemplo, os íons selecionados podem ser detectados usando um modo de varredura, por exemplo, o

monitoramento da reação de modo altamente seletivo (H-SRM), o monitoramento da reação múltiplo (MRM) ou o monitoramento da reação selecionado (SRM), ou alternativamente, os íons podem ser detectados usando um modo de monitoramento de íon seletivo (SIM). De preferência, a razão de massa para carga é determinada usando um analisador triplo quadrupolo. Por exemplo, em um instrumento "quadrupolo" ou "quadrupolo de captura de íons", os íons em um campo de radiofrequência oscilante experimentam uma força proporcional ao potencial de CC aplicado entre os eletrodos, a amplitude do sinal de RF, e a razão de massa/carga. A voltagem e a amplitude podem ser selecionadas de modo que somente os íons tendo uma razão de massa/carga particular percorram o comprimento do quadrupolo, enquanto todos os outros íons são desviados. Assim, os instrumentos quadrupolos podem atuar tanto como um "filtro de massa" quanto como um "detector de massa" para os íons injetados no instrumento. Uma série linear de três quadrupolos é conhecida como um espectrômetro de massa triplo quadrupolo. O primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) quadrupolos atuam como filtros de massa, e o quadrupolo do meio (Q2) é empregado como uma célula de colisão. Esta célula de colisão é um quadrupolo somente de RF (sem filtração da massa) que utiliza gás He, Ar, ou N ($\sim 133,3224$ kPa (10^3 Torr), ~ 30 eV) para induzir a dissociação por colisão do(s) íon(s) do progenitor selecionado(s) a partir de Q1. Os fragmentos subsequentes são passados através do Q3, onde eles podem ser filtrados e escaneados completamente.

[00069] Pode-se aumentar a seletividade da técnica de MS empregando a "espectrometria de massa em tandem" ou "MS-MS". Nesta técnica, um íon do precursor (também chamado íon do progenitor) gerado a partir de uma molécula de interesse pode ser filtrado em um instrumento de MS, e o íon do precursor é subsequentemente fragmentado para produzir um ou mais íons do

fragmento (também chamados íons do derivado ou íons do produto), que são então analisados em um segundo procedimento de MS. Por seleção cuidadosa dos íons do precursor, somente os íons produzidos por certos analitos são passados para a câmara de fragmentação, onde as colisões com os átomos de um gás inerte produzem os íons do fragmento. Porque os íons tanto do precursor quanto do fragmento são produzidos em um modo reproduzível, sob um dado conjunto de condições de ionização/fragmentação, a técnica de MS/MS pode proporcionar uma ferramenta analítica extremamente poderosa. Por exemplo, a combinação de filtração/fragmentação pode ser usada para eliminar substâncias interferentes, e pode ser particularmente útil em amostras complexas, tais como as amostras biológicas.

[00070] O espectrômetro de massa tipicamente provê o usuário com uma varredura de íons; ou seja, a abundância relativa de cada íon com uma massa/carga particular sobre uma dada faixa (por exemplo, 100 a 1000 amu). Os resultados de um ensaio do analito, ou seja, um espectro de massa, podem ser relacionados à quantidade do analito na amostra original por diversos métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, supondo que os parâmetros de amostragem e análise estão cuidadosamente controlados, a abundância relativa de um dado íon pode ser comparada com uma tabela que converte esta abundância relativa em uma quantidade absoluta da molécula original. Alternativamente, os padrões moleculares podem ser corridos com as amostras, e uma curva padrão construída com base nos íons gerados a partir destes padrões. Usando tal curva padrão, a abundância relativa de um dado íon pode ser convertida em uma quantidade absoluta da molécula original. Em certas modalidades preferidas, um padrão interno é usado para gerar uma curva padrão para calcular a quantidade de angiotensina 1. Os métodos de gerar e utilizar tais curvas padrões são bastante conhecidos na técnica e alguém de habilidade comum é capaz

de selecionar um padrão interno apropriado. Por exemplo, uma angiotensina 1 marcada com isótopo pode ser usada como um padrão interno; em certas modalidades preferidas, o padrão é a angiotensina 1 marcada com isótopo onde a subunidade de valina tenha sido totalmente substituída pela valina onde os átomos de carbono tenham sido substituídos com os isótopos de ^{13}C e os átomos de nitrogênio tenham sido substituídos com os isótopos de ^{15}N . Diversos outros métodos para relacionar a quantidade de um íon à quantidade da molécula original serão bem conhecidos para aqueles de habilidade comum na técnica.

[00071] Em certas modalidades, tais como a MS/MS, onde os íons do precursor são isolados para fragmentação adicional, a dissociação com ativação por colisão é frequentemente utilizada para gerar os íons do fragmento para uma detecção adicional. Na CAD, os íons do precursor ganham energia através das colisões com um gás inerte, e subsequentemente fragmentam por um processo referido como "decomposição unimolecular". Deve ser depositada energia suficiente no íon do precursor de modo que certas ligações dentro do íon possam ser rompidas devido à energia vibracional aumentada.

[00072] Nas modalidades particularmente preferidas, a angiotensina 1 é quantificada usando a MS/MS como se segue. As amostras são submetidas à cromatografia líquida, preferivelmente uma coluna de extração em fase sólida seguida pela HPLC, o fluxo de solvente líquido a partir da coluna cromatográfica entra na interface do nebulizador aquecido de um analisador de MS/MS e a mistura de solvente/analito é convertida em vapor na tubulação aquecida da interface. O analito (por exemplo, a angiotensina 1), contido no solvente nebulizado, é ionizado pela agulha de descarga corona da interface, que aplica uma grande voltagem à mistura de solvente nebulizado/analito. Os íons, por exemplo, os íons do precursor, passam através do orifício do

instrumento e entram no primeiro quadrupolo. Os quadrupolos 1 e 3 (Q1 e Q3) são filtros de massa, que permitem a seleção dos íons (isto é, íons "do precursor" e "do fragmento") com base em sua razão de massa para carga (m/z). O quadrupolo 2 (Q2) é a célula de colisão, onde os íons são fragmentados. O primeiro quadrupolo do espectrômetro de massa (Q1) seleciona as moléculas com as razões de massa para carga de angiotensina 1. Os íons do precursor com as razões de massa/carga corretas da angiotensina 1 são deixados passar para a câmara de colisão (Q2), enquanto que os íons indesejados com qualquer outra razão de massa/carga colidem com os lados do quadrupolo e são eliminados. Os íons do precursor que entram em Q2 colidem com as moléculas de gás de colisão neutras, por exemplo, as moléculas de gás argônio, e fragmentam. Este processo é chamado dissociação ativada por colisão (CAD). Os íons do fragmento gerados são passados para o quadrupolo 3 (Q3), onde os íons do fragmento de angiotensina 1 são selecionados, enquanto os outros íons são eliminados.

[00073] Os métodos podem envolver a MS/MS efetuada no modo de íon positivo ou negativo. Usando métodos padrões bastante conhecidos na técnica, alguém de habilidade comum é capaz de identificar um ou mais íons do fragmento de um íon do precursor particular de angiotensina 1 que possam ser usados para a seleção no quadrupolo 3 (Q3).

[00074] À medida que os íons colidem com o detector, eles produzem um pulso de elétrons que é convertido em um sinal digital. O dado adquirido é retransmitido para um computador, o qual representa graficamente as contagens dos íons coletados versus o tempo. Os cromatogramas de massa resultantes são similares aos cromatogramas gerados nos métodos de HPLC tradicionais. As áreas sob os picos correspondendo a íons particulares, ou a amplitude de tais picos, são medidas, e a área ou a amplitude é correlacionada à quantidade do

analito (angiotensina 1) de interesse. Em certas modalidades, a área sob as curvas, ou a amplitude dos picos, para o(s) íon(s) do fragmento e/ou os íons do precursor são medidas para determinar a quantidade de angiotensina 1. Conforme descrito acima, a abundância relativa de um dado íon pode ser convertida em uma quantidade absoluta do analito original, por exemplo, a angiotensina 1, usando curvas padrões de calibração baseadas em picos de um ou mais íons de um padrão molecular interno, tal como a angiotensina 1 marcada com isótopo.

[00075] Estes dados podem ser retransmitidos para um computador, o qual gera gráficos de contagem de íons versus tempo. As áreas sob os picos são determinadas e as curvas de calibração são construídas representando graficamente a concentração do padrão versus a razão das áreas sob os picos de Ang1/padrão interno. Usando as curvas de calibração, determina-se a quantidade de angiotensina 1 e padrões internos selecionados na amostra. A taxa de formação da angiotensina 1 durante um dado tempo, isto é, a quantidade de angiotensina 1 formada durante a incubação da amostra, pode ser calculada a partir destas determinações. Esta taxa é uma indicação da atividade da renina na amostra.

[00076] O processo básico de reduzir os dados pode ser efetuado manualmente ou com o auxílio de software de computador. A diluição do plasma e o tempo de geração são levados em consideração na determinação do valor final de PRA de acordo com o seguinte cálculo:

$$\frac{x \text{ uL de plasma} + y \text{ uL de tampão}}{x \text{ uL de plasma}} \cdot \frac{1}{z \text{ horas}} = f$$

em que x é o volume da amostra de plasma; y é o volume de tampão adicionado e z é o tempo para a incubação da amostra.

[00077] O resultado a partir de LCquan descrito como ng/mL é então multiplicado por f para dar uma medida corrigida para o ensaio de PRA em ng por mL por h. Se a amostra tiver sido diluída para levar o

resultado final para a faixa linear do ensaio, o resultado final é também multiplicado pelo grau de diluição.

[00078] Algumas amostras de plasma conservam um alto grau de atividade que degrada a angiotensina 1 após a sua geração. Em algumas modalidades, pode ser usado um padrão de degradação para determinar o grau de degradação da angiotensina 1 após a sua geração. Nestas modalidades, o padrão de degradação é adicionado à amostra antes da incubação. Um padrão interno é adicionado após a incubação, porém antes da análise espectrométrica de massa. O grau de degradação pode ser determinado por comparação da quantidade observada de padrão de degradação com a quantidade observada de padrão interno. O padrão de degradação pode ser um peptídeo sintético, o qual incorpora um ou mais aminoácidos marcados com ^{13}C e/ou ^{15}N , que, quando ionizado, produz pelo menos um íon com uma m/z diferente dos íons produzidos por ionização da angiotensina 1 não marcada e do padrão interno. O cálculo de um fator de degradação em tais modalidades requer consideração adicional. A porcentagem de degradação pode ser calculada como se segue.

[00079] Primeiro, a razão da linha de base (BR) é calculada calculando-se a razão da área média de padrão de degradação (DS) para padrão interno analítico (IS) para as três amostras Bio-Rad QC:

$$\frac{\text{DS pequena}}{\text{IS pequena}} + \frac{\text{DS média}}{\text{IS média}} + \frac{\text{DS grande}}{\text{IS grande}} \times \frac{1}{3} = \text{razão da linha de base (BR)}$$

[00080] Então, a % de degradação para cada amostra de paciente é calculada:

$$\frac{\text{DS}}{\text{IS}} \times \frac{1}{\text{BR}} \times 100 = \% \text{ de degradação}$$

[00081] Os exemplos a seguir servem para ilustrar a invenção. Estes exemplos não são de modo algum pretendidos para limitar o escopo dos métodos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação das Amostras e dos Reagentes

[00082] Reagentes: A angiotensina 1, o fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila (AEBSF), a soro albumina bovina (sem protease), o anidrido maleico, os comprimidos de solução salina tamponada com fosfato (comprimidos de PBS), o ácido fórmico, e os controles Bio-Rad Lyphocheck foram adquiridos de seus respectivos fornecedores. Os padrões de Ang1 marcada com isótopo foram sintetizados sob encomenda. O padrão interno era a Ang1 marcada com um único isótipo onde a valina natural é totalmente substituída pela valina contendo átomos de ^{13}C e ^{15}N , resultando em uma diferença de massa de +6 Da. Similarmente, o padrão de degradação usado no ensaio era a Ang1 marcada com isótopo duplo onde a valina e a isoleucina naturais são totalmente substituídas pela valina e pela isoleucina contendo os átomos de ^{13}C e ^{15}N , resultando em uma diferença de massa de +13 Da.

[00083] O padrão interno analítico (incluindo o padrão de degradação) pode ser um peptídeo sintético que incorpore um ou mais aminoácidos marcados com ^{13}C e/ou ^{15}N . A sequência primária do padrão interno usado neste exemplo é a Ang1 com valina marcada com isótopo, DR[V ^{15}N , ^{13}C]YIHPFHL. A síntese foi efetuada na escala de 2-5 mg, com uma especificação de pureza final de >95%. O peptídeo foi acondicionado em alíquotas individuais, com um teor de peptídeo total de mols2 nmols por frasco pequeno. Além disso, foi preparado um padrão de degradação com Ang1 com valina e isoleucina marcadas com isótopo, isto é, DR[V ^{15}N , ^{13}C]Y[I ^{15}N , ^{13}C]HPFHL. A síntese foi efetuada na escala de 2-5 mg, com uma especificação de pureza final de >95%. O peptídeo foi acondicionado em alíquotas individuais, com um teor de peptídeo total de mols2 nmols por frasco pequeno.

[00084] A água deionizada duplamente destilada e o metanol grau HPLC e a acetonitrila foram usados por toda a investigação. O soro falso

foi preparado de acordo com o seguinte procedimento. Primeiro, 300 mL de água foram adicionados a um cilindro graduado juntamente com dois comprimidos de PBS. Então, 22,5 g de soro albumina bovina foram adicionados e completamente misturados. A seguir, 0,02 g de AEBSF foi adicionado e completamente misturado. Finalmente, foi adicionada água suficiente para atingir um volume final de 500 mL.

[00085] A preparação do coquetel de geração, isto é, a solução de incubação, é dependente do número de amostras em um dado arranjo do ensaio. Os volumes indicados na Tabela 1 (abaixo) incluem um excesso de 20% para assegurar volume suficiente para a transferência. O ácido maleico, o AEBSF, e o padrão de degradação (por exemplo, DR[V¹⁵N, ¹³C]Y[I¹⁵N, ¹³C]HPFHL) foram misturados em um tubo de PP de 15 mL.

Tabela 1. Volumes úteis para a preparação dos coquetéis de geração.

Nº de amostras	Ácido maleico	Estoque de AEBSF	Padrão de degradação
150	4,75 mL	250 uL	22 uL
225	7,13 mL	375 uL	33 uL
300	9,5 mL	500 uL	44 uL

[00086] A solução de estoque de AEBSF foi avaliada quanto à sua estabilidade. 0,91 grama de pó de AEBSF foi colocado em um tubo de 15 mL da Corning e dissolvido com 10 mL de solvente de peptídeo. Alíquotas de 0,5 mL desta solução foram colocadas em criofrascos Nunc de 1,5 mL. Armazenada neste modo, a solução foi verificada ser estável por até cerca de 6 meses quando armazenada a -20°C, ou por cerca de uma semana quando armazenada na temperatura ambiente.

Exemplo 2: Calibradores e Controles

[00087] Os calibradores foram preparados por introdução de quantidades conhecidas de angiotensina 1 na matriz usando soro falso. A concentração da série de calibração era 0,0 (branco), 0,14, 0,27, 1,1,

2,19, 8,79, 35,15, e 43,2 ng/mL. As misturas de QC foram preparadas a 1,1, 8,7, e 35 ng/mL. Os controles foram obtidos da BioRAAd e consistiam em amostras com atividade da renina alta, intermediária, e baixa. As misturas de QC e os calibradores foram corridos com cada batelada de amostra para a garantia de qualidade.

Exemplo 3: Preparação das amostras para a geração

[00088] As amostras congeladas foram rapidamente levadas para a temperatura ambiente usando um ventilador ou banho-maria na temperatura ambiente. As amostras foram intermitentemente invertidas para acelerar o processo de descongelamento, visto que o descongelamento rápido é crítico para impedir a crioativação da pró-renina em renina. As amostras foram deixadas permanecer na temperatura ambiente logo que descongeladas. Todas as amostras de plasmas foram redemoinhadas completamente antes do teste.

Exemplo 4: Procedimento de incubação

[00089] 250 uL de plasma de EDTA foram misturados com 25 uL de coquetel de geração (Ácido maleico a 0,275 M, AEBSF a 1 mM, padrão de degradação a 4 uM). As amostras foram incubadas em torno de 37 graus por cerca de 1-3 horas e subsequentemente misturadas com um volume aproximadamente igual de ácido fórmico a 10% contendo padrão interno analítico a 2 uM.

Exemplo 5: Purificação da Angiotensina 1 a partir da amostra de teste

[00090] Todas as etapas cromatográficas foram realizadas usando um sistema de quatro canais Cohesive TLX.

[00091] 100 uL de amostra acidificada foram injetados sobre um cartucho de extração HLB a 25 uM de 2,1 mm x 20 mm, usando um solvente A (0,1% de Ácido fórmico em água). O cartucho de extração foi eluído usando 100 uL de uma mistura a 80:20 de solvente A (0,1% de Ácido fórmico em água) e solvente B (0,1% de Ácido fórmico em

acetonitrila). O eluato foi misturado em uma razão de 1:3 com o solvente A e dirigido para uma coluna analítica Xbridge 130 BEH a 5 μ M de 2,1 mm x 50 mm. Após a transferência do analito para a coluna analítica, foi desenvolvido um gradiente de 95% de A até 65% de solvente A. No tempo apropriado durante o gradiente, o fluxo foi desviado dos resíduos e dirigido para o espectrômetro de massa. Tanto o cartucho de extração quanto a coluna analítica foram limpos e equilibrados novamente in situ antes da próxima injeção.

Exemplo 6: Detecção e Quantificação da Angiotensina 1 por MS/MS

[00092] A MS/MS foi efetuada usando o TSQ Quantum Ultra com uma fonte de HESI (Ionização por Electrospray Aquecida) no modo de íon positivo. O monitoramento da reação selecionado foi usado para a análise quantitativa do analito e dos padrões internos. Seis transições foram monitoradas, duas para cada um de analito, padrão interno analítico, e padrão de degradação. As razões das áreas sob os picos entre o analito e o padrão interno foram calibradas contra uma série de estoques de angiotensina 1 conhecidos, e as curvas de calibração foram então construídas usando uma regressão linear ponderada $1/x$. Os parâmetros da MS/MS selecionados são listados na Tabela 2, abaixo:

Tabela 2. Parâmetros da MS/MS selecionados.

Voltagem de ionização	3000 V
Temperatura do Vaporizador	300 °C
Gás de Revestimento	30 unidades
Pressão do Gás de Varredura do Íon	0
Pressão do Gás Auxiliar	30 unidades
Temperatura do Tubo Capilar	350 °C
Compensação da Lente do Tubo	110
Compensação da Escumadeira	0 a -5 V
Pressão de Colisão	199,9836 mPa (1,5 mTorr)

Energia de Colisão	16 V (433 → 619)
	22 V (433 → 647)

[00093] Os íons passaram para o primeiro quadrupolo (Q1), que foi ajustado para selecionar os íons com uma razão de massa para carga de $433,0 \pm 0,5$ m/z $[M+3H]^{3+}$. Os íons que entraram no quadrupolo 2 (Q2) colidiram com o gás argônio para gerar os fragmentos dos íons, que foram passados para o quadrupolo 3 (Q3) para uma seleção adicional. Simultaneamente, o mesmo processo usando a espectrometria de massa com diluição isotópica foi realizado com um padrão interno de angiotensina 1 marcada com isótopo ou um padrão de degradação de angiotensina 1 marcada com isótopo. As transições de massa a seguir foram usadas para a detecção e a quantificação durante a validação sobre a polaridade positiva.

Tabela 3: Transições de Massa para a angiotensina 1 (Polaridade Positiva)

Analito	Íon do Precursor (m/z)	Íons Produtos (m/z)
Angiotensina 1	$433,0 \pm 0,5$ $[M+3H]^{3+}$	$647,4 \pm 0,5$, $619,4 \pm 0,5$
Padrão Interno (DR[V ¹⁵ N, ¹³ C]YIHPFHL)	$434,8 \pm 0,5$ $[M+3H]^{3+}$	$653,4 \pm 0,5$, $625,5 \pm 0,5$
Padrão de Degradação (DR[V ¹⁵ N, ¹³ C]Y[I ¹⁵ N, ¹³ C]HPFHL)	$437,3 \pm 0,5$ $[M+3H]^{3+}$	$660,4 \pm 0,5$, $631,4 \pm 0,5$

[00094] Estes dados foram retransmitidos para um computador, o qual gerou gráficos de contagem de íons versus tempo. As áreas sob os picos foram determinadas e as curvas de calibração foram construídas representando graficamente a concentração do padrão

versus a razão das áreas sob os picos de analito/padrão interno. Usando as curvas de calibração, as concentrações da angiotensina 1 e dos padrões internos selecionados foram quantificadas para as amostras. Uma curva de calibração ilustrativa é mostrada na figura 3. Os cromatogramas de massa ilustrativos da Ang1 ($m/z = 433,0 \pm 0,5$), do padrão interno ($m/z = 434,8 \pm 0,5$), e do padrão de degradação ($m/z = 437,3 \pm 0,5$), respectivamente, para um calibrador de baixa concentração são mostrados nas figuras 4 A, B, e C. Similarmente, as figuras 5 A, B, e C mostram os cromatogramas de massa ilustrativos da Ang1 ($m/z = 433,0 \pm 0,5$), do padrão interno ($m/z = 434,8 \pm 0,5$), e do padrão de degradação ($m/z = 437,3 \pm 0,5$), respectivamente, para uma amostra do paciente demonstrando 0,1 ng/mL/h de PRA.

Exemplo 7: Precisão e Exatidão Dentro do Ensaio e Entre o Ensaio

[00095] Oito alíquotas de cada uma das três misturas de QC foram analisadas em um único ensaio para determinar a reprodutibilidade (CV) de uma amostra dentro de um ensaio. Os valores a seguir foram determinados:

Tabela 4. Variação Entre e Dentro do Ensaio

	QC <i>baixo</i> (1,1 ng/mL)	QC <i>médio</i> (8,7 ng/mL)	QC <i>alto</i> (35 ng/mL)
<i>Entre o Ensaio</i>	6,04 %	6,96 %	5,64 %
<i>Dentro do Ensaio</i>	6,18 %	5,14 %	5,09 %

Exemplo 8: Sensibilidade Analítica: Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

[00096] O limite de detecção (LOD) é o ponto no qual um valor medido é maior do que a sua incerteza associada. O padrão zero de angiotensina 1 foi corrido em 17 réplicas e as razões das áreas resultantes foram calculadas de novo até uma concentração baseada

nos calibradores para determinar o limite de detecção do ensaio. O limite de detecção (LOD) para o ensaio com a angiotensina 1 foi 30 fmols/mL.

[00097] Para determinar o limite de quantificação (LOQ) com uma precisão de 20% e uma exatidão de 80% a 120%, cinco amostras diferentes, em concentrações próximas ao LOQ esperado, foram testadas e a reprodutibilidade determinada para cada uma. O LOQ para o ensaio com a angiotensina 1 foi definido em 0,03 ng/mL.

Exemplo 9: Faixa Descritível e Linearidade no Ensaio

[00098] Para estabelecer a linearidade da detecção da angiotensina 1 no ensaio, um branco designado como padrão zero e 8 amostras de soro artificiais fixas (calibradores) foram preparados e analisados em 5 dias separados. Uma regressão linear ponderada (1/x) a partir de cinco corridas consecutivas rendeu a correlação do coeficiente de 0,995 ou maior, com uma exatidão de $\pm 20\%$, revelando uma faixa linear quantificável de 77 a 100.000 fmols/mL.

Exemplo 10: Cálculos da Atividade da Renina no Plasma para uma Incubação por 3 Horas

[00099] O processo básico de reduzir os dados foi efetuado para uma incubação por 3 horas. A diluição do plasma e o tempo de geração foram levados em consideração na determinação do valor final de PRA para as amostras analisadas nos Exemplos 3-9, acima descritos, de acordo com o seguinte cálculo:

$$\frac{250 \text{ uL de plasma} + 25 \text{ uL de tampão}}{250 \text{ uL de plasma}} \cdot \frac{1}{3 \text{ horas}} = 0,367$$

[000100] O resultado a partir de LCquan descrito como ng/mL é então multiplicado por 0,367 para dar uma medida corrigida para o ensaio de PRA em ng por mL por h. Embora neste Exemplo particular não fosse necessária uma correção adicional, se a amostra tiver sido diluída para levar o resultado final para a faixa linear do ensaio, o resultado final

também teria sido multiplicado pelo grau de diluição.

[000101] Os conteúdos dos artigos, das patentes, e dos pedidos de patentes, e de todos os outros documentos e informação eletronicamente disponível mencionados ou citados neste documento, são, pelo presente, incorporados por referência em sua totalidade na mesma proporção como se cada publicação individual fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada por referência. Os requerentes reservam o direito de incorporar fisicamente neste pedido quaisquer materiais e informação a partir de quaisquer tais artigos, patentes, pedidos de patentes, ou outros documentos físicos e eletrônicos.

[000102] Os métodos ilustrativamente descritos neste documento podem adequadamente ser praticados na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações não especificamente divulgadas aqui. Assim, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo", "contendo", etc. serão lidos extensamente e sem limitação. Adicionalmente, os termos e as expressões empregados neste documento têm sido usados como termos de descrição e não de limitação, e não há nenhuma intenção no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes das características acima mostradas e descritas ou de suas partes. Reconhece-se que são possíveis diversas modificações dentro do escopo da invenção reivindicada. Desse modo, deve ser entendido que, embora a presente invenção tenha sido especificamente divulgada por modalidades preferidas e características ótimas, aqueles versados na técnica podem se valer de modificação e variação da invenção incluída a este respeito, aqui divulgada, e que tais modificações e variações são consideradas estarem dentro do escopo desta invenção.

[000103] A invenção foi descrita ampla e genericamente neste documento. Cada uma das formas mais estreitas e dos grupamentos

subgenéticos que incidem na descrição genérica também forma parte dos métodos. Isto inclui a descrição genérica dos métodos, com uma condição ou limitação negativa removendo qualquer matéria do gênero, não obstante se o material cortado é especificamente citado neste documento ou não.

[000104] Outras modalidades estão dentro das reivindicações a seguir. Além disso, onde as características ou os aspectos dos métodos forem descritos em termos de grupos de Markush, aqueles versados na técnica reconhecerão que a invenção é também, com isso, descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo de Markush.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para medir a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) ionizar a angiotensina 1 a partir da dita amostra para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa, em que o dito íon precursor apresenta uma proporção de massa para a carga de $433,0 \pm 0,5$;

(b) fragmentar o dito íon precursor para produzir um íon fragmento com uma proporção massa/carga de $619,5 \pm 0,5$;

(c) detectar a quantidade do(s) íon(s) de angiotensina por espectrometria de massa; e

(d) usar a quantidade de íon(s) detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na dita amostra.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito método tem um limite de quantificação menor do que, ou igual a $0,1 \text{ ng/mL}$.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito método adicionalmente compreende purificar a angiotensina 1 a partir da dita amostra por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o método ainda compreende purificar angiotensina 1 a partir da dita amostra com uma coluna de extração de fase sólida.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade de íon de angiotensina 1 está relacionada à presença ou quantidade de angiotensina 1 na amostra pela comparação com um padrão interno.

6. Método para determinar se um paciente exibindo níveis de atividade plasmática de renina baixa como definidos pelo método

definido na reivindicação 1 é um membro de uma subpopulação com alta degradação natural de angiotensina 1, caracterizado pelo fato de que compreende medir o nível de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação na amostra antes da incubação e medição da quantidade de degradação padrão remanescente após a incubação.

7. Método para medir a quantidade de angiotensina 1 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) incubar a dita amostra pré-misturada com inibidor de protease estável em água que não é eficaz contra renina sob condições adequadas para a geração de angiotensina 1 pela renina na amostra;

(b) purificar angiotensina 1 na dita amostra por cromatografia líquida;

(c) ionizar a angiotensina 1 purificada dessa amostra para produzir um ou mais íons detectáveis por espectroscopia de massa;

(d) detectar a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 por espectrometria de massa; e

(e) utilizar uma quantidade de íon(s) detectado(s) para medir a quantidade de angiotensina 1 na amostra,

em que os referidos íons de angiotensina 1 compreendem um íon com uma proporção de massa/carga de $619,5 \pm 0,5$.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o referido método apresenta um limite de quantificação de menos ou igual a 0,1 ng/ml.

9. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida ionização compreende gerar um íon precursor com uma proporção de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e gerar um íon fragmento com uma proporção de massa/carga de $619,5 \pm 0,5$.

10. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a quantidade de íons de angiotensina 1 está

relacionada com a presença ou quantidade de angiotensina 1 na amostra pela comparação com o padrão interno.

11. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a referida etapa (b) compreende purificar angiotensina 1 a partir da dita amostra com uma coluna de extração de fase sólida.

12. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o inibidor de protease estável em água é fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila.

13. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende medir o grau de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação à amostra antes da incubação e medir a quantidade de padrão de degradação remanescente após a incubação.

14. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende medir o grau de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação à amostra antes da incubação e medir a quantidade de produtos de degradação a partir da degradação padrão na amostra após a incubação.

15. Método para medir atividade de renina em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) incubar a amostra pré-misturada com inibidor de protease estável que não é eficaz contra renina sob condições adequadas para gerarão de angiotensina 1 pela renina na amostra;

(b) purificar angiotensina 1 pela cromatografia líquida;

(c) ionizar a angiotensina 1 purificada a partir da amostra para produzir um ou mais íons detectáveis pela espectrometria de massa;

(d) detectar a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 pela espectrometria de massa;

(e) utilizar a quantidade de íon(s) detectados para medir a quantidade de angiotensina 1 na amostra; e

(f) utilizar a quantidade de angiotensina 1 medida na referida amostra para calcular atividade de renina na amostra,

em que os referidos íons de angiotensina 1 compreendem um íon com uma proporção de massa/carga de $619,5 \pm 0,5$.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a cromatografia líquida é cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o método apresenta um limite de quantificação menor ou igual a 0,1 ng/ml.

18. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a referida ionização compreende gerar um íon precursor com uma proporção de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e gerar um íon fragmento com uma proporção de massa/carga de $619,5 \pm 0,5$.

19. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a referida etapa (b) compreende purificar angiotensina 1 a partir da dita amostra com uma coluna de extração de fase sólida.

20. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o inibidor de protease estável em água é fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila.

21. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a quantidade de íons de angiotensina 1 está relacionada com a presença ou quantidade de angiotensina 1 na amostra pela comparação com o padrão interno.

22. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende medir o grau de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação à amostra antes da incubação e medir a quantidade de padrão de

degradação remanescente após a incubação.

23. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende medir o grau de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação à amostra antes da incubação e medir a quantidade de produtos de degradação a partir da degradação padrão na amostra após a incubação.

24. Método para medir atividade de renina em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) incubar a amostra pré-misturada com inibidor de protease estável que não é eficaz contra renina sob condições adequadas para geralão de angiotensina 1 pela renina na amostra;

(b) purificar angiotensina 1 pela cromatografia líquida;

(c) ionizar a angiotensina 1 purificada a partir da amostra para produzir um ou mais íons detectáveis pela espectrometria de massa;

(d) detectar a quantidade de íon(s) de angiotensina 1 pela espectrometria de massa, os referidos íons compreendendo uma proporção de massa/carga de $619,5 \pm 0,5$; e

(e) utilizar a quantidade de íon(s) detectados para medir a quantidade de angiotensina 1 na amostra; e

(f) utilizar a quantidade de angiotensina 1 medida na referida amostra para calcular atividade de renina na amostra.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida ionização compreende gerar um íon precursor com uma proporção de massa/carga de $433,0 \pm 0,5$, e gerar um íon fragmento com uma proporção de massa/carga de $619,5 \pm 0,5$.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o método apresenta um limite de quantificação menor ou igual a 0,1 ng/ml.

27. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) compreende incubar na presença de um inibidor de protease estável em água que não é eficaz contra renina.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o inibidor de protease estável em água é fluoreto de aminoetilbenzilsulfonila.

29. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a cromatografia líquida é cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

30. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que ainda compreende purificar angiotensina 1 a partir da dita amostra com uma coluna de extração de fase sólida.

31. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a quantidade de íons de angiotensina 1 está relacionada com a presença ou quantidade de angiotensina 1 na amostra pela comparação com o padrão interno.

32. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que compreende medir o grau de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação à amostra antes da incubação e medir a quantidade de padrão de degradação remanescente após a incubação.

33. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que compreende medir o grau de degradação de angiotensina 1 na amostra pela adição de um padrão de degradação à amostra antes da incubação e medir a quantidade de produtos de degradação a partir da degradação padrão na amostra após a incubação.

FIG. 1

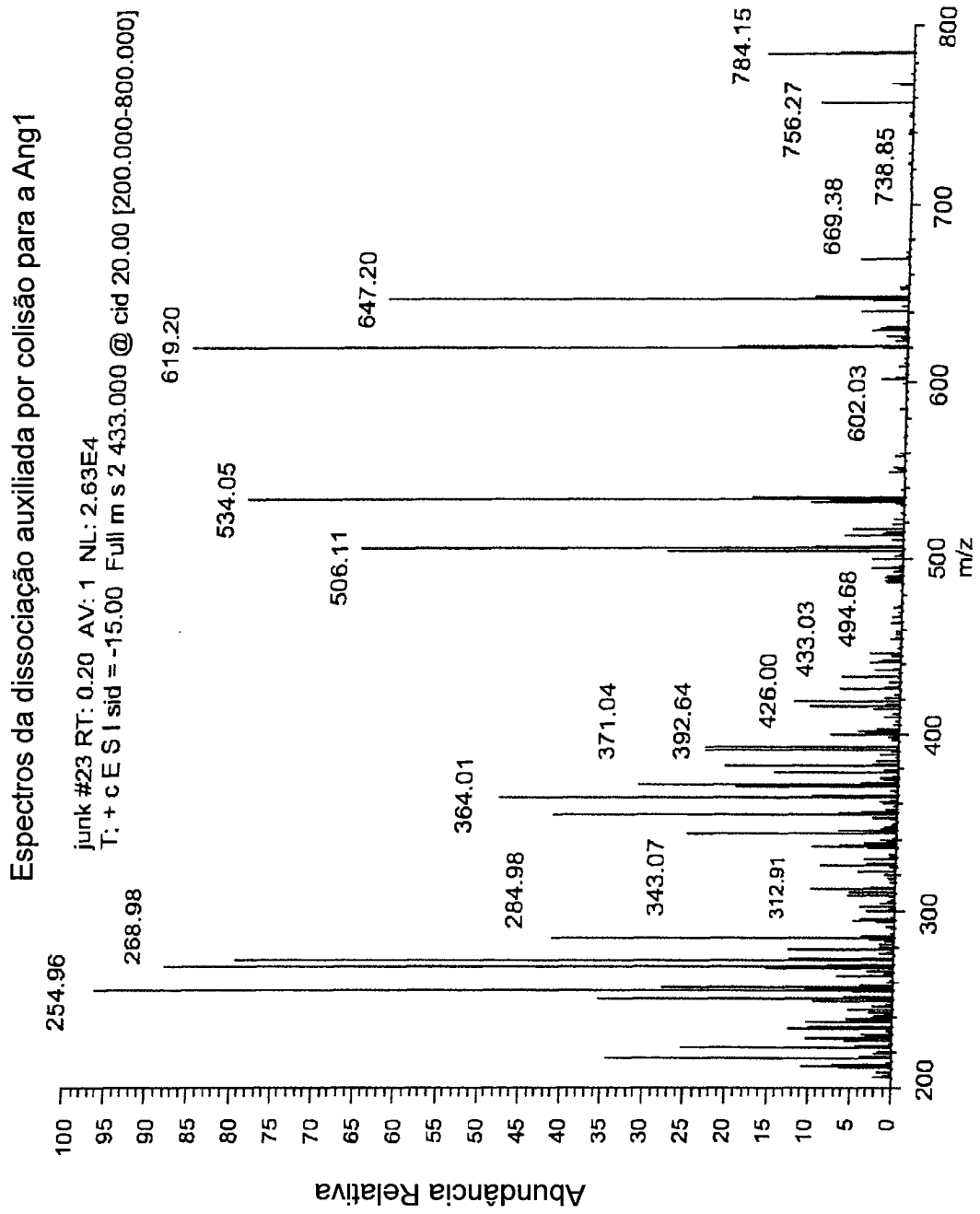


FIG. 2

Espectros da dissociação auxiliada por colisão para o Padrão Interno

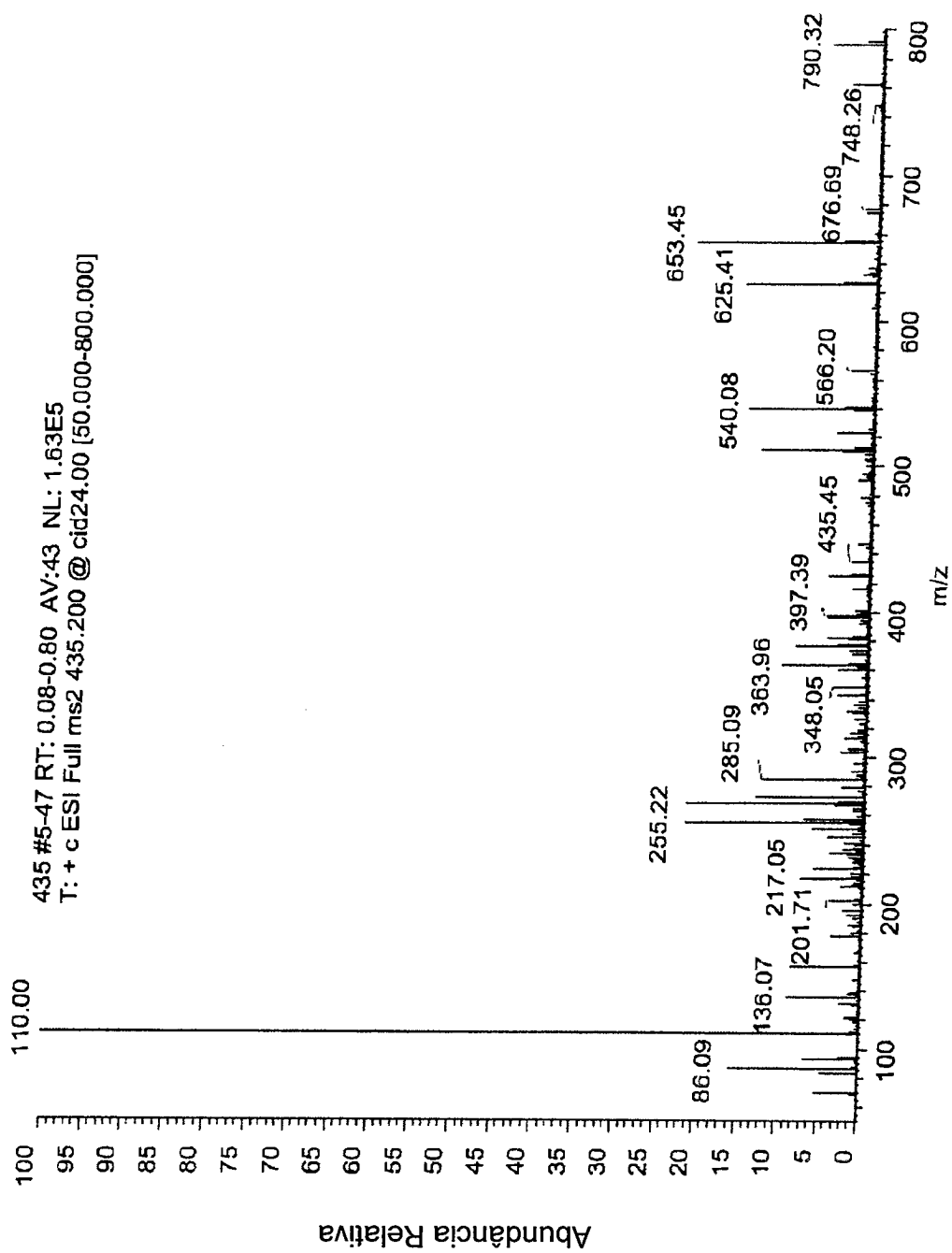


FIG. 3

Angiotensina I

$$Y = 0.0142666 + 0.00594694 \cdot X \quad R^2 = 0.9983 \quad W: 1/X$$

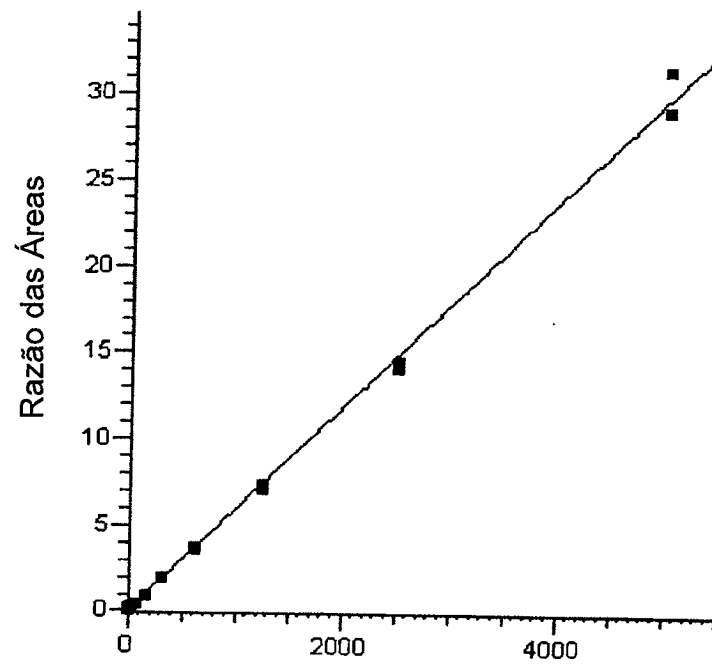


FIG. 4

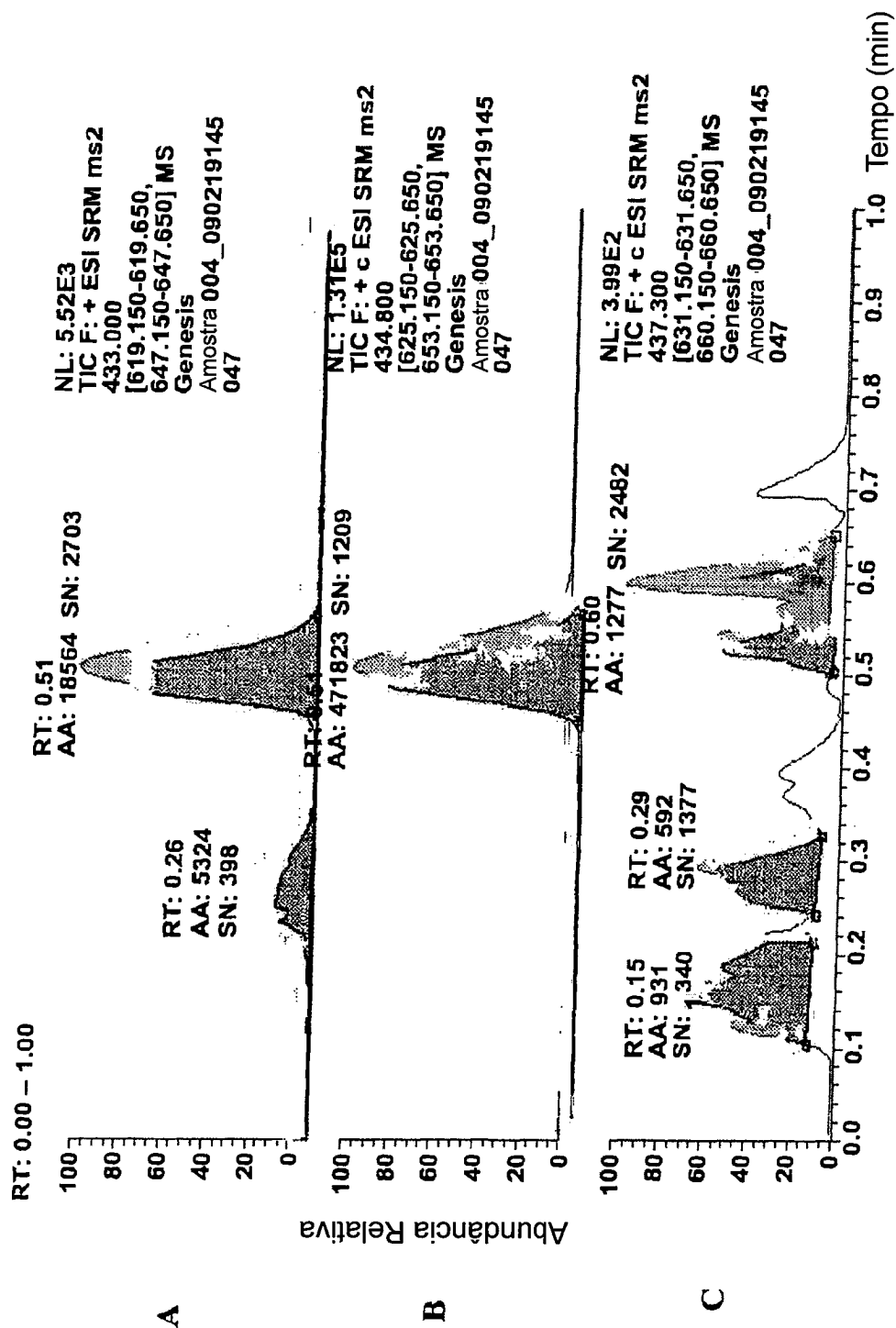


FIG. 5

