



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 356 481**

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

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **07700227 .7**
⑨6 Fecha de presentación : **17.01.2007**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1974210**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

⑤4 Título: **Procedimiento para diagnosticar poliquistosis renal.**

③0 Prioridad: **17.01.2006 EP 06000963**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.04.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.04.2011

⑦3 Titular/es: **Universitätsklinikum Freiburg**
Hugstetter Strasse 49
79106 Freiburg, DE

⑦2 Inventor/es: **Walz, Gerd**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere al diagnóstico de poliquistosis renales (PQR). La invención proporciona procedimientos para diagnosticar o monitorizar la progresión de PQR y el uso de kits de prueba en esos procedimientos.

La PQR es una enfermedad hereditaria común asociada a insuficiencia renal. Aunque el crecimiento de quistes y la compresión del tejido circundante pueden explicar algo de pérdida de tejido renal, la naturaleza de la insuficiencia renal progresiva en pacientes con PQR es desconocida.

La poliquistosis renal dominante autosómica (PQRAD) se produce en aproximadamente 1 de 1000 seres humanos, y produce insuficiencia renal terminal (IRT) en más del 50 % de todos los pacientes afectados. La formación de quistes se inicia durante la embriogénesis, pero normalmente no altera la función renal hasta más tarde en la vida. Las mutaciones de tanto *PQR1* como *PQR2* producen la enfermedad, pero sigue siendo inalcanzable por qué los quistes presentes en menos de un uno por ciento de todas las nefronas producen insuficiencia renal. Aunque la proliferación persistente, la secreción de fluido y la expansión de quistes pueden dañar el tejido circundante por cambios reactivos de la matriz extracelular, el aumento de la apoptosis del parénquima sano parece ser el principal culpable de la insuficiencia renal progresiva. Las células epiteliales aisladas de riñones quísticos muestran un aumento de los niveles de expresión proto-oncogénica, una localización errónea de proteínas de la membrana integral y una secreción de fluidos activa, pero estas alteraciones no explican la acelerada pérdida de tejido *in vivo*.

Se están desarrollando medicamentos de los cuales puede esperarse un efecto terapéutico en el tratamiento de PQR (por ejemplo, antagonistas del receptor de vasopresina 2 e inhibidores de mTOR). Los estudios clínicos de fase II/III para estas sustancias se iniciarán el próximo año. Sin embargo, todavía no se sabe cómo podría monitorizarse la eficiencia terapéutica a corto plazo (es decir, dentro de un periodo de aproximadamente uno a aproximadamente cuatro años). Como la enfermedad se desarrolla durante el transcurso de muchos años, es difícil determinar si una intervención terapéutica inhibirá eficientemente o no la progresión de la enfermedad. Actualmente, la medición de la cantidad de creatinina en suero (aclaramiento de creatinina) como marcador de la función renal es el único procedimiento disponible. Sin embargo, este procedimiento tiene la desventaja de que la función renal sigue normal aunque los quistes ya se hayan desarrollado espectacularmente con el transcurso de los años. Como consecuencia, la medición de creatinina en suero no es adecuada para monitorizar la progresión de PQR o para determinar la eficiencia terapéutica de un medicamento.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para determinar la eficiencia de un tratamiento terapéutico de PQR. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para diagnosticar PQR.

Se ha descubierto de manera sorprendente que la formación de quistes está asociada a un aumento de la producción y la acumulación de proteína 4 relacionada con Frizzled secretada (sFRP4). La sFRP4 es un miembro de una familia en desarrollo de moléculas solubles que se unen tanto a moléculas de Wnt como de Frizzled. La sFRP4 es un factor soluble que antagoniza la señalización de Wnt y produce apoptosis. Además, se ha encontrado inesperadamente que la sFRP4 y otros miembros de la familia de las proteínas relacionadas con Frizzled secretadas están presentes en el suero y se excretan en la orina de pacientes con PQR y que la producción de sFRP4 establece una correlación con el grado del volumen de quistes y la fase de insuficiencia renal. Además, la sFRP5 puede detectarse específicamente en la orina de pacientes con PQR.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar o monitorizar la progresión de PQR como se define en las reivindicaciones. La PQR puede ser adquirida o heredada. La PQR puede asociarse a o producirse por mutaciones en el (los) gen(es) *PQR1* y/o *PQR2*. Por consiguiente, en una realización preferida la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar o monitorizar la progresión de PQR que comprende detectar proteína 4 relacionada con Frizzled secretada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4 en una muestra que contiene orina o suero obtenida de un individuo que padece PQR o que se sospecha que padece PQR.

Donauer y col. (2003), Journal of the American Society of Nephrology, vol. 14, Abstracts issue, página 106A, describen que el ARNm de sFRP4 está regulado por incremento en riñones extirpados de pacientes con poliquistosis renal (PQR). Sin embargo, sólo se detectó ARNm, pero no proteína. En muchos casos, la verificación de datos de micromatrices ha revelado que el ARNm de genes regulados por incremento no se traduce necesariamente en un aumento de la producción de proteína. Segundo, los riñones examinados en ese documento se extirparon de pacientes con insuficiencia renal terminal (IRT). Los hallazgos en esta población no reflejan necesariamente los cambios en la expresión génica y la producción de riñones con PQRAD funcionantes. Tercero, la detección de sFRP4 por RT-PCR no implica complejos anticuerpo-antígeno, pero se basa completamente en la transcripción inversa de ARNm en ADNc, y la detección de este ADNc por PCR y electroforesis en gel. La inmunoquímica no se realizó para sFRP4. La presente invención no se refiere al descubrimiento de que el ARNm está regulado por incremento en pacientes con PQR con insuficiencia renal terminal, sino que se basa en un aumento de la producción de sFRP4 en pacientes con PQR con riñones funcionantes. Es probable que numerosos genes sean inducidos por uremia y/o terapia de reemplazo renal, y la especificidad sigue siendo cuestionable. En la técnica anterior no se ha informado del hallazgo de que la sFRP4, además de otros miembros de la familia de sFRP, son detectables en la orina y la sangre de pacientes con riñones funcionantes.

Berndt y col. (2003) The Journal of Clinical Investigation 112(5), 785 describen estudios sobre la actividad

fosfatúrica de sFRP4. Sin embargo, estos estudios no se relacionaron con PQR. Además, este documento no revela que la sFRP4 pueda estar presente en el suero o la orina de sujetos que padece una enfermedad renal quística.

Zheng y col. (J. Am. Soc. Nephrol. 14: 2588-2595, 2003) describen estudios sobre la excreción urinaria de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) en PQRAD. Esta publicación no desvela la detección de sFRP4 ni de sFRP5.

El documento WO 02/05857 A2 desvela la secuencia de aminoácidos de FRP-4 humana y describe una posible función de esta proteína en la homeostasis y el transporte de fosfato. No enseña la detección de sFRP4 ni de sFRP5 para monitorizar o diagnosticar PQR.

Los términos “proteína relacionada con Frizzled secretada” y “sFRP” se usan indistintamente en este documento. Las sFRP incluyen, pero no se limitan a, sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5. La sFRP puede unirse preferentemente tanto a moléculas de Wnt como a una o más de Frizzled.

El término “proteína 1 relacionada con Frizzled secretada” o “sFRP1” denota una proteína que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:1 (Figura 7). Preferentemente, la sFRP1 es una proteína que está constituida sustancialmente por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:1. La sFRP1 también incluye variantes de proteínas de la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:1, por ejemplo, debido a variación alélica. Las variantes pueden tener mutaciones con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:1, por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o deleciones. Uno de 30, o uno de 20, o uno de diez, o uno de cinco, o uno de tres aminoácidos pueden estar sustituidos, deleccionados y/o añadidos con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:1.

El término “proteína 2 relacionada con Frizzled secretada” o “sFRP2” denota una proteína que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:2 (Figura 7). Preferentemente, la sFRP2 es una proteína que está sustancialmente constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:2. La sFRP2 también incluye variantes de proteínas de la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:2, por ejemplo, debido a variación alélica. Las variantes pueden tener mutaciones con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:2, por ejemplo sustituciones, adiciones y/o deleciones. Uno de 30, o uno de 20, o uno de diez, o uno de cinco, o uno de tres aminoácidos pueden estar sustituidos, deleccionados y/o añadidos con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:2.

El término “proteína 3 relacionada con Frizzled secretada” o “sFRP3” denota una proteína que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:3 (Figura 7). Preferentemente, la sFRP3 es una proteína que está sustancialmente constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:3. La sFRP3 también incluye variantes de proteínas de la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:3, por ejemplo, debido a variación alélica. Las variantes pueden tener mutaciones con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:3, por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o deleciones. Uno de 30, o uno de 20, o uno de diez, o uno de cinco, o uno de tres aminoácidos pueden estar sustituidos, deleccionados y/o añadidos con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:3.

El término “proteína 4 relacionada con Frizzled secretada” o “sFRP4” denota una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:4 (Figura 7). Preferentemente, la sFRP4 es una proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:4.

El término “proteína 5 relacionada con Frizzled secretada” o “sFRP5” denota una proteína que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:5 (Figura 7). Preferentemente, la sFRP5 es una proteína que está sustancialmente constituida por la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:5. La sFRP5 también incluye variantes de proteínas de la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:5, por ejemplo, debido a variación alélica. Las variantes pueden tener mutaciones con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:5, por ejemplo, sustituciones, adiciones y/o deleciones. Uno de 30, o uno de 20, o uno de diez, o uno de cinco, o uno de tres aminoácidos pueden estar sustituidos, deleccionados y/o añadidos con respecto a la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:5.

El procedimiento desvelado puede comprender detectar una sFRP en la muestra. Alternativamente, el procedimiento puede comprender detectar al menos dos sFRP diferentes en la muestra. El procedimiento puede comprender detectar al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco sFRP diferentes en la muestra. El procedimiento comprende detectar sFRP4 humana en la muestra. En otra realización preferida según la reivindicación dependiente 8, el procedimiento comprende detectar sFRP4 y sFRP5 en la muestra.

El término “muestra” como se usa en este documento designa una composición que se deriva del cuerpo de un individuo. Normalmente, el individuo tiene riñones que funcionan. En una realización específica, el individuo no tiene insuficiencia renal terminal (IRT). Las muestras preferidas son muestras de orina y muestras de suero del individuo. La muestra puede ser una composición que se ha procesado para estar en una condición adecuada para el procedimiento según la invención. Por ejemplo, una muestra de sangre puede someterse a centrifugación de forma que se obtenga suero, o una muestra de orina puede diluirse antes del análisis (por ejemplo, a 1:2 a 1:100, o a 1:5 ó 1:50 o a 1:10 a 1:20). El procesamiento puede incluir centrifugación, precipitación, concentración, filtración, diálisis y/o dilución. El tipo de

procesamiento puede depender de la técnica que se use para detectar la sFRP en la muestra.

El procedimiento de la invención sólo comprende etapas que se llevan a cabo *in vitro*. La etapa de obtener la muestra del cuerpo del individuo no está englobada por la presente invención.

5 La etapa de detectar sFRP4 en la muestra puede incluir determinar la presencia o la ausencia de sFRP4 en la muestra en un modo cualitativo. Sin embargo, la etapa de detectar la sFRP4 también puede incluir determinar la cantidad o concentración de sFRP4 en la muestra en un modo cuantitativo o semicuantitativo. La etapa de detectar sFRP4 incluye detectar fragmentos de sFRP4.

10 La cantidad de sFRP4 en la orina de un individuo sano no es detectable por análisis de transferencia Western. La cantidad de sFRP4 en la orina de un paciente que padece PQR oscila de < 10 ng/ml a > 50 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 50 µg/ml. Por tanto, un paciente con PQR puede excretar entre < 1 µg y > 50 mg por día, por ejemplo, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 mg por día. Como la concentración de orina varía, la cantidad de sFRP4 excretada por día puede establecer una correlación más exacta con la fase de la enfermedad. En la enfermedad quística renal, la mayoría de los quistes se desconectan del sistema tubular de drenaje. Por tanto, las mediciones de sFRP4 en el suero en vez de en la orina pueden proporcionar un cálculo aproximado más preciso del volumen de quistes y de la progresión de la enfermedad. En el suero, la concentración de sFRP4 puede oscilar de < 10 ng/ml a > 100 ng/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml en pacientes que padecen PQR, y no es detectable en pacientes sin enfermedad renal.

20 En un aspecto de la invención, la detección de un nivel elevado de sFRP4 según la reivindicación dependiente 4 en la muestra del individuo con respecto a muestras de control indica un diagnóstico de PQR. Asimismo, el grado de elevación de sFRP4 en la muestra del individuo con respecto a muestras de control puede establecer una correlación con la progresión de PQR en el individuo. Las muestras de control han sido obtenidas de individuos que no padecen enfermedades renales tales como PQR. Las concentraciones de sFRP4 en la muestra > 50 ng/ml están normalmente asociadas a quistes renales independientes de la etiología.

25 Los intervalos de concentración mencionados anteriormente en este documento con respecto a la sFRP4 también pueden aplicarse a la sFRP5.

30 El procedimiento de la invención comprende preferentemente al menos un inmunoensayo directo o indirecto. Estos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva, ensayos de unión no competitiva, radioinmunoensayos, ensayos de inmunodifusión de adsorción (ELISA), ensayos tipo sándwich, reacciones de precipitina, ensayos de inmunodifusión de difusión en gel, ensayos de aglutinación, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos de inmunoPCR, inmunoensayos de proteína A o proteína G y ensayos de inmunolectroforesis. Entre todos, el inmunoensayo de enzimas, en particular el ensayo de inmunodifusión de adsorción (ELISA), se usa apropiadamente en hospitales, etc., ya que la sFRP4 puede detectarse con alta sensibilidad y así pueden ensayarse automáticamente varios especímenes.

35 El inmunoensayo comprende el uso de un anticuerpo policlonal o monoclonal que puede unirse a la sFRP4 humana. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" designa una inmunoglobulina o un derivado de la misma que tiene la misma especificidad de unión. El anticuerpo usado en la invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo derivado a partir de o que está comprendido en un antisuero policlonal, se prefieren anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo" como se usa en este documento comprende además derivados tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o scFv: véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y. Los fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv pueden obtenerse digiriendo un anticuerpo completo con papaína, pepsina, etc. en el modo convencional. El anticuerpo o el derivado del mismo puede ser de origen natural o puede producirse (semi)sintéticamente. Tales productos sintéticos también comprenden material no proteínico o semi-proteínico que tiene la misma o esencialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo usado en la invención. Tales productos pueden obtenerse, por ejemplo, por peptidomiméticos.

45 El anticuerpo puede unirse a uno o más de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5.

50 El anticuerpo contra sFRP4 que va a usarse en la presente invención puede producirse inmunizando un animal tal como conejo, rata, cabra, oveja o ratón con sFRP4 o un fragmento de la misma o un derivado de la misma mediante un procedimiento muy conocido por aquellos expertos en la materia (Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.). El antígeno que va a usarse para la inmunización es preferentemente sFRP4 humana o un fragmento de la misma o un derivado de la misma. Sin embargo, también puede usarse sFRP4 de otras especies. El antígeno puede prepararse mediante expresión recombinante en un huésped, por ejemplo, en bacterias, células de insecto o células de mamífero, o puede prepararse mediante síntesis química por el procedimiento en fase sólida. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales son conocidas para aquellos expertos en la materia.

55 El anticuerpo que va a usarse según esta divulgación puede reconocer sólo una de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a sFRP4, pero no se une a sFRP1, sFRP2, sFRP3 ni a sFRP5. Alternativamente, el anticuerpo puede reconocer sólo dos, sólo tres o sólo cuatro de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5. En todavía otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo reactivo con pan que reconoce cada una de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5. La presente divulgación se refiere a tales anticuerpos descritos anteriormente.

El anticuerpo que va a usarse según la presente invención puede ser específico para sFRP4 humana, es decir, no reconoce otras proteínas en la muestra. Lo más preferentemente, el anticuerpo no reconoce otras proteínas en la orina humana. El anticuerpo específico de sFRP4 puede unirse a un epítipo en una de las siguientes regiones de la molécula de sFRP4: péptido del extremo carboxi de sFRP4 - (aminoácidos 307 - 326): RTSRSNPPKPKGKPPAPKPA (SEQ ID NO:6), (aminoácidos 328 - 343): PKKNIKTRSARKRTNP (SEQ ID NO:7) y péptido del extremo amino de sFRP4 - (aminoácidos 110-124): PLMKMYNHSWPESLA (SEQ ID NO: 14).

En el procedimiento de ELISA, un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo contra sFRP se inmoviliza normalmente primero sobre un vehículo como anticuerpo primario. El vehículo preferido es un vehículo sólido tal como un recipiente de placa de ELISA moldeada a partir de un polímero de vehículo tal como estireno o poliestireno. El anticuerpo monoclonal o su fragmento puede inmovilizarse, por ejemplo, disolviendo el anticuerpo monoclonal o su fragmento en un tampón tal como un tampón carbonato o un tampón borato seguido de la adsorción sobre el vehículo.

Por separado, un anticuerpo (un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, o un fragmento de los mismos) usado como anticuerpo secundario se marca preferentemente con una marca no radiactiva. Como marca no radiactiva pueden usarse marcas de enzimas, marcas fluorescentes, marcas de emisión de luz, etc. Se prefiere que se use una marca de enzima tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

En un aspecto de la invención, al menos dos muestras, o al menos 3 muestras, o al menos 4 muestras, o al menos 5 muestras obtenidas del mismo individuo en momentos diferentes, se prueban para la presencia o la cantidad de sFRP4. Esto puede incluir recoger datos durante un periodo de tiempo. Las muestras de un paciente pueden tomarse a intervalos regulares. El intervalo puede oscilar de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 meses, preferentemente oscila de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 meses, más preferentemente oscila de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 meses (por ejemplo, aproximadamente 6 meses). Esto permite la monitorización de la progresión de PQR durante diversos periodos de tiempo.

Adicionalmente, en este documento se desvela el uso de un medio para la detección de una sFRP (por ejemplo, de sFRP4 o sFRP5) o su expresión para diagnosticar o monitorizar la progresión de PQR. Medios adecuados para la detección de una sFRP incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra sFRP, moléculas de ácidos nucleicos que pueden hibridarse con un ácido nucleico que codifica sFRP y similares. Los anticuerpos según esta realización se corresponden con aquellos descritos anteriormente.

Las moléculas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) adecuadas que pueden hibridarse con un ácido nucleico que codifica sFRP4 o sFRP5 pueden ser diseñadas por un experto habitual usando la secuencia de nucleótidos publicada del gen sFRP4 (Abu-Jawdeh G, Comella N, Tomita Y, Brown LF, Tognazzi K, Sokol SY, Kocher O. Differential expression of frpHE: a novel human stromal protein of the secreted frizzled gene family, during the endometrial cycle and malignancy. Lab Invest. 1999 Apr; 79(4):439-47.). Las moléculas de ácidos nucleicos normalmente adecuadas tienen una longitud de al menos diez nucleótidos, preferentemente de al menos 15 nucleótidos, más preferentemente de al menos 20 nucleótidos, incluso más preferentemente de al menos 25 nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede tener aproximadamente 15 a 35 nucleótidos de longitud. La molécula de ácido nucleico puede usarse como cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o como una sonda en un ensayo de hibridación. Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico tal como un ADNc, ADN genómico o ARN cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridarse con la otra molécula de ácido nucleico bajo las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la disolución. Las condiciones de hibridación y de lavado son muy conocidas y se ejemplifican en Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), particularmente el capítulo 11 en su interior. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación rigurosas es incubación durante la noche a 42 °C en una disolución que comprende: formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido de lavado del soporte de hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. En un aspecto de la invención podría usarse RT-PCR para monitorizar la expresión de sFRP4 en células epiteliales tubulares presentes en la orina de pacientes con enfermedad renal quística. Esta divulgación descrita con respecto a sFRP4 se aplica a otras sFRP tales como sFRP1, sFRP2, sFRP3 y sFRP5.

Otro aspecto de la invención es el uso de sFRP4 como marcador para la progresión de PQR según la reivindicación 9. Las realizaciones preferidas de este aspecto se corresponden con las realizaciones preferidas del procedimiento descrito anteriormente.

Todavía otro aspecto de la presente invención es el uso de un kit de diagnóstico que comprende al menos un anticuerpo que puede unirse específicamente a sFRP4 en un procedimiento de la presente invención. Preferentemente, el kit de prueba es un kit de prueba de ELISA. En una realización, el anticuerpo no reacciona de forma cruzada con otras proteínas presentes en la orina humana. Los anticuerpos preferidos de este kit se han descrito anteriormente a propósito del procedimiento de la invención. En una realización, el anticuerpo en el kit de prueba reconoce sFRP4 tanto en su forma nativa como en su forma desnaturalizada. En otra realización, el anticuerpo en el kit reconoce sFRP4 en la muestra en un ensayo de ELISA y en transferencias Western. En otra realización, la capacidad o especificidad de unión del anticuerpo no depende significativamente del estado de glicosilación de sFRP4. En otra realización, el anticuerpo reconoce sFRP4 en orina humana

o suero humano en un ensayo de ELISA (por ejemplo, un ensayo de tipo sándwich típico). El anticuerpo puede inmovilizarse sobre una fase sólida tal como una placa de microtitulación o una tira reactiva. El kit puede comprender otro anticuerpo que puede unirse específicamente a sFRP4. Normalmente, el segundo anticuerpo está dirigido contra la misma proteína que el primer anticuerpo (especialmente en el caso de un kit de prueba de ELISA). Este segundo anticuerpo puede usarse en una ELISA de tipo sándwich como se conoce por sí mismo en la materia. El segundo anticuerpo (un anticuerpo monoclonal o uno policlonal) puede marcarse con una marca no radiactiva. Como marca no radiactiva pueden usarse marcas de enzimas, marcas fluorescentes, marcas de emisión de luz, etc. Se prefiere que se use una marca de enzima tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. En una realización específica, el kit no contiene el anticuerpo mAb 3.1 ó 3.4 mencionado en Berndt y col. (2003). También es posible que el segundo anticuerpo reconozca el primer anticuerpo en el kit de prueba, o que el segundo anticuerpo reconozca una sFRP distinta de la sFRP reconocida por el primer anticuerpo en el kit de prueba.

El kit de diagnóstico puede comprender adicionalmente otros componentes tales como un concentrado de tampón de lavado, una composición que comprende sFRP4 como patrón, una disolución de parada (por ejemplo, disolución de HCl) y similares. La composición que comprende sFRP4 como patrón normalmente comprende sFRP4 sustancialmente pura. El kit puede comprender adicionalmente material informativo referente al uso del kit, por ejemplo, en forma de una hoja, un panfleto o un folleto. El material informativo puede proporcionar información sobre los materiales del kit, la preparación de muestras y/o el procedimiento de ensayo. En particular, el material informativo puede contener indicaciones sobre cómo tiene que prepararse la muestra de orina para el ensayo que va a llevarse a cabo. Preferentemente, las partes contenidas en el kit están dispuestas en un recipiente que puede cerrarse.

La presente divulgación se refiere además a miembros de la familia de genes sFRP (véanse las Figuras 7 y 8). Actualmente se han descrito al menos cinco proteínas sFRP estrechamente relacionadas. Todas estas proteínas se expresan en el riñón, y están posiblemente reguladas por incremento en PQR. Como se muestra en la Figura 6, varias especies diferentes de proteínas relacionadas con Frizzled secretadas están presentes en la orina de pacientes con PQR. Las cinco proteínas sFRP contienen secuencias de proteínas conservadas que se solapan (véase la Figura 8: Alineamiento de sFRP1-5). Por tanto, otro aspecto de la presente divulgación es el desarrollo de anticuerpos monoclonales reactivos con pan y sistema(s) de detección (como se han descrito anteriormente) que detectan las cinco (y posiblemente más) proteínas relacionadas con Frizzled secretadas y/o una combinación definida de proteínas sFRP. En algunos casos (por ejemplo, para detectar subtipos de poliquistosis renales u otras enfermedades asociadas a la expresión de proteínas sFRP) también puede ser útil desarrollar anticuerpos monoclonales y kits de detección que reconocen específicamente sFRP1, sFRP2, sFRP3 o sFRP5.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de cribado para identificar compuestos eficaces en el tratamiento de PQR que comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula; y (b) determinar la expresión por la célula de uno o más genes que son inducidos por fluido quístico o regulados por incremento en riñones de pacientes con PQRAD, o determinar la actividad promotora del (de los) promotor(es) de dicho(s) gen(es).

Los genes inducidos por fluido quístico o regulados por incremento en riñones de pacientes con PQRAD pueden seleccionarse de los genes enumerados en la Tabla 1 más adelante. En estos procedimientos de cribado puede determinarse la expresión o la actividad promotora de al menos 2, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 20, o al menos 50 genes enumerados en la Tabla 1.

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento de cribado para identificar compuestos eficaces en el tratamiento de PQR que comprende (a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula; y (b) determinar la expresión por la célula de sFRP4 o sFRP5 (y/u otras proteínas sFRP), o determinar la actividad promotora del promotor de sFRP4 o sFRP5 (u otro promotor de sFRP) en la célula.

Células adecuadas que pueden usarse en los procedimientos de cribado incluyen, pero no se limitan a, células HEK 293, COS, HeLa, etc.

El procedimiento de cribado puede comprender adicionalmente la etapa de seleccionar el compuesto de prueba, si el compuesto de prueba inhibe la expresión por la célula de al menos una sFRP o la actividad promotora del promotor de al menos un sFRP. A modo de ejemplo, el procedimiento de cribado puede comprender adicionalmente la etapa de seleccionar el compuesto de prueba, si el compuesto de prueba inhibe la expresión por la célula de sFRP4 o la actividad promotora del promotor de sFRP4. Los procedimientos para determinar el nivel de expresión o la actividad promotora son conocidos para aquellos expertos en la materia y se describen en Wong y col. (2003).

Puede considerarse que un compuesto de prueba inhibe la expresión por la célula de la sFRP si la expresión por la célula de la sFRP en presencia del compuesto de prueba se reduce al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, todavía más preferentemente al menos el 50 %, lo más preferentemente al menos el 75 %, con respecto a la expresión por la célula de la sFRP en ausencia del compuesto de prueba.

Puede considerarse que un compuesto de prueba inhibe la expresión por la célula de sFRP4 si la expresión por la célula de sFRP4 en presencia del compuesto de prueba se reduce al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, todavía más preferentemente al

menos el 50 %, lo más preferentemente al menos el 75 %, con respecto a la expresión por la célula de sFRP4 en ausencia del compuesto de prueba.

Puede considerarse que un compuesto de prueba inhibe la expresión por la célula de sFRP5 si la expresión por la célula de sFRP5 en presencia del compuesto de prueba se reduce al menos el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, más preferentemente al menos el 30 %, incluso más preferentemente al menos el 40 %, todavía más preferentemente al menos el 50 %, lo más preferentemente al menos el 75 %, con respecto a la expresión por la célula de sFRP5 en ausencia del compuesto de prueba.

Las realizaciones descritas en este documento con respecto a PQR pueden aplicarse a otros trastornos renales u otras enfermedades renales quísticas. Las realizaciones descritas en este documento con respecto a sFRP4 pueden aplicarse a otros miembros de la familia de proteínas de sFRP.

La presente divulgación se refiere además a los siguientes aspectos:

(1) Un procedimiento para diagnosticar o monitorizar la progresión de poliquistosis renal (PQR) que comprende detectar una proteína relacionada con Frizzled secretada (sFRP) en una muestra de un individuo que padece PQR o que se sospecha que padece PQR.

(2) Un procedimiento según el punto (1), en el que la muestra contiene orina o suero obtenido del individuo que padece PQR o que se sospecha que padece PQR.

(3) Un procedimiento según el punto (1) o (2), en el que la detección de un nivel elevado de la sFRP en la muestra del individuo con respecto a muestras de control indica un diagnóstico de PQR, o en el que el grado de elevación de la sFRP en la muestra del individuo con respecto a muestras de control establece una correlación con la progresión de PQR en el individuo.

(4) Un procedimiento según uno cualquiera de los puntos (1) a (3), en el que la detección comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que puede unirse a la sFRP para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno y detectar la presencia de complejos anticuerpo-antígeno formados.

(5) Un procedimiento según uno cualquiera de los puntos (1) a (4), en el que el procedimiento comprende al menos un inmunoensayo directo o indirecto seleccionado del grupo que está constituido por un ensayo de unión competitiva, un ensayo de unión no competitiva, un radioinmunoensayo, un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), un ensayo de tipo sándwich, una reacción de precipitina, un ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, un ensayo de aglutinación, un inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de inmunoPCR, un inmunoensayo de proteína A o proteína G y un ensayo de inmunoelectroforesis.

(6) Un procedimiento según uno cualquiera de los puntos (1) a (5), en el que al menos dos muestras obtenidas del mismo individuo en momentos diferentes se criban para la presencia de la sFRP.

(7) Un procedimiento según uno cualquiera de los puntos (1) a (6), en el que dicha sFRP es proteína 4 relacionada con Frizzled secretada (sFRP4).

(8) El uso de medios para la detección de una proteína relacionada con Frizzled secretada (sFRP) para diagnosticar o monitorizar la progresión de PQR.

(9) El uso según el punto (8), en el que el medio para la detección de sFRP es un anticuerpo que puede unirse a la sFRP.

(10) El uso de una proteína relacionada con Frizzled secretada (sFRP) como marcador para la progresión de PQR.

(11) El uso según uno cualquiera de los puntos (8) a (10), en el que dicha sFRP es proteína 4 relacionada con Frizzled secretada (sFRP4).

(12) Un kit de diagnóstico para diagnosticar o monitorizar la progresión de PQR que comprende al menos un anticuerpo que puede unirse específicamente a una o más proteínas relacionada con Frizzled secretadas (sFRP).

(13) Un kit de diagnóstico según el punto (12), en el que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada con otras proteínas presentes en orina humana.

(14) Un kit de diagnóstico según el punto (12), en el que el anticuerpo puede unirse a sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5.

(15) Un kit de diagnóstico según uno cualquiera de los puntos (12) a (14), en el que el anticuerpo se inmoviliza sobre una fase sólida.

(16) Un kit de diagnóstico según el punto (15), en el que la fase sólida es una tira reactiva.

(17) Un kit de diagnóstico según uno cualquiera de los puntos (12) a (16) que comprende además un segundo

anticuerpo que puede unirse específicamente a dicha una o más sFRP.

(18) Un kit de diagnóstico según uno cualquiera de los puntos (12) a (17) que comprende además un concentrado de tampón de lavado y/o una composición que comprende sFRP.

(19) Un procedimiento de cribado para identificar compuestos eficaces en el tratamiento de PQR que comprende

(a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula; y

(b) determinar la expresión por la célula de una sFRP o determinar la actividad promotora del promotor de una sFRP.

(20) Un procedimiento de cribado según el punto (19) que comprende además la etapa de seleccionar el compuesto de prueba si el compuesto de prueba inhibe la expresión por la célula de sFRP o la actividad promotora del promotor de sFRP.

Figura 1

A. Expresión de sFRP4 en riñones normales y tejido de pacientes con PQRAD. La parte superior representa la expresión relativa obtenida por análisis de micromatrices. B. Se realizó RT-PCR semicuantitativa para confirmar los datos de micromatrices (parte inferior). C. Inmunorreactividad de sFRP4 en riñones normales y con PQRAD. Obsérvese que la sFRP4 está presente en algunas, pero no en todas las células epiteliales tubulares que revisten los quistes representados. D. El fluido quístico estimula la expresión de sFRP4 en células del CCMI diferenciadas (cultivo de 5 días) (panel izquierdo), pero no en células del CCMI senescentes (cultivo de 10 días) (panel derecho). E. El fluido quístico estimula sFRP4 en células tubulares proximales (TP) diferenciadas (cultivo de 5 días) (panel izquierdo), pero no en células TP senescentes (cultivo de 10 días) (panel derecho).

Figura 2

A. El fluido quístico de pacientes con PQRAD estimula el promotor de sFRP4. B. Dos fragmentos del promotor de sFRP4, -238/+83 y 1417/+83, se activan por el fluido quístico, mientras que el fragmento -144/+83 muestra poca respuesta al fluido quístico. C. El fluido quístico de pacientes con PQRAD contiene grandes cantidades de sFRP4. El fluido quístico se diluyó como se indica y se comparó con sFRP4 recombinante para estimar la concentración. En algunos quistes se observaron concentraciones de sFRP4 de hasta 1 mg/ml. D. El peso molecular de sFRP4 en fluido quístico se reduce por F-desglicosidasa, que indica que la sFRP4 secretada está altamente glicosilada. E. El fluido quístico bloquea la actividad estimulada por XWnt8 del indicador TOPFLASH, sugiriendo que la sFRP4 en fluido quístico conserva su actividad biológica (panel izquierdo). El fluido quístico no tiene efecto sobre la activación de TOPFLASH mediada por Disheveled (panel derecho). F. La purificación parcial de fluido quístico revela que la actividad inhibidora de Xwnt8 establece una correlación con las fracciones inmunorreactivas.

Figura 3

A. El análisis de micromatrices separa CCMI tratadas con medios de control (n=3) y medios que contienen 5 µg/ml de sFRP4 recombinante (panel izquierdo: agrupamiento jerárquico y dendograma; panel derecho: mapa de riesgo). B. GASP1 (panel izquierdo) y GASP9 (panel derecho) en células del CCMI tratadas tanto con medio de control como que contiene sFRP4. Los datos del panel izquierdo se derivan del análisis de micromatrices, el panel derecho se generó usando medios acondicionados a partir de células HEK 293T que expresan sFRP4. Las células del CCMI se incubaron tanto con medios de células transfectadas con MOCK como con los medios acondicionados durante 24 horas. Se realizó RT-PCR semicuantitativa, y la señal de GASP9 se normalizó para la expresión de GAPDH. C. La sFRP4 se excreta en la orina de pacientes con PQRAD. D. La expresión de sFRP4 está regulada por incremento en ratones deficientes en PQR2. Se realizó RT-PCR y el análisis de transferencia Western en E21 de tanto ratones PQR2 (+/-) como PQR2 (-/-). Como se muestra en el panel izquierdo, hay un fuerte aumento de la sFRP4 en embriones que carecen de PQR2. E. La inmunorreactividad de sFRP4 se encuentra en células epiteliales que revisten los quistes de ratones PQR2 (-/-) (panel izquierdo), mientras que puede encontrarse poca sFRP4 en ratones naturales (panel derecho). F. Los ratones INV revelaron una regulación por incremento similar de sFRP4, demostrando que la producción excesiva de sFRP4 no se limita a la PQRAD, sino que probablemente acompaña a la formación de quistes.

Figura 4

A. Regulación por incremento de sFRP4 detectada por RT-PCR 5 y 10 días tras la nefrectomía de 5/6 ratones. B. La gráfica representa el promedio de expresión de sFRP4 detectada por RT-PCR y normalizada para β-gal de dos experimentos independientes, demostró que la nefrectomía de 5/6 induce expresión de sFRP4.

Figura 5

A. El fragmento de sFRP4 -144/+83 no es activado ni por subunidades Gα ni Disheveled. B. El fragmento de sFRP4 -238/+83 puede activarse por tanto subunidades Gα como Dishevel. Como el fragmento de sFRP4 corto no contiene un sitio de unión a TCF, la activación mediada por Wnt está probablemente mediada en parte por la señalización dependiente de la proteína G.

Figura 6

A. Detección de sFRP4 en la orina de pacientes con IRT con enfermedad renal quística en comparación con sFRP4 humana recombinante (ng por hilera como se indica). La muestra A, B, C son orinas de control de voluntarios sanos. Los n° 1-6 son muestras de orina de pacientes con IRT con tanto PQRAD como enfermedad renal quística adquirida.

B. Detección de sFRP4 en la orina de pacientes con PQRAD y diversos grados de insuficiencia renal en comparación con sFRP4 humana recombinante (ng por hilera como se indica). Obsérvense los diferentes tamaños de peso molecular que indica que los pacientes con PQRAD secretan varias proteínas sFRP estrechamente relacionadas.

C. Detección de sFRP4 en la sangre de pacientes con PQRAD. La hilera 1 y 3 son orina y suero de un voluntario sano, la hilera 2 y 4 son la orina y el suero de un paciente con PQRAD. Para detectar la sFRP4 en el suero, la sFRP4 se inmunoprecipitó a partir de 50 µl de suero usando un antisuero policlonal específico de sFRP4. La proteína precipitada se detectó posteriormente por análisis de transferencia Western.

La **Figura 7** muestra las secuencias de aminoácidos de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5. Mediante los números de registro indicados puede obtenerse información adicional sobre las sFRP. En particular, pueden recuperarse las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las sFRP (por ejemplo, de la publicación indicada, o a modo de un enlace con la secuencia de ADNc), permitiendo el diseño de cebadores y sondas adecuados.

La **Figura 8** muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5. El alineamiento muestra regiones conservadas y regiones únicas de las sFRP.

La **Figura 9** representa la detección de sFRP4 y sFRP5 humanas en la orina de pacientes con poliquistosis renal (PQR). La orina de controles sanos (A-C) no contiene cantidades detectables de sFRP4 ni de sFRP5 en la orina. A diferencia, los pacientes con PQR (1-6) excretan elevadas cantidades de sFRP4 y sFRP5.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la invención. Sin embargo, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse demasiado a tales realizaciones específicas.

Procedimientos

Materiales. Se obtuvieron muestras de paciente (material desechado, suero y orina) después de la aprobación del protocolo del estudio por el comité de ética local. Especímenes de tejido de riñón o se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido para el aislamiento de ARN o se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4 % para inmunohistoquímica. El fluido quístico se recogió por aspiración y se almacenó tanto a 4 °C (corto plazo) como a -20 °C (largo plazo). Las muestras de sangre se recogieron en tubos colectores y se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 1200 rpm para obtener suero. El suero y la orina se almacenaron a -20 °C (largo plazo). Para el aislamiento del ARN, el tejido congelado se homogeneizó en isotiocianato de guanidinio 4 M/β-mercaptoetanol al 0,72 % usando Polytron (PT-MR2100, Kinematica AG, Lucerna, Suiza). El ARN total se purificó posteriormente en un gradiente de cloruro de cesio. El anticuerpo monoclonal de sFRP-4 se ha descrito recientemente (1).

Identificación de la expresión génica y RT-PCR semicuantitativa. El análisis de micromatrices se realizó como se ha descrito recientemente (2). Para la RT-PCR semicuantitativa se purificó ARN total (1 µg) con el conjunto de ADNsa libre de RNasa (Qiagen, Hilden, Alemania), y se transcribió de forma inversa en ADNc usando un cebador oligo(dT) 12-18 y la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para cada reacción de PCR se usó la expresión de β-actina o GAPDH como control de patrón interno (22). Los siguientes cebadores se usaron para la amplificación de sFRP4 - 5' atcgtgtcaagtgcacaaaag 3' (SEQ ID NO:8) y 5' tatgtggacactggcaggag 3' (SEQ ID NO:9), para la amplificación de GASP2 - 5' cttcaggtgtacatgaataaa 3' (SEQ ID NO:10) y 5' gaggtcgtgtgtattgctaaggc 3' (SEQ ID NO:11) y la amplificación de GASP9 - 5' gcctctgctaattggcggacaggc 3' (SEQ ID NO:12) y 5' gggaggcctccaattggcgg 3' (SEQ ID NO:13), respectivamente. El ciclo de amplificación estuvo constituido por un inicio en caliente a 94 °C durante 2 min, seguido de múltiples ciclos de desnaturalización a 94 °C a 1 min, hibridación a 58 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. El número de ciclos se ajustó al nivel de expresión de ARNm de los diferentes genes. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 % y se analizaron en relación con la banda de control correspondiente.

Cultivo celular. Células epiteliales tubulares proximales (TP) acondicionadamente inmortalizadas del ImmortoMouse de SV40 (amablemente proporcionado por H. Pavenstädt, Münster) se mantuvieron a 33 °C en DMEM-F12 complementado con suero bovino al 2 %. Para la diferenciación de las células TP, la temperatura se aumentó hasta 37 °C. Se cultivaron células mCCMI-3 inmortalizadas (denominadas en lo sucesivo células CCMI) (ATCC) en medio DMEM-F12 complementado con suero bovino al 10 %. Se cultivaron células renales embrionarias humanas (denominadas en lo sucesivo células HEK-293T) en DMEM complementado con suero bovino al 10 %.

Análisis de transferencia Western. Se realizaron análisis de inmunoprecipitación y de transferencia Western como se han descrito (3).

Inmunoquímica. Muestras de tejido obtenidas de materiales de pacientes se fijaron en paraformaldehído al 4 %,

se deshidrataron y se incorporaron en parafina. Se tiñeron secciones de tejido (5 μ) usando el kit Vectastain-ABC (Vector Laboratories). Se prepararon embriones de ratones usando el kit de incorporación Technovit 7100 (Heraeus-Kulzer, Alemania). Todas las secciones se examinaron usando un microscopio Zeiss.

Ensayos indicadores. Se sembraron células HEK 293T en placas de 12 pocillos durante 24 horas antes de la transfección. Para determinar la actividad de la luciferasa o la fosfatasa alcalina, 2 μ g de constructos indicadores TOPFLASH o pSEAP2B se transfectaron con 1 μ g de plásmido de β -galactosidasa usando el procedimiento del fosfato de calcio. Las transfecciones se realizaron por triplicado. Después de 24 horas, los lisados celulares y los sobrenadantes se ensayaron para la actividad de la luciferasa y la fosfatasa alcalina, respectivamente (Great EscAPE SEAP, BD Bioscience). Los resultados se presentan como actividad relativa de la luciferasa o la fosfatasa alcalina normalizada para la actividad de β -galactosidasa.

Cromatografía en columna. Se concentró fluido quístico que contenía sFRP4 a 5000 xg durante 45 min usando un dispositivo de filtración centrífugo YM-30 Centricon seguido de prepurificación a 45000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. Se dializó fluido quístico concentrado durante la noche a 4 °C contra tampón de equilibrio (NaH_2PO_4 20mM, NaCl 30 mM, pH 7,5). Se cargó un ml del fluido quístico dializado sobre una columna de intercambio iónico Sephadex HighPrep 16/10 SP-FF. Después de lavar la columna con 58 ml de tampón de equilibrio, la elución se llevó a cabo con un gradiente continuo empezando con NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 30 mM, pH 7,5, y terminando con NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,5. Durante la elución se recogieron fracciones de 2 ml y se dializaron durante la noche a 4 °C contra PBS. Las fracciones se probaron para la presencia de sFRP4 por análisis de transferencia Western.

Resultados

Para entender el mecanismo molecular asociado a IRT en PQRAD, los inventores generaron perfiles de genes de riñones con PQRAD y se identificó sFRP4 como un gen diferencialmente regulado (Fig. 1a). La sFRP4 (proteína 4 relacionada con Frizzled secretada) es un miembro de una familia en desarrollo de moléculas solubles que se unen tanto a moléculas de Wnt como de Frizzled (4). La RT-PCR confirmó que la mayoría de los riñones con PQRAD expresaron aumentos de las cantidades de sFRP4 (Fig. 1b). La sFRP4 inmunorreactiva fue detectable en células epiteliales tubulares que revisten los quistes en riñones con PQRAD, mientras que las células epiteliales tubulares de riñones normales no expresaron sFRP4 (Fig. 1c). La sFRP4 no se expresó uniformemente en todas las células epiteliales de quistes, y los experimentos *in vitro* usando células del CCMI y MT1, dos líneas celulares epiteliales tubulares, sugirieron que el fluido quístico desencadena sFRP4 en células menos de terminalmente diferenciadas (Figs. 1d y 1e).

El fluido quístico contiene una sustancia lipófila que estimula la generación de cAMP (5), además de varios factores de crecimiento y hormonas tales como vasopresina. Como hay dos elementos sensibles a cAMP presentes en el promotor de sFRP4 (Fig. 2a) (6), los inventores analizaron la activación mediada por fluido quístico de diferentes fragmentos de promotores de sFRP4. Como se muestra en la Fig. 2b, el fluido quístico activó significativamente el promotor de sFRP4 -238/83 y -1417/83, pero fracasó al estimular sFRP4 -144/83 que carece de los elementos sensibles a cAMP. Por tanto, la actividad estimulante de cAMP previamente descrita de fluido quístico parece estimular la expresión génica de sFRP4.

Como la sFRP4 es una proteína secretada, los inventores probaron si esta molécula se acumulaba en el fluido quístico. El análisis de transferencia Western reveló que el fluido quístico contiene grandes cantidades de sFRP4 altamente glicosilada (Figs. 2c y 2d). La sFRP4 bloquea la señalización de Wnt canónica y previene la formación del doble eje mediada por XWnt8 durante el desarrollo temprano de *Xenopus*. Como se muestra en la Fig. 2e, el fluido quístico, que contiene grandes cantidades de sFRP4, bloqueó muy eficazmente la activación mediada por XWnt8 del constructo indicador TOPFLASH dependiente de TCF, pero tuvo muy poco efecto sobre la molécula del activador citoplásmico de Wnt Disheveled (dsh). Los inventores purificaron parcialmente sFRP4 para demostrar adicionalmente que la sFRP4 quística conserva su bioactividad. Como se muestra en la Fig. 2e, las fracciones que contenían sFRP4 inmunorreactiva bloquearon la activación de TOPFlash mediada por XWnt8, mientras que las fracciones negativas de sFRP4 no tuvieron efecto significativo. Considerados en conjunto, estos hallazgos muestran que los quistes contienen grandes cantidades de sFRP4 biológicamente activa. Varios informes han ligado el aumento de la expresión de sFRP4 a tasas de apoptosis aceleradas. Aunque el mecanismo de apoptosis inducida por sFRP4 es desconocido, el aumento de la expresión de sFRP4 en PQRAD coincide con un aumento de la apoptosis del tejido renal normal circundante, que indica que la sFRP4 quística puede contribuir a la progresión de insuficiencia renal.

Para entender los efectos de la sFRP4 sobre células epiteliales tubulares renales, los inventores incubaron células del CCMI con sFRP4 recombinante y determinaron los genes diferencialmente regulados en células tratadas con sFRP4 por análisis de micromatrices usando un chip de ADNc murino de 22,5 k. Como se demuestra en la Fig. 3a, el tratamiento de sFRP4 separó los perfiles de genes de los dos conjuntos de cultivo, pero sólo proporcionó unos pocos genes significativamente regulados ($\text{FDR} < 0,05$ y $p < 0,05$). Una posible diana del tratamiento de sFRP4 era un miembro de la familia de GASP. Para confirmar la regulación diferencial de GASP, los inventores trataron células del CCMI con medios acondicionados con sFRP4 y observaron la regulación por disminución de GASP9, un miembro de la familia de GASP específico de riñón (Fig. 3b). Las proteínas GASP median en la endocitosis de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), mientras que la falta de proteínas GASP produce acumulación de GPCR en la superficie celular. Por tanto, la exposición persistente a sFRP4 podría establecer un bucle de retroalimentación perjudicial en el que el fluido quístico activa sFRP4, que a su vez previene la endoquistosis de GPCR mediante la regulación por disminución de proteínas GASP.

Los quistes normalmente pierden su conexión con los túbulos drenantes. Sin embargo, los inventores detectaron sFRP4 en la orina de pacientes con PQRAD. La Fig. 3c muestra que el grado de excreción de sFRP4 establece una correlación con la fase de insuficiencia renal. Estos hallazgos sugieren que la excreción de sFRP4 urinaria es un posible marcador para monitorizar la progresión de enfermedad renal en pacientes con PQRAD.

Como *PQR2* está mutado en algunos pacientes con PQRAD, los inventores examinaron la expresión de sFRP4 en ratones *PQR2* (-/-). Animales normalmente homocigóticos mueren entre E15 y E20 de embriogénesis. Como se muestra en las Fig. 3d y 3e, niveles elevados de sFRP4 son detectables en ratones *PQR2* (-/-), pero no en ratones *PQR2* (+/-) o naturales. Para determinar si la regulación por incremento de sFRP4 se limita a PQRAD, los inventores realizaron experimentos similares en ratones INV homocigóticos. Estos ratones carecen de NPH2 (inversina), un gen mutado en nefronoptosis recesiva autosómica de tipo II (forma infantil). Los ratones INV revelaron una regulación por incremento similar de sFRP4, demostrando que la producción excesiva de sFRP4 no se limita a la PQRAD, pero probablemente acompaña a la formación de quistes (Fig. 3F). Como el aumento de sFRP4 también es detectable después de nefrectomía parcial (véase la Figura 4), los inventores postulan que la expresión de sFRP4 es estimulada por compuestos secretados en el fluido quístico, pero también se producen durante respuestas regenerativas.

Considerados en conjunto, los hallazgos de los inventores revelan que la formación de quistes está asociada a un aumento de la producción y la acumulación de sFRP4, un antagonista de Wnt relacionado con Frizzled que participa en el aumento de apoptosis. La sFRP4 regula por disminución las proteínas GASP en células epiteliales tubulares, y por tanto, podría conferir un aumento de susceptibilidad a ligandos que se unen y estimulan GPCR. Como la PQRAD es una enfermedad lentamente progresiva, el éxito de las intervenciones terapéuticas ha sido difícil de monitorizar. Como la sFRP4 se excreta en la orina de pacientes con PQRAD, puede representar un marcador novedoso para la progresión de la enfermedad y ayudar a monitorizar la respuesta para intervenciones terapéuticas que tienen como objetivo ralentizar el desarrollo de quistes.

En un análisis de micromatrices adicional usando un chip de ADNc humano de 38 k se identificaron moléculas adicionales que están altamente reguladas por incremento en riñón con PQRAD. Los productos génicos, en particular proteínas y fragmentos de las mismas, de los genes regulados por incremento en PQRAD son útiles para detectar o monitorizar pacientes con PQR.

Tabla 1: **Genes significativamente regulados en PQRAD.** Los genes enumerados están significativamente regulados por incremento en riñones con PQRAD. El número de veces de aumento se expresa como log 2. Los péptidos de genes sombreados en gris se han identificado en la orina de individuos sanos.

Gen	Descripción	Símbolo del gen	Número de veces de aumento (log 2)
H25590	Suero amiloide A1	SAA1	8,825
N28788	Trombospondina 2	THBS2	8,418
H47153	Colágeno, tipo VI, alfa 3	COL6A3	7,828
R46444	Proteína 1 de unión a AE	AEBP1	5,91
CR746674	Tubulina, alfa 3	TUBA3	5,674
BX093514	Transgelina	TAGLN	5,618
R72711	Sinaptopodina 2	SYNP02	5,502
H58645	Receptor 1 de la toxina del ántrax	ANTXR1	5,341
W86529	Proteína 5 asociada a microfibrilar	MFAP5	5,292
AA011468	Colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina)	COL14A1	5,258
W57893	Fibronectina 1	FN1	5,045
T97662	Sushi, factor de von Willebrand de tipo A, EGF y proteína 1 que contiene dominio de pentraxina	SVEP1	4,27
R97974	Molécula de CD53	CD53	4,253
R22873	Catepsina S	CTSS	4,18
BX110513	Integrina, beta 6	ITGB6	4,176

Gen	Descripción	Símbolo del gen	Número de veces de aumento (log 2)
W40296	Proteína 1 de unión al factor de crecimiento transformante latente beta	LTBP1	4,076
H77318	Metionina-sulfóxido-reductasa B3	MSRB3	4,051
BX101810	Proteína hipotética FLJ21986	FLJ21986	4,048
R21642	Fibulina 1	FBLN1	4,034
H64964	4 dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 6A	MS4A6A	3,859
H69049	Molécula de CD36 (receptor de trombospondina)	CD36	3,837
AA029988	Sulfatasa 1	SULF1	3,815
BX115823	Proteasa, serina, 23	PRSS23	3,715
BX092184	Proteína 4 relacionada con Frizzled secretada	SFRP4	3,7
T95571	Colágeno, tipo XII, alfa 1	COL12A1	3,465
N78528	Proteína 3 que contiene repeticiones similares a EGF y dominios similares a discoidina I	EDIL3	3,396
R27079	Componente de fusión del lipoma HMGIC	LHFP	3,353
R06034	Pleckstrina	PLEK	3,205
R82964	Proteína 4 de unión a ácido graso, adipocito	FABP4	3,121
BX090914	Familia de la aldehído-deshidrogenasa 1, miembro A3	ALDH1A3	3,089
BX279620	Cinasa 2 similar a Polo (<i>Drosophila</i>)	PLK2	3,063
R72689	Miosina, polipéptido 11 pesado, músculo liso	MYH11	3,036
AA134668	Proteína 1 de cuatro dominios y medio LIM	FHL1	2,866
T70850	Perilipina	PLIN	2,776
BX283933	Región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina reactiva con miosina	LOC652106	2,647
BG104623	Gen sobreexpresado en nefroblastoma	NOV	2,636
H67479	Biglicano	BGN	2,575
T89391	Caveolina 2	CAV2	2,557
H46619	Miosina, polipéptido 9 ligero, regulador	MYL9	2,526
N44001	(Lisina-metiltransferasa) 7 que contiene el dominio SET	SETD7	2,501
BX282272	Proteína 3 (de unión a Rho GTPasa) efectora de CDC42	CDC42EP3	2,394
BX093905	Proteína 22 que contiene el motivo tripartito	TRIM22	2,345
W79256	Proteína 2 similar a la banda de la proteína de membrana de eritrocito 4.1	EPB41 L2	2,326
BX114634	Tropomiosina 4	TPM4	2,287
AA035192	Carboxipeptidasa X (familia M14), miembro 2	CPXM2	2,257
AA039256	Asporina (clase 1 de LRR)	ASPN	2,228

Gen	Descripción	Símbolo del gen	Número de veces de aumento (log 2)
R83765	Proteína 10 que contiene dominios de tetramerización de canales de potasio	KCTD10	2,221
N57594	Proteína transmembrana 47	TMEM47	2,2
AA292054	Proteína 1 específica de la detención del crecimiento	GAS1	2,17
H56349	Proteína 2 similar a fibrinógeno	FGL2	2,166
AA027246	Glicerol-3-fosfato-aciltransferasa, mitocondrial	GPAM	2,164
BX090875	Homólogo a pelota (Drosophila)	PELO	2,115
BX114711	Proteoglicano 1, gránulo secretor	PRG1	2,042
BG697186	Canal de potasio dependiente de potasio, subfamilia H (relacionado con eag), miembro 2	KCNH2	1,936
H90971	Familia de las polimerasas poli(ADP-ribosa), miembro 14	PARP14	1,919
R12367	Subunidad de proteasoma (prosome, macropaina), tipo beta, 8 (peptidasa 7 multifuncional grande)	PSMB8	1,913
H74106	Proteína 2 de unión al dominio LIM	LDB2	1,894
H13471	Syndecan 2 (heparano-sulfato-proteoglicano 1, fibroglicano asociado a la superficie celular)	SDC2	1,89
BM921371	Fibulina 5	FBLN5	1,882
R97862	Proteína 1 que contiene repeticiones de WD y la caja SOCS	WSB1	1,881
BX098913	Transductor de señales y activador de la transcripción de 1,91 kDa	STAT1	1,818
R08415	Dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semafrina) 4G	SEMA4G	1,795
BG679464	Inductor angiogénico rico en cisteína, 61	CYR61	1,7
R27042	Proteína que interactúa con la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich	WASPIP	1,629
BM473315	Interactuador N-myc (y STAT)	NMI	1,564
AA054773	Proteína combinada con GRINL1A	Gcom1	1,504

Un procedimiento para diagnosticar o monitorizar la progresión de un trastorno renal podría comprender detectar uno o más de los productos génicos codificados por los genes enumerados en la Tabla 1 en una muestra de orina o de suero de un individuo que padece el trastorno renal o que se sospecha que padece el trastorno renal. Los diversos aspectos de este procedimiento se corresponden con aquellos descritos para sFRP4 y sFRP5 en este documento, cambiando lo que se deba cambiar. El procedimiento puede comprender detectar al menos uno, al menos dos, al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos 50 productos génicos codificados por los genes respectivos enumerados en la Tabla 1. El término "producto génico" incluye proteínas y fragmentos de las mismas.

Referencias

1. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R y col. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. J Clin Invest 2003; 112(5):785-94.
2. Donauer J, Rumberger B, Klein M, Faller D, Wilpert J, Sparna T y col. Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. Transplantation 2003; 76(3):539-47.

3. Benzing T, Gerke P, Hopker K, Hildebrandt F, Kim E, Walz G. Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17):9784-9.
4. Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 2002; 24(9):811-20.
5. Yamaguchi T, Nagao S, Takahashi H, Ye M, Grantham JJ. Cyst fluid from a murine model of polycystic kidney disease stimulates fluid secretion, cyclic adenosine monophosphate accumulation, and cell proliferation by Madin-Darby canine kidney cells in vitro. *Am J Kidney Dis* 1995; 25(3):471-7.
6. Wong VK, Yam JW, Hsiao WL. Cloning and characterization of the promoter region of the mouse frizzled-related protein 4 gene. *Biol Chem* 2003; 384(8):1147-54.
10. 7. Donauer J. y col., Expression profiling of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; vol. 14, Abstracts issue, page 106A.
8. Zheng D. y col., Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein 1 in PQRAD. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; vol. 14, pages 2588 - 2595.

LISTA DE SECUENCIAS

15. <110> Universitaetsklinikum Freiburg
- <120> Procedimiento para diagnosticar poliquistosis renal
- <130> Prof. Dr. Walz
- <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.3
20. <210> 1
- <211> 314
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser
 20 25 30
 Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser
 35 40 45
 Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp
 50 55 60
 Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn
 65 70 75 80
 Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser
 85 90 95
 Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe
 100 105 110
 Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro
 115 120 125
 Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met
 130 135 140
 Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu
 165 170 175
 Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu
 180 185 190
 Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala
 195 200 205

Leu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys
210 215 220

Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys
225 230 235 240

Lys Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys
245 250 255

Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly
260 265 270

Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp
275 280 285

Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His
290 295 300

Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys
305 310

<210> 2

<211> 295

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
20 25 30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Val Asn Leu Gln
35 40 45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
50 55 60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
65 70 75 80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
85 90 95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
100 105 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
115 120 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
130 135 140
Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
145 150 155 160
Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys
165 170 175
Asn Lys Asn Asp Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn
180 185 190
Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg
195 200 205
Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr Ile Tyr Lys Leu
210 215 220
Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val Leu Trp Leu Lys
225 230 235 240
Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp Ile Asn Ala Pro
245 250 255
Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu Val Ile Thr Ser
260 265 270
Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg Ile Ser Arg
275 280 285
Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
290 295

<210> 3

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Val Cys Gly Ser Pro Gly Gly Met Leu Leu Leu Arg Ala Gly Leu
1 5 10 15
Leu Ala Leu Ala Ala Leu Cys Leu Leu Arg Val Pro Gly Ala Arg Ala
20 25 30
Ala Ala Cys Glu Pro Val Arg Ile Pro Leu Cys Lys Ser Leu Pro Trp
35 40 45
Asn Met Thr Lys Met Pro Asn His Leu His His Ser Thr Gln Ala Asn
50 55 60
Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Phe Glu Gly Leu Leu Gly Thr His Cys
65 70 75 80

Ser Pro Asp Leu Leu Phe Phe Leu Cys Ala Met Tyr Ala Pro Ile Cys
85 90 95

Thr Ile Asp Phe Gln His Glu Pro Ile Lys Pro Cys Lys Ser Val Cys
100 105 110

Glu Arg Ala Arg Gln Gly Cys Glu Pro Ile Leu Ile Lys Tyr Arg His
115 120 125

Ser Trp Pro Glu Asn Leu Ala Cys Glu Glu Leu Pro Val Tyr Asp Arg
130 135 140

Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Ala Ile Val Thr Ala Asp Gly Ala Asp
145 150 155 160

Phe Pro Met Asp Ser Ser Asn Gly Asn Cys Arg Gly Ala Ser Ser Glu
165 170 175

Arg Cys Lys Cys Lys Pro Ile Arg Ala Thr Gln Lys Thr Tyr Phe Arg
180 185 190

Asn Asn Tyr Asn Tyr Val Ile Arg Ala Lys Val Lys Glu Ile Lys Thr
195 200 205

Lys Cys His Asp Val Thr Ala Val Val Glu Val Lys Glu Ile Leu Lys
210 215 220

Ser Ser Leu Val Asn Ile Pro Arg Asp Thr Val Asn Leu Tyr Thr Ser
225 230 235 240

Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Leu Asn Val Asn Glu Glu Tyr Ile Ile
245 250 255

Met Gly Tyr Glu Asp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Leu Leu Val Glu Gly
260 265 270

Ser Ile Ala Glu Lys Trp Lys Asp Arg Leu Gly Lys Lys Val Lys Arg
275 280 285

Trp Asp Met Lys Leu Arg His Leu Gly Leu Ser Lys Ser Asp Ser Ser
290 295 300

Asn Ser Asp Ser Thr Gln Ser Gln Lys Ser Gly Arg Asn Ser Asn Pro
305 310 315 320

Arg Gln Ala Arg Asn
325

<210> 4

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Phe Leu Ser Ile Leu Val Ala Leu Cys Leu Trp Leu His Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Gly Val Arg Gly Ala Pro Cys Glu Ala Val Arg Ile Pro Met Cys
 20 25 30
 Arg His Met Pro Trp Asn Ile Thr Arg Met Pro Asn His Leu His His
 35 40 45
 Ser Thr Gln Glu Asn Ala Ile Leu Ala Ile Glu Gln Tyr Glu Glu Leu
 50 55 60
 Val Asp Val Asn Cys Ser Ala Val Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ala Met
 65 70 75 80
 Tyr Ala Pro Ile Cys Thr Leu Glu Phe Leu His Asp Pro Ile Lys Pro
 85 90 95
 Cys Lys Ser Val Cys Gln Arg Ala Arg Asp Asp Cys Glu Pro Leu Met
 100 105 110
 Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala Cys Asp Glu Leu
 115 120 125
 Pro Val Tyr Asp Arg Gly Val Cys Ile Ser Pro Glu Val Ile Val Thr
 130 135 140
 Asp Leu Pro Glu Asp Val Lys Trp Ile Asp Ile Thr Pro Asp Met Met
 145 150 155 160
 Val Gln Glu Arg Pro Leu Asp Val Asp Cys Lys Arg Leu Ser Pro Asp
 165 170 175
 Arg Cys Lys Cys Lys Lys Val Lys Pro Thr Leu Ala Thr Tyr Leu Ser
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Ser Tyr Val Ile His Ala Lys Ile Lys Ala Val Gln Arg
 195 200 205
 Ser Gly Cys Asn Glu Val Thr Thr Val Val Asp Val Lys Glu Ile Phe
 210 215 220
 Lys Ser Ser Ser Pro Ile Pro Arg Thr Gln Val Pro Leu Ile Thr Asn
 225 230 235 240
 Ser Ser Cys Gln Cys Pro His Ile Leu Pro His Gln Asp Val Leu Ile
 245 250 255
 Met Cys Tyr Glu Trp Arg Ser Arg Met Met Leu Leu Glu Asn Cys Leu

260

265

270

Val Glu Lys Trp Arg Asp Gln Leu Ser Lys Arg Ser Ile Gln Trp Glu
 275 280 285

Glu Arg Leu Gln Glu Gln Arg Arg Thr Val Gln Asp Lys Lys Lys Thr
 290 295 300

Ala Gly Arg Thr Ser Arg Ser Asn Pro Pro Lys Pro Lys Gly Lys Pro
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Lys Pro Ala Ser Pro Lys Lys Asn Ile Lys Thr Arg Ser
 325 330 335

Ala Gln Lys Arg Thr Asn Pro Lys Arg Val
 340 345

<210> 5

<211> 317

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Val Arg Thr Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Ala Leu His Trp Ala Pro Ala Arg Cys Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Gly Trp Gln Ala Glu Pro Leu His Gly Arg Ser Tyr Ser
 35 40 45

Lys Pro Pro Gln Cys Leu Asp Ile Pro Ala Asp Leu Pro Leu Cys His
 50 55 60

Thr Val Gly Tyr Lys Arg Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu Glu His Glu
 65 70 75 80

Ser Leu Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp Leu Pro Leu Leu
 85 90 95

Ala Lys Arg Cys His Ser Asp Thr Gln Val Phe Leu Cys Ser Leu Phe
 100 105 110

Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys Arg Ser Leu Cys
 115 120 125

Glu Ala Val Arg Ala Gly Cys Ala Pro Leu Met Glu Ala Tyr Gly Phe
 130 135 140

Pro Trp Pro Glu Met Leu His Cys His Lys Phe Pro Leu Asp Asn Asp
 145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Val Gln Phe Gly His Leu Pro Ala Thr Ala Pro Pro
165 170 175
Val Thr Lys Ile Cys Ala Gln Cys Glu Met Glu His Ser Ala Asp Gly
180 185 190
Leu Met Glu Gln Met Cys Ser Ser Asp Phe Val Val Lys Met Arg Ile
195 200 205
Lys Glu Ile Lys Ile Glu Asn Gly Asp Arg Lys Leu Ile Gly Ala Gln
210 215 220
Lys Lys Lys Lys Leu Leu Lys Pro Gly Pro Leu Lys Arg Lys Asp Thr
225 230 235 240
Lys Arg Leu Val Leu His Met Lys Asn Gly Ala Gly Cys Pro Cys Pro
245 250 255
Gln Leu Asp Ser Leu Ala Gly Ser Phe Leu Val Met Gly Arg Lys Val
260 265 270
Asp Gly Gln Leu Leu Leu Met Ala Val Tyr Arg Trp Asp Lys Lys Asn
275 280 285
Lys Glu Met Lys Phe Ala Val Lys Phe Met Phe Ser Tyr Pro Cys Ser
290 295 300
Leu Tyr Tyr Pro Phe Phe Tyr Gly Ala Ala Glu Pro His
305 310 315

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido del extremo C de sFRP4

<400> 6

Arg Thr Ser Arg Ser Asn Pro Pro Lys Pro Lys Gly Lys Pro Pro Ala
1 5 10 15

Pro Lys Pro Ala
20

10 <210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido del extremo C de sFRP4

<400> 7

Pro Lys Lys Asn Ile Lys Thr Arg Ser Ala Arg Lys Arg Thr Asn Pro
1 5 10 15

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador 1 para la amplificación de sFRP4

<400> 8

atcgggtgcaa gtgcaaaaag 20

10 <210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador 2 para la amplificación de sFRP4

<400> 9

tatgtggaca ctggcaggag 20

<210> 10

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador 1 para la amplificación de GASP2

<400> 10

25 cttcaggtgt acatgaataa a 21

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador 2 para la amplificación de GASP2

<400> 11

gaggtcgtgg tgattgcta aggc 24

<210> 12

35 <211> 23

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador 1 para la amplificación de GASP9
 5 <400> 12
 gcctctgcta atggcggaca ggc 23
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador 2 para la amplificación de GASP9
 <400> 13
 gggaggcctc ccaattggcg g 21
 15 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Péptido del extremo N de sFRP4
 <400> 14
 Pro Leu Met Lys Met Tyr Asn His Ser Trp Pro Glu Ser Leu Ala
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para diagnosticar o monitorizar la progresión de una poliquistosis renal (PQR) que comprende detectar una proteína relacionada con Frizzled secretada (sFRP) en una muestra que contiene orina o suero obtenida de un individuo que padece PQR o que se sospecha que padece PQR, en el que dicha sFRP es proteína 4 relacionada con Frizzled secretada (sFRP4) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:4.
- 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de orina.
- 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de suero.
- 10 4.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la detección de un nivel elevado de la sFRP4 en la muestra del individuo con respecto a muestras de control indica un diagnóstico de PQR, o en el que el grado de elevación de la sFRP4 en la muestra del individuo con respecto a muestras de control establece una correlación con la progresión de PQR en el individuo.
- 15 5.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo que puede unirse a la sFRP4 para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno y detectar la presencia de complejos anticuerpo-antígeno formados.
- 20 6.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento comprende al menos un inmunoensayo directo o indirecto seleccionado del grupo que está constituido por un ensayo de unión competitiva, un ensayo de unión no competitiva, un radioinmunoensayo, un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), un ensayo de tipo sándwich, una reacción de precipitina, un ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, un ensayo de aglutinación, un inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de inmunoPCR, un inmunoensayo de proteína A o proteína G y un ensayo de inmunoelectroforesis.
- 7.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos dos muestras obtenidas del mismo individuo en momentos diferentes se criban para la presencia de la sFRP4.
- 8.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende detectar tanto sFRP4 como sFRP5 en dicha muestra.
- 25 9.- El uso de una proteína relacionada con Frizzled secretada (sFRP) en una muestra que contiene orina o suero como marcador para la progresión de PQR, en el que dicha sFRP es proteína 4 relacionada con Frizzled secretada (sFRP4) que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:4.
- 30 10.- El uso de un kit de diagnóstico que comprende al menos un anticuerpo que puede unirse a sFRP4 en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha sFRP4 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:4.
- 11.- El uso según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho anticuerpo puede unirse a sFRP4 presente en orina humana.
- 12.- El uso según la reivindicación 10 u 11, en el que el anticuerpo no reacciona de forma cruzada con otras proteínas presentes en orina humana.
- 35 13.- El uso según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo es específico para sFRP4.
- 14.- El uso según la reivindicación 10 u 11, en el que el anticuerpo puede unirse a sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4 y sFRP5.
- 15.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el anticuerpo está inmovilizado sobre una fase sólida.
- 40 16.- El uso según la reivindicación 15, en el que la fase sólida es una tira reactiva.
- 17.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en el que dicho kit comprende además un segundo anticuerpo que puede unirse específicamente a sFRP4.
- 18.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que dicho kit comprende además un concentrado de tampón de lavado y/o una composición que comprende sFRP4.

Figura 1

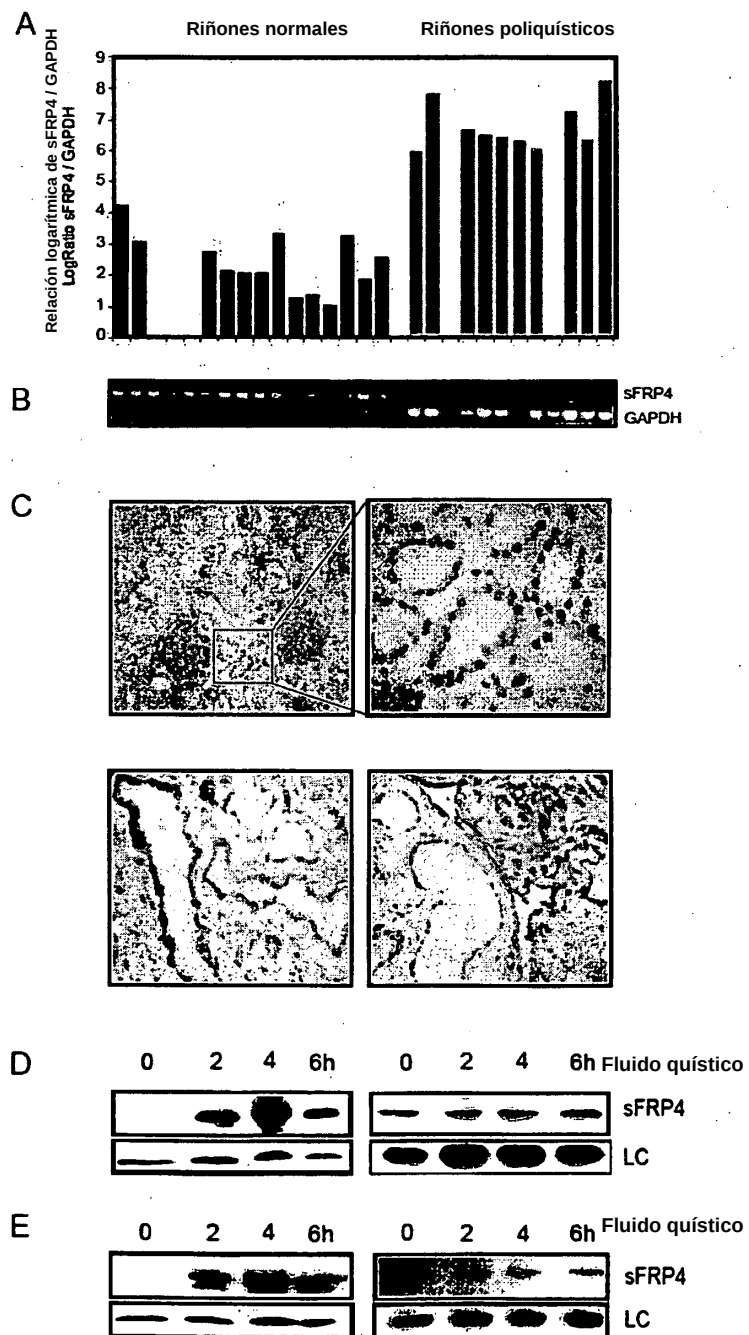


Figura 2!

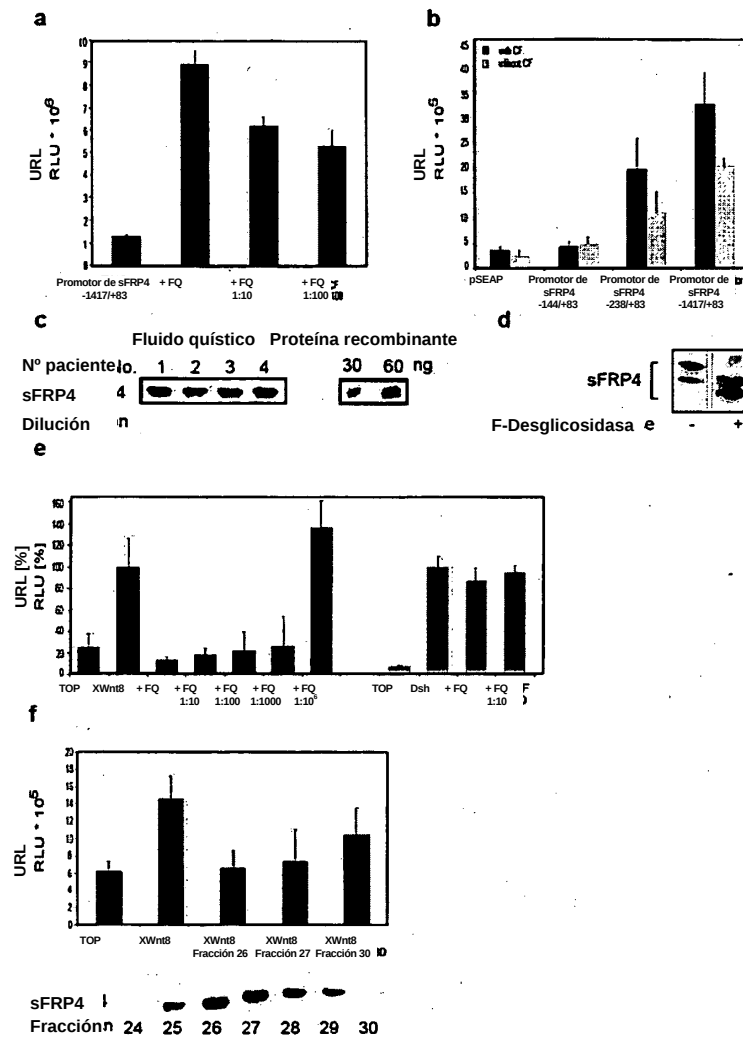


Figura 3

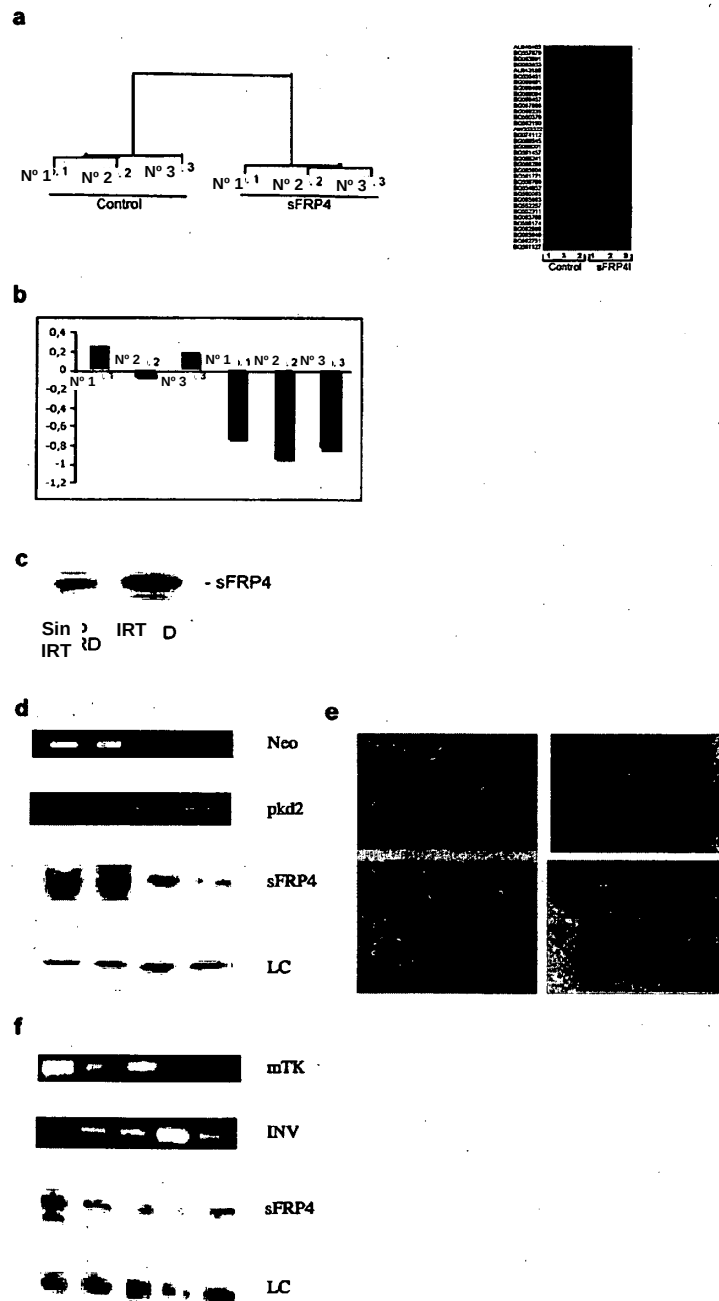


Figura 4

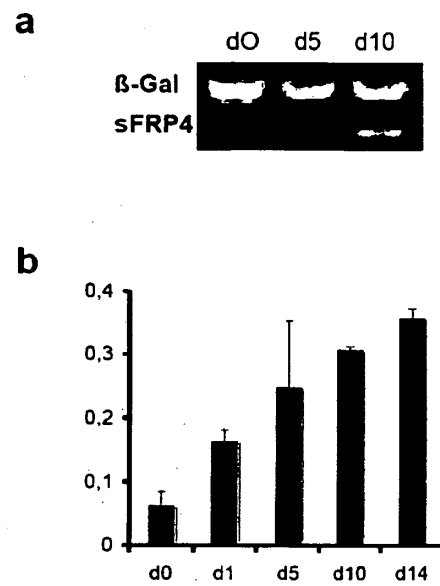


Figura 5

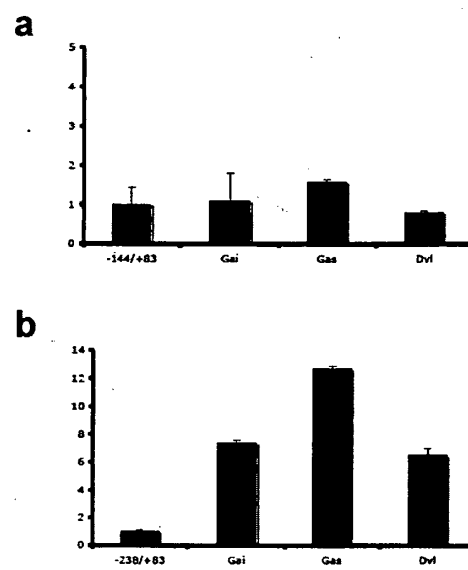


Figura 6

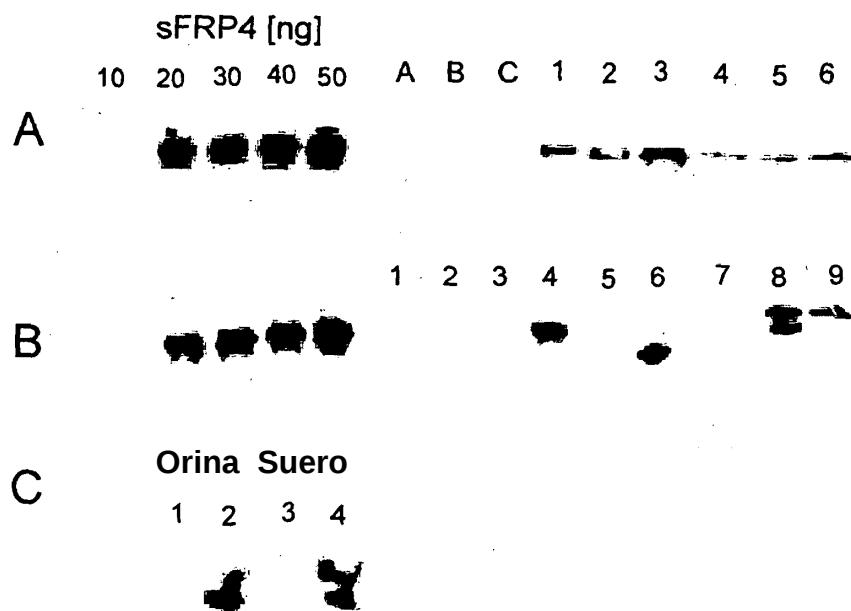


Figura 7

Secuencias de las proteínas 1-5 relacionadas con Frizzled secretadas humanas

SEQ ID NO:1 - sFRP1 humana (nº de registro: Q8N474))

```

1 mgigrseggr rgaalgvlla lgaallavgs aseydyvsfq sdigpyqsgf fytqppqcvd
61 ipadlrchn vgykkmvlpn llehetmaev kqgasswvpl lnknchagtq vflcslfapv
121 cldrpiypcr wlceavrdsc epvmqffgfy wpemlkcdkf pegdvciamt ppnateaskp
181 qgttvcppcd nelkseaiie hlcasfalr mkikevkken gdkkivpkkk kplklgpikk
241 kdlklvllyl kngadcpchq ldnlsfhfli mgrkvksqyl ltaihkwkdk nkefkfnmkk
301 mknhecpftq svfk

```

SEQ ID NO:2 - sFRP2 humana (nº de registro: AAH08666) 66)

```

1 mlqgpgslll lflashcclg sarglflfgq pdfsykrsnc kpipvnlqlc hgleyqnmrl
61 pnllghetmk evlegagawi plvmkqchpd tkkflcslfa pvclddldet iqpchslcvq
121 vkdrapvms afgfpwpdml ecdrfpqqnd lciplassdh llpateepak vceacknknd
181 ddndimetlc kndfalkikv keityinrdt kiiletkskt iyklngvser dlkksvlwlk
241 dslqctceem ndinapylvm gqkqggelvi tsvkrwqkgq refkrisrsi rklqg

```

SEQ ID NO:3 - sFRP3 humana (nº de registro: Q92765))

```

1 mvcgspggml llragllala alcllrvgpa raaacepvri plckslpwnm tkmpnhlhhs
61 tqanailaie qfegllgthc spdlfflca myapictidf qhepikpcks vcerarqgce
121 pilikyhrsw penlaceelp vydrqvcisp eaivtadgad fpmdssngnc rgasserckc
181 kpiratqkty frnnynyvir akvkeiktke hdvtavvevk eilksslvni prdtvnlyts
241 sgclcpplnv neeyiimgye deersrlllv egsiaekwkd rlgkkvkrwd mklrlhlglsk
301 sdssnsdstg sqksgrnsnp rqarn

```

SEQ ID NO:4 - sFRP4 humana (nº de registro: CAG46555) .55)

```

1 mflsilvalc lwlhlalgv gapceavrip mcrhmpwnit rmpnhlhst qenailaieq
61 yeelvdvncs avlrfflcam yapictlefl hdpikpcksv cqrarddcep lmkmyhswp
121 eslacdelpv ydrqvcispe vivtdlpedv kwiditpdmv vqerpldvdc krlspdrckc
181 kkvkptlaty lsknysyvi akikavqrsq cnevttvvdv keifkssspi prtqvpltn
241 sscqcpilp hqdvlimcy wsrmmllen clvekwrqdl skrsiqweer lqeqrrtvqd
301 kkktagrtsr snppkpkgkp papkpaspkk niktrsaqr tnpkrv

```

SEQ ID NO:5 - sFRP5 humana (nº de registro: AAH50435) 35)

```

1 mraaaaaggv rtaalalllg alhwaparce eydygwqae plhgrsyskp pqclldipadl
61 plchtvgykr mrlpnllehe slaevkqgas swlpallakrc hsdtdqvlcs lfapvcldrp
121 iypcrslcea vragcaplme aygfpwpeml hchkfpldnd lciavqfghl patappvtki
181 caqcemehsa dglmeqmcss dfvvkmrike ikiengdrkl igaqkkkkl kpgplkrkdt
241 krlvlhmknq agcpqpqls lagsflvmgr kvdgqlllma vyrwdkknke mkfakvfmfs
301 ypcsllypff ygaaeph

```

Figura 8

Alineamiento de las FRP1-5 humanas:

		10	20	30	
1	M R A A A A G G V R T A A L - - A L L L G A L H W A P A R				hFRP5
1	M G I G R S E G G R R G A A L G V L L A L G A A L L A V G S				hFRP1
1	M L Q G P - - - - - G S L - - L L L F L A S H C C L G S				hFRP2
1	M V C G S P G G - - - - - - - - M L L L R A G L L A L A A				hFRP3
1	- - - - - - - - - - - - - - M F L S - - - I L V A L C				hFRP4
		40	50	60	
29	C E E Y D Y Y G W Q A E P - - - L H G R S Y S K P P Q C L D				hFRP5
31	A S E Y D Y V S F Q S D I G P Y Q S G R F Y T K P P Q C V D				hFRP1
22	A R G L F L F G - Q P D F - - - - - S Y K R S - N C K P				hFRP2
22	L C L L R V P G - - - - - - - - - - A R A A A C E P				hFRP3
11	L W L H L A L G - - - - - - - - - - M R G A P C E A				hFRP4
		70	80	90	
56	I P A D L P L C H T V G Y K R M R L P N L L E H E S L A E V				hFRP5
61	I P A D L R L C H N V G Y K K M V L P N L L E H E T M A E V				hFRP1
43	I P A N L Q L C H G I E Y Q N M R L P N L L G H E T M K E V				hFRP2
38	V R - - I P L C K S L P W N M T K M P N H L H H S T Q A N A				hFRP3
27	V R - - I P M C R H M P W N I T R M P N H L H H S T Q E N A				hFRP4
		100	110	120	
86	K Q Q A S S W L P L L A K R C H S D T Q V F L C S L F A P V				hFRP5
91	K Q Q A S S W V P L L N K N C H A G T Q V F L C S L F A P V				hFRP1
73	L E Q A G A W I P L V M K Q C H P D T K K F L C S L F A P V				hFRP2
66	I L A I E Q F E G L L G T H C S P D L L F F L C A M Y A P I				hFRP3
55	I L A I E Q Y E E L V D V N C S A V L R F F L C A M Y A P I				hFRP4
		130	140	150	
116	C - L D - - - R P I Y P C R S L C E A V R A G C A P L M E A				hFRP5
121	C - L D - - - R P I Y P C R W L C E A V R D S C E P V M Q F				hFRP1
103	C - L D D L D E T I Q P C H S L C V Q V K D R C A P V M S A				hFRP2
96	C T I D F Q H E P I K P C K S V C E R A R Q G C E P I L I K				hFRP3
85	C T L E F L H D P I K P C K S V C Q R A R D D C E P L M K M				hFRP4
		160	170	180	
142	Y G F P W P E M L H C H K F P L - D N D L C I A V Q F G - H				hFRP5
147	F G F Y W P E M L K C D K F P - - E G D V C I A M T P P N A				hFRP1
132	F G F P W P D M L E C D R F P Q - D N D L C I P L A S S D H				hFRP2
126	Y R H S W P E N L A C E E L P V Y D R G V C I S P E A I V T				hFRP3
115	Y N H S W P E S L A C D E L P V Y D R G V C I S P E A I V T				hFRP4

Figura 8 (continuación)

	190	200	210	
170	L P A T A P P - - - - -	- - - - -	- - - - -	V T K I hFRP5
175	T E A S K P Q - - - - -	- - - - -	- - - - -	G T T V hFRP1
161	L L P A T E E - - - - -	- - - - -	- - - - -	A P K V hFRP2
156	A D G A D F P - M D S S - - - - -	- - - - -	- - - - -	N G N C R G A S hFRP3
145	D L P E D V K W I D I T P D M M V Q E R P L D V D C K R L S			hFRP4
	220	230	240	
181	C A Q C E M E H S A D G - L M E Q M C S S D F V V K M R I K			hFRP5
186	C P P C D N E L K S E A - I I E H L C A S E F A L R M K I K			hFRP1
172	C E A C K N K N D D D N D I M E T L C K N D F A L K I K V K			hFRP2
175	S E R C K C K P I R A T Q K T Y F R N N Y N Y V I R A K V K			hFRP3
175	P D R C K C K K V K P T L A T Y L S K N Y S Y V I H A K I K			hFRP4
	250	260	270	
210	E I K I E N G D R K L I G A Q K K K K L L K P G P L K R K D			hFRP5
215	E V K K E N G D K K I V - - P K K K K P L K L G P I K K K D			hFRP1
202	E I T Y I N R D T K I I L E T K S K T I Y K L N G V S E R D			hFRP2
205	E I K - - T K C H D V T A V V E V K E I L K S S L V N - - -			hFRP3
205	A V Q R - S G C N E V T T V V D V K E I F K S S S P - - -			hFRP4
	280	290	300	
240	T K R L V L H M K N G A G C P C P Q L D S L A G S F L V M G			hFRP5
243	L K K L V L Y L K N G A D C P C H Q L D N L S H H F L I M G			hFRP1
232	L K K S V L W L K D S L Q C T C E E M N D I N A P Y L V M G			hFRP2
230	I P R D T V N L Y T S S G C L C P P L N - V N E E Y I I M G			hFRP3
230	I P R T Q V P L I T N S S C Q C P H I L - P H Q D V L I M C			hFRP4
	310	320	330	
270	R - - K V D G Q L L L M A - - - - -	- - - - -	- - - - -	V Y R hFRP5
273	R - - K V K S Q Y L L T A - - - - -	- - - - -	- - - - -	I H K hFRP1
262	Q - - K Q G G E L V I T S - - - - -	- - - - -	- - - - -	V K R hFRP2
259	Y E D E E R S R L L L V E G S I A E K W K D R L G K K V K R			hFRP3
259	Y - - E W R S R M M L L E N C L V E K W R D Q L S K R S I Q			hFRP4
	340	350	360	
284	W D K K N K E M K F - - - - -	A V K F M F S Y P C S L Y Y P F		hFRP5
287	W D K K N K E F K N - - - - -	F M K K M K N H E C P T F Q S V		hFRP1
276	W Q K G Q R E F K R - - - - -	I S R S I R K L Q C		hFRP2
289	W D M K L R H L G - - - - -	L S K S D S S N S D S T Q S Q K		hFRP3
287	W E E R L Q E Q R R T V Q D K K K T A G R T S R S N P P K P			hFRP4
	370	380	390	
310	F Y G A A E P H			hFRP5
313	F K			hFRP1
295				hFRP2
314	S G R N S N P R Q A R N			hFRP3
317	K G K P P A P K P A S P K K N I K T R S A Q K R T N P K R V			hFRP4

Figura 9

