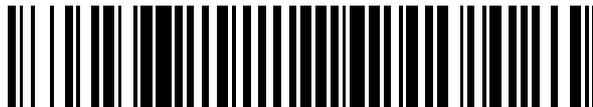


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 483**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2009 E 09758265 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2295966**

54 Título: **Método de detección y kit de detección de nefropatía por IgA**

30 Prioridad:

02.06.2008 JP 2008144882

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

06.05.2013

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**OBARA, TAKASHI y
MIZOGUCHI, SADA AKI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 402 483 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de detección y kit de detección de nefropatía por IgA

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método para detectar nefropatía por IgA y al uso de un kit de ensayo.

10 TÉCNICA DE ANTECEDENTES

15 La nefropatía por IgA es una enfermedad que fue citada por Berger, et al., en 1968, y es la enfermedad del riñón más frecuente entre la glomerulonefritis crónica que no sea la nefropatía diabética (por ejemplo, véase el documento no patente N° 1). La nefropatía por IgA es una enfermedad con un deficiente diagnóstico a largo plazo, y se estima que aproximadamente el 25% de los pacientes con insuficiencia renal terminal que necesitan un tratamiento de diálisis padecen nefropatía por IgA como enfermedad de origen. A pesar de que existen métodos para demorar el progreso de la nefropatía por IgA, no se ha encontrado método terapéutico alguno para tratar la enfermedad. Sin embargo, recientemente se ha establecido un método de tratamiento por parte de Hotta, et al., mediante el cual se consigue una remisión completa si el tratamiento se inicia en una fase temprana.

20 Mientras tanto, de acuerdo con "Joint Committee of the Specified Progressive Diseases Investigative Research Division for Progressive Renal Diseases of the Ministry of Health and Welfare and the Japanese Society of Nephrology", al tiempo que se emplean un análisis de orina (hematuria microscópica continua, proteinuria continua o intermitente, hematuria macroscópica) y un ensayo de sangre (el valor de IgA del suero sanguíneo es 350 mg/dL o superior) como criterios de diagnóstico suplementarios, la confirmación de la precipitación de IgA en una zona mesangial glomerular basada en la biopsia del riñón son los únicos medios para un diagnóstico definitivo de nefropatía por IgA. Sin embargo, dado que la biopsia del riñón requiere hospitalización durante una semana aproximadamente y es un método arriesgado que va acompañado de hemorragia grave, la tasa de diagnóstico no es necesariamente elevada. Así, se necesita un método de detección mediante el cual se pueda diagnosticar de manera conveniente y segura una nefropatía por IgA temprana.

30 Además, a pesar de que se conocen métodos tales como los que utilizan un complejo de IgA-fibronectina como métodos de diagnóstico para la nefropatía por IgA (por ejemplo, véase la solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) N° 2000-241431, patente japonesa (JP-B) N° 2592121, y Cederholm et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 4865-8, 1988), hasta la fecha no se ha desarrollado ningún método práctico.

35 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

40 Un objeto de la invención consiste en proporcionar un método de ensayo de la nefropatía por IgA y el uso de un kit de ensayo que tenga una buena sensibilidad de detección y especificidad y que pueda evaluar de manera conveniente y segura la existencia de nefropatía por IgA.

45 MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

Como resultado de una amplia investigación y midiendo la cantidad de un complejo de uromodulina e IgA en la orina humana, los autores de la invención encontraron que el complejo estaba presente en una concentración mayor en un paciente con nefropatía por IgA en comparación con una persona sana o un paciente que tuviera una enfermedad renal distinta a la nefropatía por IgA y, por lo tanto, completaron la invención.

50 Así, los medios específicos para resolver los problemas anteriores se muestran a continuación.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de ensayo de la nefropatía por IgA que comprende una etapa de detección de un complejo para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto. Se prefiere que la etapa de detección del complejo comprenda poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra la uromodulina humana y en contacto con un anticuerpo contra IgA humana. Además de ello, se prefiere que el método comprenda, además, una etapa de obtener la relación de la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección del complejo a la cantidad de

proteínas urinarias en la muestra derivada de la orina recogida del sujeto. Es más preferible que el método comprenda, además, una etapa de determinación para evaluar la existencia de nefropatía por IgA en base a la relación anterior.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método de ensayo de una enfermedad renal, que comprende una etapa de detección de un complejo para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto. Se prefiere que la etapa de determinación del complejo comprenda poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana.

10 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un método de ensayo de la nefropatía por IgA que comprende una etapa de detección de un complejo para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto, una primera etapa de determinación para evaluar la existencia de una enfermedad renal sobre la base de al menos una cantidad del complejo detectado en la etapa de detección del complejo o una cantidad de proteínas urinarias en la muestra, y una segunda etapa de determinación para evaluar si la enfermedad renal es nefropatía por IgA en base a la relación de la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección del complejo a la cantidad de proteínas urinarias en la muestra.

15 La etapa de detección de un complejo de la invención es preferiblemente un método inmunoquímico que utiliza un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana y, más preferiblemente, un método sándwich que utiliza los mismos.

20 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana, que comprende una etapa de poner en contacto la muestra derivada de orina recogida de un sujeto con un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana. Se prefiere que el complejo sea detectado por un método inmunoquímico utilizando un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana. Es más preferible que el complejo sea detectado por un método de sándwich que utiliza los mismos.

25 Además, el sujeto es preferiblemente una persona que ha desarrollado una enfermedad renal, una persona de la que se sospecha que ha desarrollado una enfermedad renal o una persona que tiene la posibilidad de desarrollar una enfermedad renal. La enfermedad renal es preferiblemente nefropatía por IgA.

30 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se encuentra el uso de un kit de ensayo para una enfermedad renal que comprende al menos un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana. La enfermedad renal es preferiblemente nefropatía por IgA.

EFFECTOS DE LA INVENCION

35 De acuerdo con la invención, se proporciona un método de ensayo de la nefropatía por IgA y el uso de un kit de ensayo que tiene una buena sensibilidad de detección y especificidad y que puede evaluar de manera conveniente y segura la existencia de nefropatía por IgA.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

40 La Fig. 1 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA.

45 La Fig. 2 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC (siglas inglesas de Característica Operativa del Receptor) de los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA.

50 La Fig. 3 es un diagrama de distribución que muestra los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA, siendo corregidos los valores medidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

55 La Fig. 4 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC de los valores de medición del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA, en que los valores medidos son corregidos

frente a la concentración de proteínas urinarias.

La Fig. 5 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ECL.

5 La Fig. 6 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC de los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ECL.

10 La Fig. 7 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ECL, siendo corregidos los valores medidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

15 La Fig. 8 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC de los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ECL, en que los valores medidos son corregidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

La Fig. 9 muestra los resultados de la transferencia Western de proteínas que se unen a perlas que incluyen anticuerpo anti-IgA.

20 La Fig. 10 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA.

La Fig. 11 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos a partir del análisis ROC de los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA.

25 La Fig. 12 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA, siendo corregidos los valores medidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

30 La Fig. 13 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC de los valores de medición del complejo de IgA-uromodulina en orina que es detectado por ELISA, en que los valores medidos son corregidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

35 La Fig. 14 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos de uromodulina humana en orina que es detectada por ELISA.

La Fig. 15 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos de IgA humana en orina que es detectada por ELISA.

40 La Fig. 16 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC de los valores medidos de IgA humana en orina que es detectada por ELISA.

La Fig. 17 es una gráfica de distribución que muestra los valores medidos de IgA humana en orina que es detectada por ELISA, siendo corregidos los valores medidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

45 La Fig. 18 es un diagrama que muestra los resultados obtenidos del análisis ROC de los valores de medición de IgA humana en orina que es detectada por ELISA, en que los valores medidos son corregidos frente a la concentración de proteínas urinarias.

MEJORES MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

50 En lo que sigue se describirán específicamente realizaciones a modo de ejemplo de la invención. Sin embargo, el alcance de la invención no se limita a las mismas.

55 El método de ensayo de la enfermedad renal de la invención comprende una etapa de detección de un complejo para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana a partir de una muestra derivada de la orina recogida de un sujeto. Al detectar el complejo a partir de la muestra, se puede detectar una enfermedad renal del sujeto con una buena sensibilidad de detección y una buena especificidad. En este contexto, la enfermedad renal incluye nefropatía por IgA y enfermedades renales distintas a nefropatía por IgA.

5 De acuerdo con la invención, la muestra puede ser la propia orina que se recoge de un sujeto o la orina obtenida después de un tratamiento tal como dilución, concentración y similares que se realiza habitualmente en la orina recogida. De acuerdo con la invención, la muestra preferida es una muestra de orina obtenida al diluir orina recogida de un ser humano en base a un método general.

10 Además de ello, la muestra derivada de la orina recogida del sujeto se puede obtener poniendo la muestra de orina anterior en contacto con un anticuerpo contra uromodulina humana o en contacto con un anticuerpo contra IgA humana.

15 Uromodulina humana (a la que en lo que sigue se puede aludir simplemente como "uromodulina") es una glicoproteína derivada del riñón que tiene un peso molecular de 85 kd. Se sabe que la uromodulina se une a IL1 y TNF y que actúa para inhibir IL1, y se piensa que tiene un efecto antiinflamatorio. Además de ello, se sabe que la uromodulina existe en grandes cantidades en la orina durante el embarazo.

20 Se sabe que el resto proteico de uromodulina es el mismo que el resto proteico de la proteína de Tamm-Horsfall, que es la glicoproteína dominante en la orina recogida de una persona sana. Sin embargo, nada se conoce con respecto a la relación entre la uromodulina y la enfermedad renal.

25 En la invención, las expresiones "uromodulina humana" y "uromodulina" incluyen la propia uromodulina y la proteína de Tamm-Horsfall.

30 El método de detección de un complejo no está específicamente limitado, y se pueden utilizar métodos de detección de proteínas que se utilizan generalmente en la técnica. Preferiblemente, el método de detección es un método que permite una cuantificación o semi-cuantificación del complejo que se ha de detectar. Ejemplos incluyen un método que utiliza un anticuerpo que se une al complejo, cromatografía de intercambio de iones y espectroscopía de masas.

35 De acuerdo con la invención, el aparato que se utiliza para la detección del complejo no está específicamente limitado, y se puede seleccionar apropiadamente en función de un método de detección del complejo. Ejemplos específicos incluyen un aparato de HPLC, un aparato para la espectrometría de masas, un aparato para la electroforesis (un aparato para la electroforesis capilar y similares), un aparato totalmente automático o semi-automático para el inmunoensayo enzimático, un lavador de células, un aparato totalmente automático o semi-automático para el inmunoensayo de quimioluminiscencia, un aparato para detectar la luminiscencia, un aparato totalmente automático o semi-automático para el inmunoensayo de electro-quimioluminiscencia, un aparato para la medición óptica, un lector de placas, una cámara CCD, un aparato totalmente automático o semi-automático para el inmunoensayo de fluorescencia, un aparato para la medición de la fluorescencia, un aparato totalmente automático o semi-automático para el radioinmunoensayo, un contador de centelleo líquido, un contador Coulter, un aparato para medir el plasmón de superficie y un aparato para transferencia y un densitómetro.

40 Desde el punto de vista de la sensibilidad, especificidad y conveniencia de detección, en la invención se prefiere un método inmunoquímico que utilice un anticuerpo que se une al complejo. En cuanto al anticuerpo contra el complejo, éste no está específicamente limitado, si puede reconocer al complejo con una inmuno-especificidad y puede unirse al complejo. Ejemplos incluyen un anticuerpo que reconoce el sitio de unión de uromodulina e IgA en el complejo, un anticuerpo que reconoce el resto uromodulina en el complejo y un anticuerpo que reconoce el resto IgA en el complejo.

45 En la memoria descriptiva de la invención, la expresión "anticuerpo contra el complejo" puede tener la misma definición que el significado general de anticuerpo tal como en "anticuerpo que reconoce el complejo" y "anticuerpo que se une al complejo". Específicamente, el "anticuerpo contra el complejo" se une a al menos parte del complejo que consiste en uromodulina humana e IgA humana para formar un nuevo complejo. En lo que sigue en esta memoria, esto mismo es cierto para las expresiones "anticuerpo contra uromodulina humana" y "anticuerpo contra IgA humana".

50 En cuanto al método inmunoquímico utilizado en la invención, se puede utilizar sin limitación alguna un método que generalmente se utilice en la técnica. Ejemplos específicos incluyen inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de electro-quimioluminiscencia, determinación de la absorbancia, un método de anticuerpo fluorescente, radioinmunoensayo (RIA), resonancia de plasmón de

superficie, borrones de transferencia Western y borrones de puntos. Desde el punto de vista de la sensibilidad, especificidad y conveniencia de detección, es preferible utilizar el inmunoensayo enzimático (ELISA) en la invención.

- 5 En cuanto a un método inmunoquímico utilizado en la invención, desde el punto de vista de la especificidad y conveniencia, es preferible un método de sándwich que utilice un anticuerpo que reconozca y se una a uromodulina humana en el complejo y un anticuerpo que reconozca y se una a IgA humana en el complejo.

10 El método de sándwich se puede llevar a cabo como sigue, por ejemplo. Un anticuerpo que se une al complejo (es decir, un anticuerpo primario) se inmoviliza sobre un soporte tal como una placa y similar. Generalmente, con el fin de bloquear un sitio de unión no específico en la placa, se realiza un proceso de bloqueo utilizando una proteína tal como caseína o un tensioactivo. Subsiguientemente, se añade e incuba una muestra derivada de orina o una muestra de ensayo. Después de lavar la placa, se añade, en calidad de un anticuerpo que se une al complejo, un anticuerpo secundario marcado, seguido de la incubación. Después se puede llevar a cabo el proceso lavando la placa y detectando la marca.

15 Desde el punto de vista de la sensibilidad de detección y la especificidad, es preferible que se utilicen dos tipos de anticuerpos seleccionados de los anticuerpos que se unen al complejo en calidad del anticuerpo primario y el anticuerpo secundario arriba descritos. Es más preferible que el anticuerpo contra uromodulina humana se utilice como uno del anticuerpo primario y el anticuerpo secundario descrito anteriormente, mientras que el anticuerpo contra IgA humana se utiliza como el otro anticuerpo. Es todavía más preferible que el anticuerpo contra uromodulina humana se utilice como el anticuerpo primario, mientras que el anticuerpo contra IgA humana se utilice como el anticuerpo secundario.

20 De acuerdo con la invención, el anticuerpo que se une al complejo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Desde el punto de vista de la especificidad para detectar una enfermedad renal es preferible un anticuerpo monoclonal.

25 El anticuerpo que se une al complejo se puede producir de acuerdo con un método generalmente realizado en la técnica.

30 El anticuerpo policlonal contra uromodulina humana se puede producir de acuerdo con un método de producción general utilizado en la técnica. Dicho anticuerpo se puede obtener como sigue, por ejemplo. Un animal tal como un conejo o una cabra se inmuniza con uromodulina para obtener suero sanguíneo, el cual se purifica luego mediante precipitación con sulfato de amonio, columna de proteína A, columna de proteína G, cromatografía de intercambio de iones DEAE, una columna de afinidad a la que se fija uromodulina, o similar para la producción.

35 De acuerdo con la invención, es preferible el anticuerpo que tenga una mayor especificidad para uromodulina humana, a partir de la cual anticuerpos que se unen a antígenos que no sean uromodulina humana se separan por un método general utilizado en la técnica, por ejemplo, un proceso de absorción.

40 Además de ello, para producir el anticuerpo monoclonal contra uromodulina humana, un animal pequeño tal como un ratón se inmuniza con uromodulina, después se recoge el bazo del ratón y se homogeneiza para aislar las células que luego se fusionan con células de mieloma de ratón utilizando un reactivo tal como polietilenglicol, y a partir de las células fusionadas resultantes (es decir, hibridoma) se selecciona un clon que produce un anticuerpo que se une a uromodulina humana. Subsiguientemente, el hibridoma seleccionado se introduce en una cavidad abdominal de un ratón, y el anticuerpo monoclonal que se obtiene de ascitis recuperado del mismo animal se purifica mediante precipitación con sulfato de amonio, columna de proteína A, columna de proteína G, cromatografía de intercambio de iones DEAE, una columna de afinidad a la que se fija uromodulina.

45 Con respecto al anticuerpo contra uromodulina, se puede utilizar un anticuerpo anti-proteína de Tamm-Horsfall humana y un anticuerpo anti-uromodulina humana comercialmente disponibles.

50 Además de ello, el anticuerpo contra uromodulina humana puede ser cualquiera de un anticuerpo derivado de un pequeño animal tal como un ratón como el obtenido anteriormente, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano.

55 En cuanto al anticuerpo contra IgA humana, éste no está específicamente limitado siempre que sea un anticuerpo

capaz de unirse a IgA en el complejo. Dicho anticuerpo puede ser uno cualquiera que reconozca la cadena H, la cadena J, el componente secretor, o similar de IgA humana.

5 Además de ello, el anticuerpo contra IgA humana puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, desde el punto de vista de la especificidad de la detección para el complejo, es preferible un anticuerpo monoclonal contra IgA humana.

10 El anticuerpo monoclonal contra IgA humana puede producirse utilizando IgA humana como antígeno de la misma manera que el anticuerpo contra uromodulina humana. Además de ello, en cuanto al anticuerpo contra IgA humana, se puede utilizar un anticuerpo anti-IgA humana comercialmente disponible.

15 Todavía adicionalmente, el anticuerpo contra IgA humana puede ser cualquiera de un anticuerpo derivado de un animal pequeño tal como un ratón según se obtiene en lo que antecede, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano.

En cuanto al marcador, se puede utilizar cualquier marcador bien conocido en la técnica sin limitación específica. Ejemplos incluyen una enzima, una sustancia quimioluminiscente, una sustancia electro-quimioluminiscente, una sustancia radiactiva.

20 De acuerdo con la invención, desde el punto de vista de la sensibilidad de detección y de la conveniencia, es preferible utilizar una enzima como marcador.

25 La enzima no está específicamente limitada, siempre que sea una enzima que pueda ser cuantificada por un método físico o un método químico. Ejemplos incluyen una enzima tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante (HRP – siglas en inglés) y luciferasa.

30 Además de ello, un método para detectar el marcador no está específicamente limitado siempre que sea un método que permita una cuantificación o semi-cuantificación del marcador, y se puede seleccionar apropiadamente dependiendo del tipo de marcador. Ejemplos incluyen absorbancia, intensidad de luminiscencia, intensidad de fluorescencia y recuento de la radiactividad.

En base a la cuantificación o semi-cuantificación del marcador, se puede conseguir una cuantificación o semi-cuantificación del complejo.

35 Cuando la etapa de detección del complejo de la invención se lleva a cabo con determinación por absorbancia para detectar el marcador utilizando inmunoensayo enzimático (ELISA), un ejemplo de un aparato de medición para la detección del complejo que se utiliza preferiblemente en la invención es un aparato para la determinación de la absorbancia que permite la medición de la absorbancia de un cromóforo generado por el marcador que está unido al complejo y que está equipado con una parte de carga de la muestra en la que se carga una muestra que
40 contiene el cromóforo generado por el marcador, una parte que irradia luz, en la que la luz es irradiada sobre la muestra y una parte de medición de la cantidad de luz, en la que al menos una de la luz reflejada o la luz transmitida es recogida de la muestra y se mide la cantidad de luz recogida.

45 De acuerdo con la invención, al irradiar luz sobre el cromóforo que es generado por el marcador unido al complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra de ensayo (es decir, una muestra derivada de orina recogida de un sujeto) a través de la parte que irradia luz y cuantificar la absorbancia del cromóforo a través de la parte de medición de la cantidad de luz, se puede medir el contenido del complejo de uromodulina humana e IgA humana en la muestra.

50 Cuando la etapa de detección del complejo de la invención se lleva a cabo por medición de la luz emitida a partir de una muestra para detectar el marcador utilizando electro-quimioluminiscencia (ECL – siglas en inglés), un aparato que permite la medición de la luz emitida a partir del marcador unido al complejo propiamente dicho o a partir del sustrato en un líquido de la reacción, se utiliza como un aparato de medición para la detección del
55 complejo que se utiliza preferiblemente en la invención, y ejemplos incluyen un aparato de medición equipado con una parte de carga de la muestra, en la que se carga una muestra que contiene el marcador y una parte de medición de la cantidad de luz, en la que la luz emitida es recogida de la muestra y se mide la cantidad de luz recogida.

De acuerdo con la invención, al cuantificar la luz emitida a partir de una muestra que contiene el marcador que está unido al complejo de uromodulina humana e IgA humana contenida en una muestra de ensayo a través de una parte de medición de la cantidad de luz, se puede medir el contenido del complejo de uromodulina humana e IgA humana contenido en una muestra de ensayo.

5 El método de ensayo de la enfermedad renal de la invención comprende preferiblemente una etapa para evaluar la existencia de una enfermedad renal basada en la cantidad detectada del complejo contenido en una muestra derivada de orina. En cuanto a la cantidad detectada del complejo, siempre que sea la concentración del complejo contenido en una muestra derivada de orina o el valor cuantitativo o un valor semi-cuantitativo correspondiente a la misma, ésta se puede utilizar sin limitación específica. Ejemplos incluyen un valor de medición obtenido al medir directamente la cantidad detectada del complejo, un valor de medición obtenido al medir indirectamente la cantidad detectada del complejo a través de detección del marcador.

15 Además, cuando se examina una nefropatía por IgA por el método de ensayo de la enfermedad renal de la invención, es preferible que la cantidad detectada del complejo utilizada para evaluar la existencia de nefropatía por IgA sea la relación de la cantidad detectada del complejo a la cantidad total de proteínas urinarias en la muestra derivada de la orina recogida de un sujeto. La relación puede ser cualquier valor que se obtenga al dividir el valor medido de la cantidad detectada del complejo por el valor medido de la cantidad total de proteínas urinarias en la muestra derivada de orina recogida de un sujeto, o la cantidad detectada del complejo que se obtiene como un valor relativo en comparación con la cantidad total de proteínas urinarias. Al llevar a cabo la determinación en base a esta relación, la nefropatía por IgA se puede determinar con una sensibilidad y especificidad mayores.

25 Además de ello, en relación con la muestra derivada de la orina recogida de un sujeto a partir de la cual se mide la cantidad total de proteínas urinarias, siempre que se obtenga del mismo sujeto, ésta puede ser una muestra diferente de la muestra derivada de la orina que se utilice para la detección del complejo según se describe arriba.

30 La etapa de determinación del método de ensayo de la enfermedad renal de la invención comprende preferiblemente una etapa de comparar la cantidad detectada del complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto con la cantidad detectada del complejo en muestras derivadas de orina de personas sanas en calidad de testigo, y una etapa de correlacionar un caso en el que la cantidad detectada del complejo en la muestra derivada de la orina recogida de un sujeto sea mayor que la cantidad detectada del complejo en la muestra derivada de orina de personas sanas en calidad de testigo, con la existencia de una enfermedad renal.

35 En esta memoria, las personas sanas en calidad de testigo significan individuos de quienes previamente se ha determinado que no tienen incidencia de una enfermedad renal. Además, la expresión "cantidad detectada es mayor" indica que la cantidad detectada del complejo derivado de un sujeto es mayor que la cantidad detectada normal (es decir, un valor de corte) que se establece con el fin de distinguir personas sanas de pacientes con una enfermedad renal.

45 El valor de corte se puede establecer, por ejemplo, sometiendo la cantidad detectada del complejo en un grupo de muestra derivado de orina de pacientes que tengan una enfermedad renal y la cantidad detectada del complejo en un grupo de muestra derivado de orina de personas sanas en calidad de testigo a un análisis ROC. El análisis ROC es un método analítico que permite, por ejemplo, la evaluación de la detectabilidad y capacidad de diagnóstico de un método de examinar una enfermedad. Es un método de análisis descrito en Journal of The Japan Society for Clinical Laboratory Automation, "Manual for evaluation of diagnostic usefulness of clinical test", Ver. 1.3 (2004.9.1), vol. 29, Supl. 1 (Número de Serie 154) (publicado el 1 de sep. de 2004), por ejemplo.

50 Además de ello, el valor de corte se puede definir como un valor que se obtiene añadiendo dos o tres veces la desviación estándar a un nivel de detección medio en personas sanas, o puede definirse adecuadamente como un valor que satisface tanto la sensibilidad (relación de detección) como la especificidad (es decir, relación falsa positiva baja) en equilibrio.

55 Ejemplos de la enfermedad renal de la invención incluyen nefropatía por IgA (IgAN), nefropatía membranosa (MN), nefropatía por lupus (SLE), glomeruloesclerosis focal (FGS), síndrome nefrítico por cambios mínimos (MCNS), nefropatía diabética (DMN), amiloidosis, nefropatía hereditaria (Alport), nefropatía por IgA extinguida (estado espontáneamente remitido de nefropatía por IgA), glomerulonefritis membrano-proliferativa (MPGN), nefritis

relacionada con anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA), enfermedad de la membrana basal delgada (TBMD), nefroesclerosis.

5 De acuerdo con el método de ensayo de la enfermedad renal de la invención, al detectar el complejo en orina se pueden detectar diversas enfermedades renales, incluida nefropatía por IgA.

10 El método de ensayo de la nefropatía por IgA de la invención se caracteriza porque comprende una etapa de detección de un complejo para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto, una etapa de determinación para evaluar la existencia de una enfermedad renal basada en la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección de un complejo o en la cantidad de proteínas urinarias en la muestra derivada de orina recogida de un sujeto, y una etapa de determinación para evaluar si la enfermedad renal es nefropatía por IgA basada en la relación de la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección de un complejo a la cantidad de proteínas urinarias en la muestra derivada de orina recogida de un sujeto.

15 Al evaluar la existencia de nefropatía por IgA en base a la relación de la cantidad detectada del complejo a la cantidad total de proteínas urinarias en la muestra derivada de orina, se puede determinar de manera conveniente y segura la existencia de nefropatía por IgA con una elevada sensibilidad y elevada especificidad incluso en una fase temprana de la enfermedad en la que se puede obtener una remisión completa mediante intervención terapéutica.

20 La etapa de detección de un complejo de acuerdo con la invención es la misma que la etapa de detección de un complejo para el método de ensayo de la enfermedad renal descrito anteriormente.

25 Además de ello, en cuanto al método para detectar la cantidad de proteínas urinarias, si éste permite la medición de la cantidad total de proteínas urinarias en la muestra derivada de orina se puede utilizar, sin limitación específica, un método para detectar proteínas en una muestra derivada de orina que generalmente se realiza en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar el método descrito en la bibliografía ("Revised edition of outlines for clinical test, 32nd edition" de Kanai Mitsumasa et al., páginas 173-174, 2005).

30 Con respecto a la primera etapa de determinación de la invención, la evaluación de la existencia de una enfermedad renal basada en la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección del complejo es la misma que la etapa de determinación del método de ensayo de la enfermedad renal arriba descrito.

35 Además de ello, la etapa de evaluar la existencia de una enfermedad renal basada en la cantidad de proteínas urinarias en la muestra derivada de orina comprende preferiblemente una etapa de correlacionar el caso en el que la cantidad de proteínas urinarias en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto es mayor que la cantidad normal detectada (es decir, un valor de corte) que se establece con el fin de distinguir pacientes con una enfermedad renal de personas normales, con la existencia de una enfermedad renal.

40 En esta memoria, la cantidad detectada normal de proteínas urinarias se puede definir por un método general.

45 La etapa de determinación secundaria de la invención comprende preferiblemente una etapa de comparar la relación de la cantidad detectada del complejo en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto a la cantidad total de proteínas en la muestra (es decir, la proteína del complejo/total) con la relación de la cantidad detectada del complejo en una muestra derivada de orina recogida de sujetos que tienen una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA en calidad de un testigo a la cantidad total de proteínas en la muestra, y correlacionar el caso en el que la relación de la cantidad detectada del complejo en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto a la cantidad total de proteínas en la muestra es mayor que la relación de la cantidad detectada del complejo en una muestra derivada de orina recogida de sujetos que tienen una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA como un testigo a la cantidad total de proteínas en la muestra, con la existencia de nefropatía por IgA.

50 En esta memoria, relación más elevada significa que la relación de la cantidad detectada del complejo derivado de un sujeto es mayor que el valor de corte que se determina para distinguir nefropatía por IgA de enfermedades renales que no sean nefropatía por IgA.

55 El valor de corte se puede establecer de modo que tenga el mismo valor que el valor de corte descrito con detalle

anteriormente para el método de ensayo de la enfermedad renal. Sin embargo, desde el punto de vista de la especificidad de detección, el valor de corte se evalúa preferiblemente en base a los resultados del análisis ROC.

5 De acuerdo con el método de ensayo de la nefropatía por IgA de la invención, se miden la cantidad detectada del complejo y la cantidad total de proteínas en la orina y la nefropatía por IgA se puede evaluar en base a la relación de la cantidad detectada del complejo a la cantidad de proteínas totales. Por lo tanto, es un método conveniente y seguro para detectar la nefropatía por IgA.

10 El método para detectar el complejo de uromodulina humana e IgA humana de la invención comprende una etapa de poner en contacto la muestra derivada de orina recogida de un sujeto con un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana. Como resultado, el complejo de uromodulina humana e IgA humana se puede detectar con una elevada sensibilidad y una elevada especificidad.

15 Lo descrito en detalle anteriormente en relación con la etapa de detección del complejo para el método de ensayo de la enfermedad renal también se puede aplicar al método para detectar el complejo de esta invención.

20 Además de ello, el sujeto es preferiblemente una persona que ha desarrollado una enfermedad renal, una persona de la que se sospecha que haya desarrollado una enfermedad renal o una persona que tenga la posibilidad de desarrollar una enfermedad renal. En esta memoria, una persona que tiene la posibilidad de desarrollar una enfermedad renal significa una persona que no es una persona que haya desarrollado una enfermedad renal ni una persona de la que se sospeche que haya desarrollado una enfermedad renal. Todavía adicionalmente, la enfermedad renal es más preferiblemente nefropatía por IgA.

25 El kit de ensayo para una enfermedad renal de la invención se caracteriza porque comprende al menos un anticuerpo contra uromodulina humana y al menos un anticuerpo contra IgA humana. Al detectar el complejo de uromodulina humana e IgA humana utilizando el anticuerpo contra uromodulina humana y el anticuerpo contra IgA humana, la enfermedad renal se puede detectar con una buena sensibilidad de detección y una buena especificidad.

30 Es preferible que el kit de ensayo para una enfermedad renal de la invención comprenda, además, una instrucción que describa poner en contacto la muestra derivada de orina recogida de un sujeto con el anticuerpo contra uromodulina humana y el anticuerpo contra IgA humana para detectar el complejo de uromodulina humana e IgA humana, y correlacionar la cantidad detectada con la existencia de una enfermedad renal.

35 Además de ello, el kit de ensayo para una enfermedad renal de la invención se puede utilizar preferiblemente para evaluar la existencia de nefropatía por IgA.

EJEMPLOS

40 En lo que sigue, la presente invención se explica específicamente con referencia a ejemplos. Sin embargo, la invención no está limitada por los ejemplos. Además de ello, a menos que se mencione específicamente de otro modo, “%” representa porcentaje en masa.

[Ejemplo 1]

45 <Detección de enfermedad renal>

-Detección del complejo de IgA-uromodulina en orina basada en ELISA-

50 Anticuerpo anti-proteína de Tamm-Horsfall humana (fabricado por Cedarlane Laboratories) se purificó mediante PROSEP-A (fabricado por Millipore Corp.) seguido de diálisis frente a Tris 50 mM/HCl (pH 7,5) y NaCl 0,15 M. El anticuerpo purificado se diluyó hasta una concentración de 5 µg/ml a 10 µg/ml utilizando Tris 50 mM/HCl (pH 7,5) y NaCl 0,15 M, y luego se añadió a copas PolySorp (fabricadas por NUNC) (50 µl/pocillo). Las copas se colocaron en una caja húmeda y el revestimiento se llevó a cabo durante una noche a 4°C. Después del revestimiento, estas copas se lavaron tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%), seguido de la adición de la disolución de bloqueo (N102 al 50% (fabricada por NOF Corp.), Tris 25 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 75 mM y Block Ace al 2% (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)) (150 µl/pocillo). Después de ello, el bloqueo se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 2 horas o a 4°C durante

un día o más (a lo que se alude en esta memoria a continuación como “copas anti-Tamm-Horsfall”).

Las copas anti-Tamm-Horsfall se lavaron tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%) y se añadieron con muestras de orina que se obtuvieron diluyendo 50 veces, utilizando una disolución de dilución de la muestra (N102 al 50% (fabricada por NOF Corp.), Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Block Ace al 2% (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)) en una cantidad de 50 µl/pocillo para la reacción a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%), anti-IgA humana de HRP (peroxidasa de rábano picante)-cabra (fabricada por Zymed Labs) que se diluyó 3.000 veces con Can Get Signal 2 (fabricado por Toyobo Inc.) se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con la disolución de lavado, sistema de sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para ELISA (fabricado por Sigma Chemical Corporation) se añadió en una cantidad de 100 µl/pocillo, seguido de la reacción a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de añadir H₂SO₄ 0,5 M (100 µl/pocillo) para terminar la reacción, se midió la DO (densidad óptica) (450 a 650 nm). En la Fig. 1 se muestran los resultados de la medición obtenidos de 147 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 95 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 20 casos de personas sanas (gente normal).

Al comparar el valor obtenido después de la sustracción del valor en blanco, se obtuvieron los resultados que demuestran una clara diferenciación de 147 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 95 casos de pacientes con nefropatía por IgA de 20 casos de personas sanas (gente normal).

Además de ello, se llevó a cabo un análisis ROC para 147 casos de pacientes con una enfermedad renal y 20 casos de personas sanas. En la Fig. 2 se muestra la curva ROC. El valor de corte calculado a partir de la curva ROC era 0,066. La relación de respuesta positiva en 147 casos de pacientes con una enfermedad renal y 20 casos de personas sanas, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 1. Tal como se muestra en la Tabla 1, había 134 casos que mostraban una respuesta positiva (91,2%) de los 147 casos de pacientes con una enfermedad renal en comparación con 1 caso que muestra una respuesta positiva (5%) de los 20 casos de personas sanas, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 91,2%, el grado de especificidad (especificidad) era 95% y la eficacia del diagnóstico era 91,6%.

Tabla 1

	Pacientes con enfermedad renal	Persona sana
Número de muestras	147	20
Número de respuestas positivas	134	1
Relación de respuestas positivas	91,2%	5,0%

<Detección de nefropatía por IgA>

Seguidamente, para las muestras que exhibían valores de desarrollo de color mayores que el valor de corte, la concentración de proteínas urinarias en la orina se cuantificó en base a un método del rojo de pirogalol. La cantidad de detección del complejo obtenido a partir de lo anterior se dividió por la concentración de proteínas urinarias y luego se calculó la cantidad de detección del complejo por cantidad de proteínas urinarias. Los resultados se muestran en la Fig. 3. Comparando la cantidad detectada del complejo por cantidad de las proteínas urinarias, se obtuvieron los resultados que demuestran que 86 casos de pacientes con nefropatía por IgA se pueden distinguir claramente de 47 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA.

Además de ello, como resultado de llevar a cabo un análisis ROC para 86 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 47 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, se obtuvo la curva ROC mostrada en la Fig. 4. El valor de corte calculado a partir de la curva ROC era 6,5. La relación de respuesta positiva en 86 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 47 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 2. Tal como se muestra en la Tabla 2, había 62 casos que mostraban una respuesta positiva (72,1%) de los 86 casos de pacientes con nefropatía con IgA en comparación con 13 casos que mostraban una respuesta positiva (27,7%) de los 47 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 72,1%, el grado de especificidad era 72,3% y la eficacia del diagnóstico era 72,2%.

Tabla 2

	Nefropatía por IgA	Enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA
Número de muestras	86	47
Número de respuestas positivas	62	13
Relación de respuestas positivas	72,1%	27,7%

[Ejemplo 2]

5 <Detección de la enfermedad renal>

- Detección del complejo de IgA-uromodulina en orina basado en electro-quimioluminiscencia (ECL) -

10 1 ml de Dynabeads M-450 Epoxy (fabricadas por Invitrogen Corporation) (30 mg/ml) fue atrapado con imanes y se lavó cinco veces con 1 ml de PBS-1 (tampón fosfato de potasio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8). Subsiguientemente, 1 ml de una disolución de un anticuerpo purificado contra anti-proteína de Tamm-Horsfall humana (fabricada por Cedarlane Laboratories) que había sido dializada frente al PBS-1 y preparada de modo que tuviera la concentración de 0,2 mg/ml, se añadió a las perlas atrapadas con imanes, seguido de mezclado a 25°C durante 20 horas.

15 Subsiguientemente, las perlas obtenidas de antes se atraparon con imanes, se lavaron con 1 ml del PBS-1, se añadió tampón Tris 50 mM-HCl (pH 7,5) que incluía BSA al 1% y NaCl 150 mM, y luego se mezcló a la temperatura ambiente durante 2 horas. Las perlas se atraparon con imanes, se lavaron cinco veces con 1 ml del PBS-1 y luego se suspendieron en tampón Tris 50 mM-HCl (pH 7,5) que incluía BSA al 0,1% y NaCl 150 mM (a lo que se alude a continuación en esta memoria como "perlas unidas a anti-Tamm-Horsfall").

25 24,3 µg de complejo de rutenio (fabricado por Igen) y 1,425 mg de anti-IgA humana de cabra (fabricada por Cappel Labs) se mezclaron bajo condiciones a prueba de luz a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de añadir 25 µl de glicina 2 M/PBS-1, lo que resultaba se mezcló bajo condiciones a prueba de luz a la temperatura ambiente durante 10 minutos y se filtró a través de una columna Sephadex G-25. Subsiguientemente, se agruparon las fracciones que contenían el anticuerpo contra anti-IgA humana al que está unido el complejo de rutenio (al que se alude en lo que sigue en esta memoria como un "anticuerpo anti-IgA marcado con rutenio").

30 Las perlas unidas a anti-Tamm-Horsfall (30 mg/ml) se diluyeron 60 veces (0,5 mg/ml) utilizando una disolución de dilución de la muestra (N102 al 50% (fabricada por NOF Corp.), Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Block Ace al 2% (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)). Seguidamente, el anticuerpo anti-IgA marcado con rutenio se diluyó con Can Get Signal 2 (fabricado por Toyobo Inc.) de modo que tuviera una concentración de 0,5 µg/ml. Cada una de las perlas unidas a anti-Tamm-Horsfall que habían sido diluidas 60 veces y el anticuerpo anti-IgA marcado con rutenio, preparado de modo que tuviera una concentración de 0,5 µg/ml se colocaron por separado en su propio soporte específico. A los tubos de reacción se añadieron 200 µl de la disolución de dilución de la muestra y 5 µl de cada una de las muestras se añadió por separado a los mismos, seguido de mezclado y agitación. En el estante para los tubos de reacción específico se insertó el tubo de reacción, los reactivos y la muestra se colocaron en un aparato de medición por electro-quimioluminiscencia automático (serie PICOLUMI, fabricado por Sanko Junyaku Co., Ltd.), y la medición autónoma se realizó bajo condiciones de reacción que incluían 9 minutos para una primera reacción y 9 minutos para una segunda reacción. Los resultados obtenidos de 128 casos de pacientes con una enfermedad renal, que incluían 88 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 19 casos de personas sanas se muestran en la Fig. 5.

45 Comparando el valor obtenido mediante sustracción del valor en blanco a partir del valor de recuento medido, se obtuvieron los resultados que muestran una diferencia significativa entre 128 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 88 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 19 casos de personas sanas.

50 Además de ello, como resultado de llevar a cabo un análisis ROC para 128 casos de pacientes con una enfermedad renal, que incluían 88 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 19 casos de personas sanas, se obtuvo la curva ROC mostrada en la Fig. 6. El valor de corte calculado a partir de la curva ROC era 510,3. La relación de respuesta positiva en 128 casos de pacientes con una enfermedad renal, que incluían 88 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 19 casos de personas sanas, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 3. Tal como se muestra en la Tabla 3, había 109 casos que mostraban una respuesta positiva

(85,2%) de los 128 casos de pacientes con una enfermedad renal en comparación con 3 casos que mostraban una respuesta positiva (15,8%) de los 19 casos de personas sanas, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 85,2%, el grado de especificidad era 84,2% y la eficacia del diagnóstico era 85,0%.

5

Tabla 3

	Pacientes con enfermedad renal	Persona sana
Número de muestras	128	19
Número de respuestas positivas	109	3
Relación de respuestas positivas	85,2%	15,8%

<Detección de nefropatía por IgA>

10 Seguidamente, para las muestras en las que los valores obtenidos mediante sustracción del valor en blanco del valor de recuento medido eran el valor de corte o superior, la concentración de proteínas en la orina se cuantificó en base a un método del rojo de pirogalol. La cantidad detectada del complejo, que había sido detectada a partir de lo anterior se dividió por la concentración de proteínas urinarias y luego se calculó la cantidad detectada del complejo por cantidad de proteínas urinarias. Los resultados se muestran en la Fig. 7. Se encontró a partir de la
15 Fig. 7 que 77 casos de pacientes con nefropatía por IgA se pueden distinguir claramente de 32 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA.

Además de ello, como resultado de llevar a cabo un análisis ROC para 77 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 32 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, se obtuvo la curva ROC mostrada en la Fig. 8. El valor de corte calculado a partir de la curva ROC era 39,525. La relación de respuesta positiva en 77 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 32 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 4. Tal como se muestra en la Tabla 4, había 58 casos que mostraban una respuesta positiva (75,3%) de los 77 casos de pacientes con nefropatía por IgA en comparación con 9 casos que muestran una respuesta positiva (28,1%) de los 32 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 75,3%, el grado de especificidad era 71,9% y la eficacia del diagnóstico era 74,3%.

20

25

Tabla 4

	Nefropatía por IgA	Enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA
Número de muestras	77	32
Número de respuestas positivas	58	9
Relación de respuestas positivas	75,3%	28,1%

30

[Ejemplo 3]

<Análisis de uromodulina contenida en el complejo de uromodulina-IgA en orina basado en el método de transferencia Western>

35

1 ml de Dynabeads M-450 Epoxy (fabricadas por Invitrogen Corporation) (30 mg/ml) fue atrapado con imanes y se lavó tres veces con 1 ml del PBS-1 (tampón fosfato de potasio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8). 1 ml de una disolución de un anticuerpo contra anti-IgA humana (fabricada por Cappel Labs) que había sido dializada frente al PBS-1 y preparada de modo que tuviera la concentración de 0,2 mg/ml, se añadió a las perlas atrapadas con imanes y se mezcló durante un día y una noche a 25°C.

40

Las perlas obtenidas de antes se atraparon con imanes, se lavaron con 1 ml del PBS-1, se añadió tampón Tris 50 mM-HCl (pH 7,5) que contenía BSA al 1% y NaCl 150 mM, y luego se mezcló a 4°C durante un día y una noche. Las perlas se atraparon con imanes, se lavaron tres veces con 1 ml del PBS-1 y luego se suspendieron en tampón Tris 50 mM-HCl (pH 7,5) que contenía BSA al 0,1% y NaCl 150 mM (a lo que se alude a continuación en esta memoria como "perlas unidas a anti-IgA").

45

De manera similar, 1 ml de Dynabeads M-450 Epoxy (30 mg/ml) fue atrapado con imanes, se lavó tres veces con 1 ml del PBS-1, se añadieron 50 ml de tampón Tris 50 mM-HCl (pH 7,5) que contenía BSA al 1% y NaCl 150 mM a

las perlas atrapadas con imanes, y luego se mezcló a 4°C durante un día y una noche. Las perlas se atraparon con imanes, se lavaron tres veces con 1 ml del PBS-1 y luego se suspendieron en tampón Tris 50 mM-HCl (pH 7,5) que contenía BSA al 0,1% y NaCl 150 mM (a lo que se alude a continuación en esta memoria como "perlas unidas a BSA").

5 2,5 ml de tampón Tris 1 M-HCl (pH 7,5) y 1,5 ml de NaCl 5 M se añadieron a 45 ml de una muestra de orina. Se añadieron adicionalmente 0,25 ml de las perlas unidas a anti-IgA o las perlas unidas a BSA, y la mezcla se combinó a 4°C durante un día y una noche. Cada una de las perlas se atrapó con imanes, se lavó cinco veces con 50 ml a 1 ml del PBS-1, se añadieron 0,5 ml de tampón citrato 0,1 M (pH 3) y la mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Las perlas se atraparon con imanes. El sobrenadante se recuperó, se dializó frente a PBS-1 (concentración 1/10) y NaN₃ al 0,01% y se concentró hasta una concentración de aproximadamente 10x mediante centrifuga para preparar la disolución de proteínas.

15 3 µl de la disolución de proteínas preparada a partir de lo anterior se sometieron a SDS-PAGE y luego se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (nombre comercial: BA85, fabricado por Schleicher & Schuell Bioscience GmbH). El filtro se sumergió en la disolución de bloqueo (Tris 50 mM-HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM, leche desnatada al 5%, Tween 20 al 0,01% y NaN₃ al 0,1%) y se sacudió durante una noche a 4°C. Después de ello, la disolución de bloqueo se intercambiò por una reciente. El anticuerpo anti-uromodulina (anticuerpo monoclonal anti-proteína de Tamm-Horsfall humana (fabricado por Cedarlane Laboratories, Ltd.)) se añadió como un anticuerpo primario a una concentración de 1/1.000, se sacudió a la temperatura ambiente durante 2 horas y luego se lavó tres veces con la disolución de lavado. Subsiguientemente, a la disolución de lavado se añadió IgG anti-ratón marcada con HRP (fabricada por Zymed Laboratories, Inc.) en calidad de un anticuerpo secundario a una concentración de 1/1.000, se sacudió a la temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó tres veces con la disolución de lavado. Después se añadió a ello, para el desarrollo de color, la disolución de desarrollo de color (Tris 8,3 mM – HCl (pH 6,5), NaCl 125 mM, 4-cloro-1-naftol al 0,05% y H₂O₂ al 0,01%).

20 En la Fig. 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis de transferencia Western de la proteína que se unió a las perlas unidas a anti-IgA. En la Fig. 9, la pista C corresponde a la migración de uromodulina purificada (10 µg) y las pistas 1 a 3 corresponden a la migración de las proteínas urinarias de pacientes con nefropatía por IgA que se unieron a las perlas unidas a anti-IgA.

30 A partir de cada una de las muestras de ensayo derivadas de pacientes con nefropatía por IgA se observó una intensa banda de uromodulina. Así, se confirmó que el complejo antígeno-IgA que había sido inmuno-precipitado por parte del anticuerpo anti-IgA en la orina de pacientes con nefropatía por IgA contenía siempre uromodulina, sin excepción alguna.

40 De lo que antecede se encontró que la uromodulina estaba contenida en el complejo de antígeno-IgA presente en la orina de pacientes con nefropatía por IgA y, por lo tanto, se confirmó la validez del diagnóstico de nefropatía por IgA basado en el método de sándwich utilizando un anticuerpo anti-uromodulina y un anticuerpo anti-IgA.

[Ejemplo 4]

<Detección de la enfermedad renal>

45 -Detección del complejo de IgA-uromodulina en orina basado en la evaluación por ELISA (2) utilizando un grupo de ensayo diferente-

50 Excepto que se utilizó un grupo de ensayo diferente del grupo de ensayo del Ejemplo 1, la detección del complejo de IgA-uromodulina basado en ELISA se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Al mismo tiempo, en lugar del valor del desarrollo de color se utilizó un valor medido de la cantidad de complejo, la cantidad de complejo contenida en una muestra que se convirtió con referencia al patrón utilizando el valor de desarrollo de color del patrón según se prepara más abajo (es decir, complejo de IgA humana-uromodulina humana).

(Preparación del complejo de IgA humana-uromodulina humana)

55 100 µl de IgA humana (fabricada por Cortex Corp.)/PBS-1 (tampón fosfato de potasio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,8) a 2 mg/ml y 100 µl de proteína de Tamm-Horsfall humana (fabricada por Cortex Corp.)/PBS-1 a 1 mg/ml se mezclaron entre sí, se añadieron a 20 µl de disolución de glutaraldehído (fabricada por Taab Laboratories

Equipment Limited) (al 0,5%/PBS-1) y se mezclaron a 25°C durante 2 horas. El dializado obtenido después de la diálisis frente a PBS-1 se utilizó como complejo de IgA humana-uromodulina humana patrón.

5 En la Fig. 10 se muestran los resultados de la medición del complejo de IgA-uromodulina en orina de 74 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluían 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 6 casos de personas sanas (personas normales).

10 Comparando el valor obtenido después de la sustracción del valor en blanco, se obtuvieron los resultados que muestran una diferencia significativa entre 74 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluían 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 6 casos de personas sanas.

15 Además de ello, se llevó a cabo el análisis ROC para 74 casos de pacientes con una enfermedad renal y 6 casos de personas sanas. La curva ROC se muestra en la Fig. 11. El valor de corte, que se estableció para que tuviera la especificidad de 100%, era 0,064. La relación de respuesta positiva en 74 casos de pacientes con una enfermedad renal y 6 casos de personas sanas, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 5. Tal como se muestra en la Tabla 5, había 67 casos que mostraban una respuesta positiva (90,5%) de los 74 casos de pacientes con una enfermedad renal en comparación con 0 (cero) casos que mostraban una respuesta positiva (0%) de los 6 casos de personas sanas, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 90,5%, el grado de especificidad era 100% y la eficacia del diagnóstico era 91,3%.

20

Tabla 5

	Pacientes con enfermedad renal	Persona sana
Número de muestras	74	6
Número de respuestas positivas	67	0
Relación de respuestas positivas	90,5%	0,0%

<Detección de nefropatía por IgA>

25 Seguidamente, para la muestra en la que la cantidad detectada del complejo era el valor de corte o superior, la concentración de proteínas urinarias en la orina se cuantificó en base a un método del rojo de pirogalol. La cantidad detectada del complejo, que había sido detectada a partir de lo anterior, se dividió por la concentración de proteínas urinarias y luego se calculó la cantidad de detección del complejo por cantidad de proteínas urinarias. Los resultados se muestran en la Fig. 12. Comparando la cantidad de detección del complejo por cantidad de las proteínas urinarias, los resultados demuestran que 31 casos de pacientes con nefropatía por IgA se pueden distinguir claramente de 36 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA.

30

35 Además de ello, como resultado de llevar a cabo un análisis ROC para 31 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 36 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, se obtuvo la curva ROC mostrada en la Fig. 13. El valor de corte calculado a partir de la curva ROC era 0,13. La relación de respuesta positiva en 31 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 36 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 6. Tal como se muestra en la Tabla 6, había 24 casos que mostraban una respuesta positiva (77,4%) de 31 casos de pacientes con nefropatía por IgA en comparación con 5 casos que mostraban una respuesta positiva (13,9%) de 36 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 77,4%, el grado de especificidad era 86,1% y la eficacia del diagnóstico era 82,1%.

40

45 En particular, se determinó que 8 casos de nefropatía hereditaria (Alport), la cual es difícil de distinguir de nefropatía por IgA mediante diagnóstico clínico y 4 casos de nefropatía por IgA curada de forma natural (es decir, nefropatía por IgA extinguida) eran todos negativos y, por lo tanto, se encontró que era muy eficaz para el diagnóstico clínico.

Tabla 6

	Nefropatía por IgA	Enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA
Número de muestras	31	36
Número de respuestas positivas	24	5
Relación de respuestas positivas	77,4%	13,9%

[Ejemplo de referencia 1]

<Detección de la enfermedad renal>

5

-Detección de uromodulina en orina basada en ELISA-

Un anticuerpo anti-proteína de Tamm-Horsfall humana (oveja, poli, fabricado por Biotrend Chemikalien GmbH) se marcó con peroxidasa utilizando el kit de marcaje con peroxidasa NH₂ (fabricado por Dojindo Molecular Technologies, Inc) de acuerdo con el manual del fabricante incluido en el kit (a lo que se alude aquí en lo que sigue como un "anticuerpo anti-proteína de Tamm-Horsfall humana marcado con peroxidasa").

Las copas anti-Tamm-Horsfall, obtenidas anteriormente, se lavaron tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%) y se añadieron con muestras de orina que se obtuvieron diluyendo 1.000 a 10.000 veces, utilizando una disolución de dilución de la muestra (N102 al 50% (fabricada por NOF Corp.), Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Block Ace al 2% (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)) en una cantidad de 50 µl/pocillo para la reacción a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%), anticuerpo anti-proteína de Tamm-Horsfall humana marcada con peroxidasa de rábano, diluida 1.000 veces con Can Get Signal 2 (fabricado por Toyobo Inc.) se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con la disolución de lavado, sistema de sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para ELISA (fabricado por Sigma Chemical Corporation) se añadió en una cantidad de 100 µl/pocillo, seguido de la reacción a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de añadir H₂SO₄ 0,5 M (100 µl/pocillo) para terminar la reacción, se midió la DO (450 a 650 nm). En la Fig. 14 se muestran los resultados de la medición obtenidos de 74 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 6 casos de personas sanas.

Los valores obtenidos después de la sustracción del valor en blanco se compararon entre sí. De acuerdo con los resultados, 74 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA no pueden distinguirse de 6 casos de personas sanas.

[Ejemplo de referencia 2]

-Detección de IgA en orina basada en ELISA-

35

Un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana (cabra, poli anti-IgG humanas, fabricado por Biosource International Camarillo, CA) se diluyó hasta la concentración de 10 µg/ml con Tris 50 mM/HCl (pH 7,5) y NaCl 0,15 M, y luego se añadió a copas PolySorp (fabricadas por NUNC) (50 µl/pocillo). Las copas se colocaron en una caja húmeda y el revestimiento se llevó a cabo durante una noche a 4°C. Después del revestimiento, estas copas se lavaron tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%), seguido de la adición de la disolución de bloqueo (N102 al 50% (fabricada por NOF Corp.), Tris 25 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 75 mM y Block Ace al 2% (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)) (150 µl/pocillo). Después de ello, el bloqueo se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 2 horas o a 4°C durante un día o más (a lo que se alude en esta memoria a continuación como "copas anti-IgG").

45

Las copas anti-IgG se lavaron tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%) y se añadieron con muestras de orina que se obtuvieron diluyendo 1.000 veces, utilizando una disolución de dilución de la muestra (N102 al 50% (fabricada por NOF Corp.), Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Block Ace al 2% (fabricado por Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.)) en una cantidad de 50 µl/pocillo para la reacción a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con la disolución de lavado (Tris 50 mM/HCl (pH 7,5), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,01%), anticuerpo anti-IgA humana marcado con HRP (fabricado por Zymed Labs) que ha sido diluido 1.000 veces con Can Get Signal 2 (fabricado por Toyobo Inc.) se añadió en una cantidad de 50 µl/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con la disolución de lavado, sistema de sustrato líquido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para ELISA (fabricado por Sigma Chemical Corporation) se añadió en una cantidad de 100 µl/pocillo, seguido de la reacción a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de añadir H₂SO₄ 0,5 M (100 µl/pocillo) para terminar la reacción, se midió la DO (450 a 650 nm). En la Fig. 15 se muestran los resultados de la medición obtenidos de 74 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 32 casos de

55

pacientes con nefropatía por IgA y 6 casos de personas sanas.

5 Al comparar el valor obtenido después de la sustracción del valor en blanco, se obtuvieron los resultados que demuestran una clara diferencia entre 74 casos de pacientes con una enfermedad renal que incluyen 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 6 casos de personas sanas, incluso a pesar de que eran menos drásticos que los resultados obtenidos de la medición del complejo de uromodulina-IgA.

10 Además de ello, se llevó a cabo el análisis ROC para 74 casos de pacientes con una enfermedad renal y 6 casos de personas sanas. En la Fig. 16 se muestra la curva ROC. El valor de corte, que se estableció que tuviera la especificidad de 100%, era 0,418. La relación de respuesta positiva en 74 casos de pacientes con una enfermedad renal y 6 casos de personas sanas, que se determinó a partir del valor de corte, se muestra en la Tabla 7. Tal como se muestra en la Tabla 7, había 64 casos que mostraban una respuesta positiva (86,5%) de los 74 casos de pacientes con una enfermedad renal en comparación con 0 (cero) casos que muestran una respuesta positiva (0%) de los 6 casos de personas sanas, por lo que los dos grupos se pueden distinguir claramente uno de otro. La sensibilidad era 86,5%, el grado de especificidad era 100% y la eficacia del diagnóstico era 87,5%.

Tabla 7

	Pacientes con enfermedad renal	Persona sana
Número de muestras	74	6
Número de respuestas positivas	64	0
Relación de respuestas positivas	86,5%	0,0%

<Detección de nefropatía por IgA>

20 Seguidamente, para 74 casos de pacientes con una enfermedad renal, que incluyen 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA, la concentración de proteínas urinarias en la orina se cuantificó en base a un método del rojo de pirogalol. La cantidad detectada de la IgA, que ha sido detectada a partir de lo anterior, se dividió por la concentración de proteínas urinarias y luego se calculó la cantidad detectada de la IgA por cantidad de las proteínas urinarias. Los resultados se muestran en la Fig. 17. Además de ello, como resultado de llevar a cabo un análisis ROC para 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA y 42 casos de pacientes con una enfermedad renal distinta de nefropatía por IgA, se obtuvo la curva ROC mostrada en la Fig. 18. Como resultado, se encontró que era difícil distinguir claramente 32 casos de pacientes con nefropatía por IgA de 42 casos de pacientes con una enfermedad renal que no fuese nefropatía por IgA en base a la comparación de la cantidad de detección de IgA por cantidad de las proteínas urinarias.

De lo anterior, al detectar el complejo de IgA humana y uromodulina humana presente en la orina, personas sanas (personas normales) se pueden distinguir de pacientes con nefropatía.

35 Además, al medir la cantidad detectada del complejo de IgA humana y uromodulina humana presente en la orina por la concentración de proteínas urinarias, se pueden distinguir una de otra la nefropatía por IgA y enfermedades renales distintas de nefropatía por IgA.

40 Al mismo tiempo, cuando sólo se mide la uromodulina humana presente en la orina, no se pueden distinguir personas sanas (personas normales) de pacientes con nefropatía. Cuando sólo se mide IgA humana presente en la orina, las personas sanas (personas normales) se pueden distinguir de pacientes con nefropatía, pero la nefropatía por IgA no se puede distinguir de una enfermedad renal que no sea la nefropatía por IgA midiendo la cantidad detectada de IgA humana por la concentración de proteínas urinarias.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método de ensayo de la nefropatía por IgA, que comprende:
una etapa de detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto.
- 2.- El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la detección del complejo comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana.
- 10 3.- El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende, además:
una etapa de obtener una relación de una cantidad del complejo detectado en la etapa de detección de un complejo a una cantidad de proteínas urinarias en la muestra derivada de la orina recogida del sujeto.
- 15 4.- El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende, además:
una etapa de evaluar la existencia de nefropatía por IgA sobre la base de la relación.
- 20 5.- Un método de ensayo de una enfermedad renal, que comprende:
una etapa de detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto.
- 6.- El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la etapa de detección de un complejo comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana.
- 25 7.- El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, que comprende, además:
una etapa de evaluar la existencia de una enfermedad renal sobre la base de la cantidad detectada del complejo.
- 30 8.- Un método de ensayo de nefropatía por IgA, que comprende:
una etapa de detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana en una muestra derivada de orina recogida de un sujeto;
una etapa de evaluar la existencia de una enfermedad renal sobre la base de al menos una de la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección del complejo o una cantidad de proteínas urinarias en la muestra; y
una etapa de evaluar si la enfermedad renal es nefropatía por IgA sobre la base de una relación de la cantidad del complejo detectado en la etapa de detección del complejo a la cantidad de proteínas urinarias en la muestra.
- 35 9.- El método de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de detección de un complejo comprende un método inmunoquímico que utiliza un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana.
- 40 10.- El método de ensayo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el método inmunoquímico es un método de sándwich.
- 45 11.- Un método para detectar un complejo de uromodulina humana e IgA humana, comprendiendo el método:
una etapa de poner en contacto una muestra derivada de orina recogida de un sujeto con un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana.
- 50 12.- El método de detección de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el complejo se detecta por un método inmunoquímico que utiliza el anticuerpo contra la uromodulina humana y el anticuerpo contra la IgA humana.
- 55 13.- El método de detección de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el método inmunoquímico es un método de sándwich.
- 14.- El método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el sujeto es una persona que ha desarrollado una enfermedad renal, una persona de la que se sospecha que ha desarrollado una enfermedad renal o una persona que tiene la posibilidad de desarrollar una enfermedad renal.
- 15.- El método de detección de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la enfermedad renal es nefropatía por IgA.

16.- Uso de un kit de ensayo que comprende un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana en el método de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

- 5 17.- Uso de un kit de ensayo que comprende un anticuerpo contra uromodulina humana y un anticuerpo contra IgA humana en el método de detección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.

Fig. 1

ELISA PARA MEDIR EL COMPLEJO DE IgA-Uromodulina EN ORINA

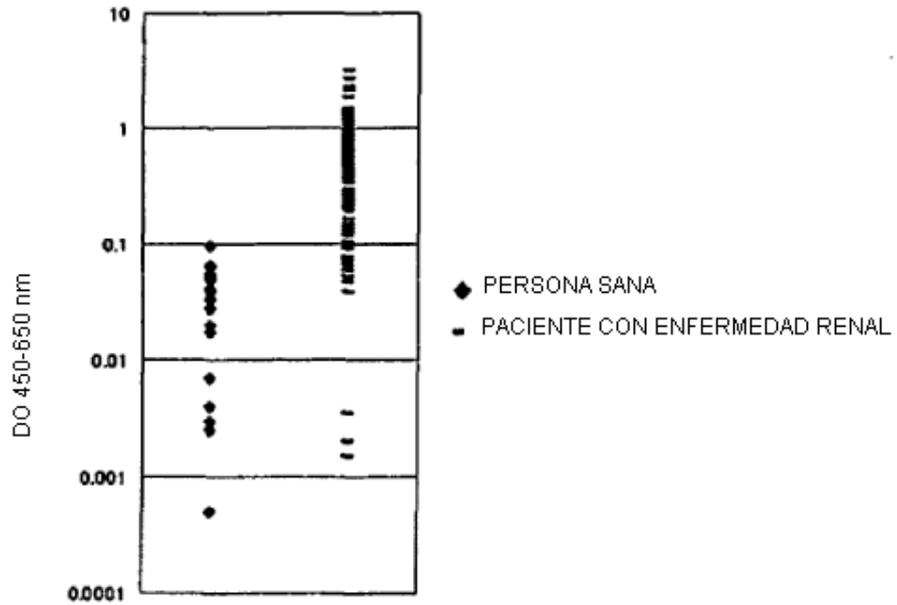


Fig. 2

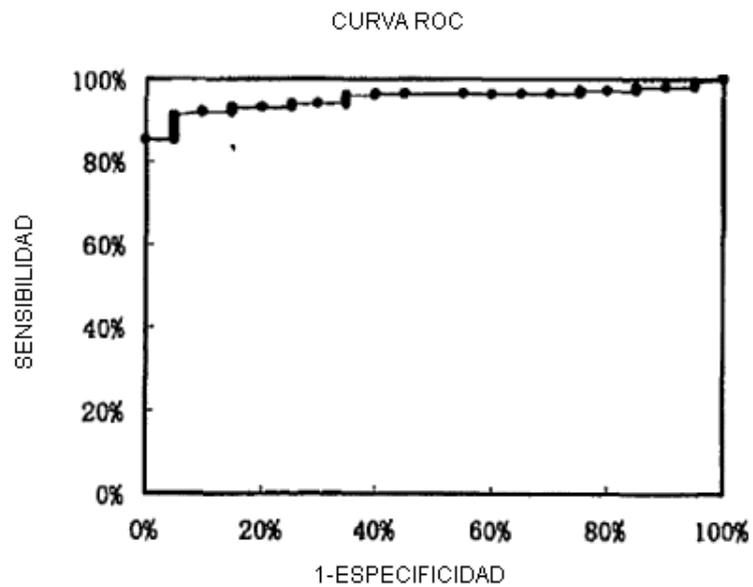


Fig. 3

ELISA PARA MEDIR EL COMPLEJO DE IgA-Uromodulina EN ORINA
(CORREGIDO PARA LA CONC. DE PROTEINAS)

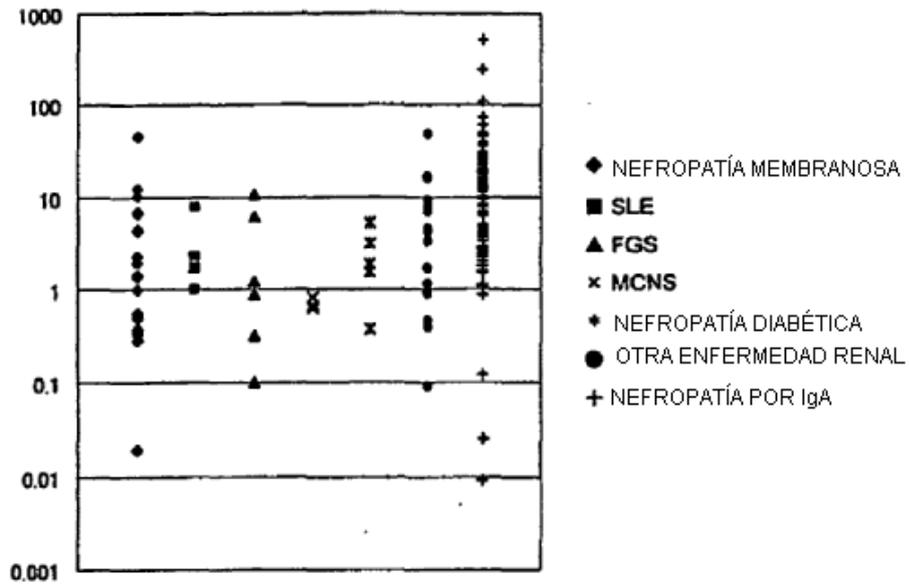


Fig. 4

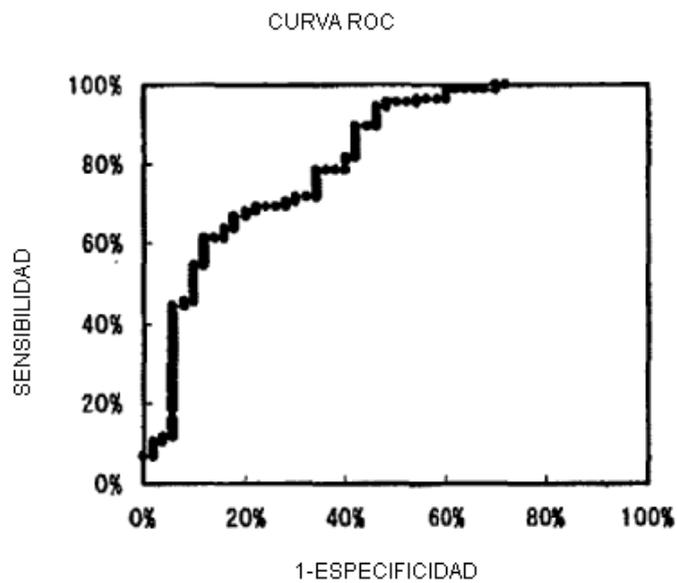


Fig. 5

ECL PARA MEDIR EL COMPLEJO DE IgA-Uromodulina EN ORINA

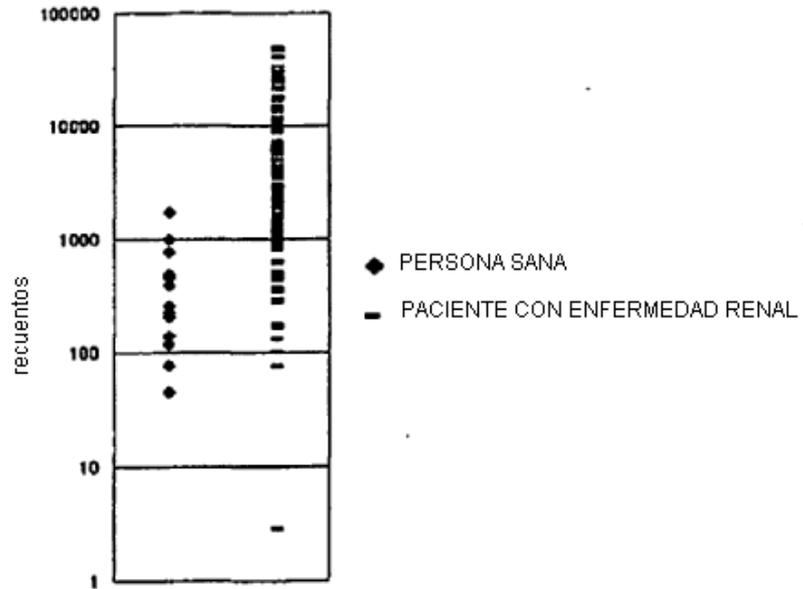


Fig. 6

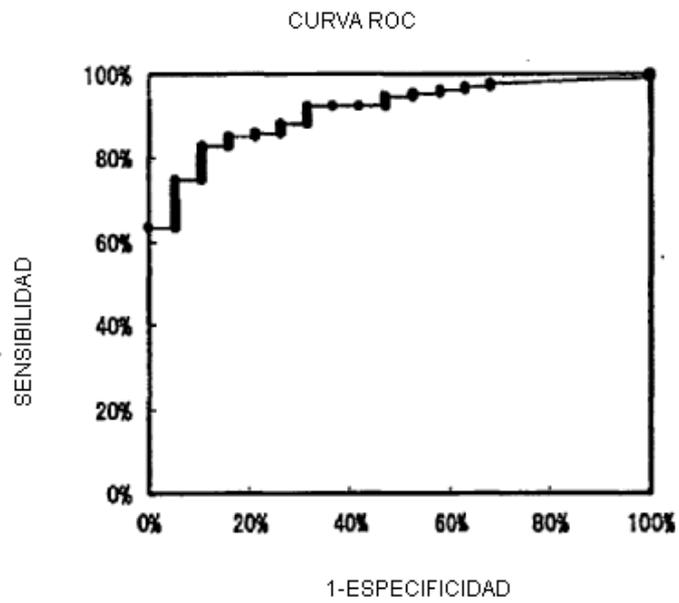


Fig. 7

ECL PARA MEDIR EL COMPLEJO DE IgA-Uromodulina EN ORINA
(CORREGIDO PARA LA CONC. DE PROTEINAS)

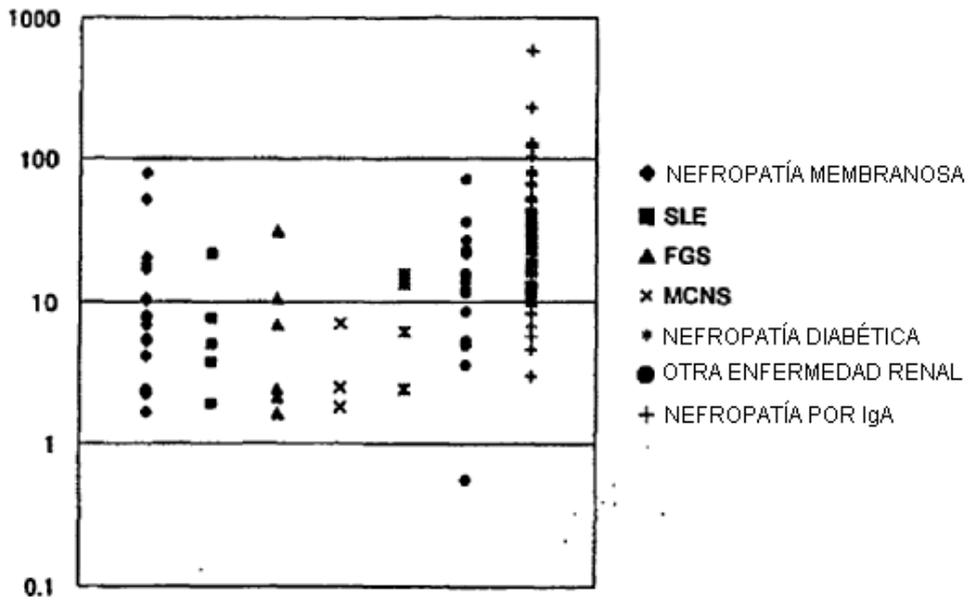


Fig. 8

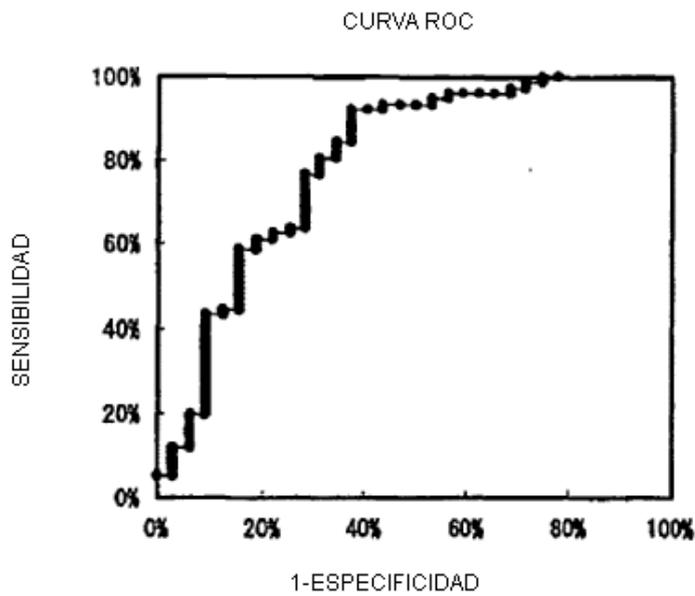


Fig. 9

C 1 2 3



- C** : Uromodulina PURIFICADA
- 1** : ORINA DE PACIENTE CON NEFROPATÍA POR IgA
- 2** : ORINA DE PACIENTE CON NEFROPATÍA POR IgA
- 3** : ORINA DE PACIENTE CON NEFROPATÍA POR IgA

Fig. 10

ELISA PARA MEDIR EL COMPLEJO DE IgA-Uromodulina EN ORINA (2)

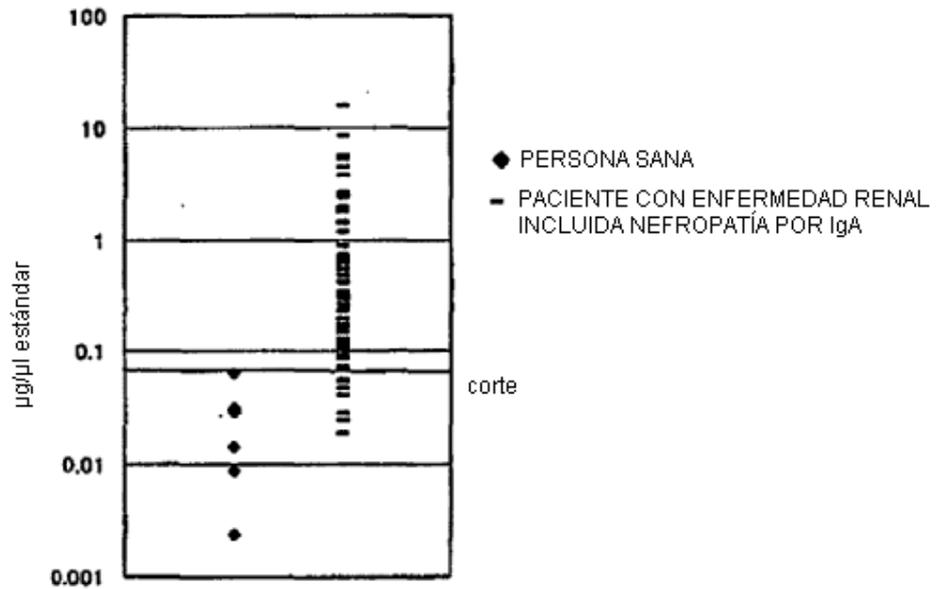


Fig. 11

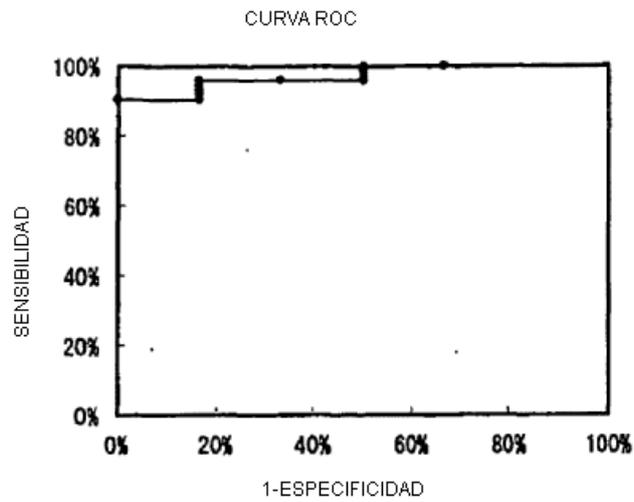


Fig. 12

ELISA PARA MEDIR EL COMPLEJO DE IgA-Uromodulina EN ORINA
(CORREGIDO PARA LA CONC. DE PROTEINAS)

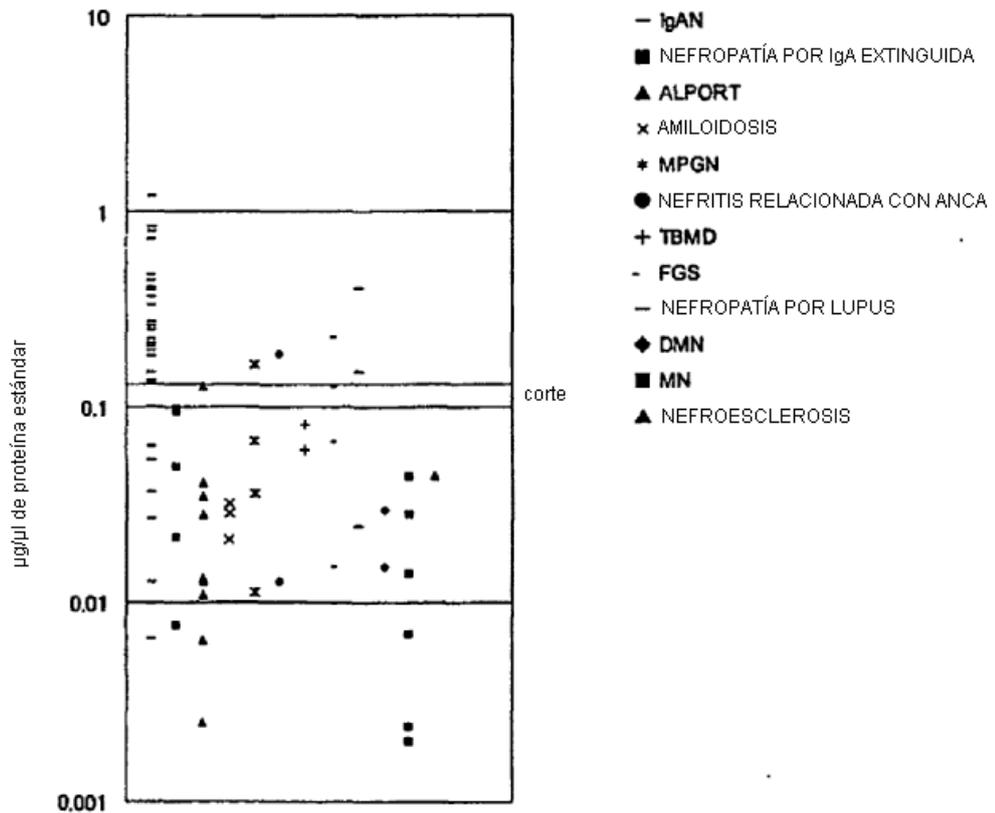


Fig. 13

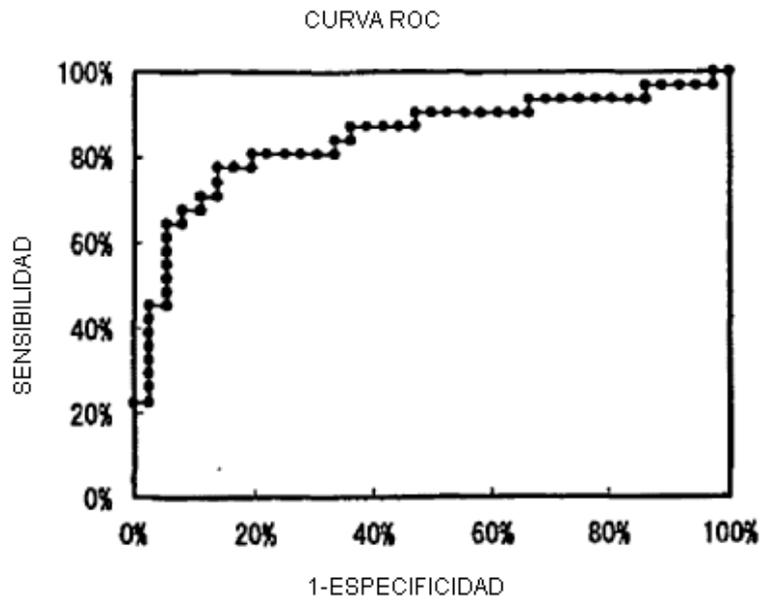


Fig. 14

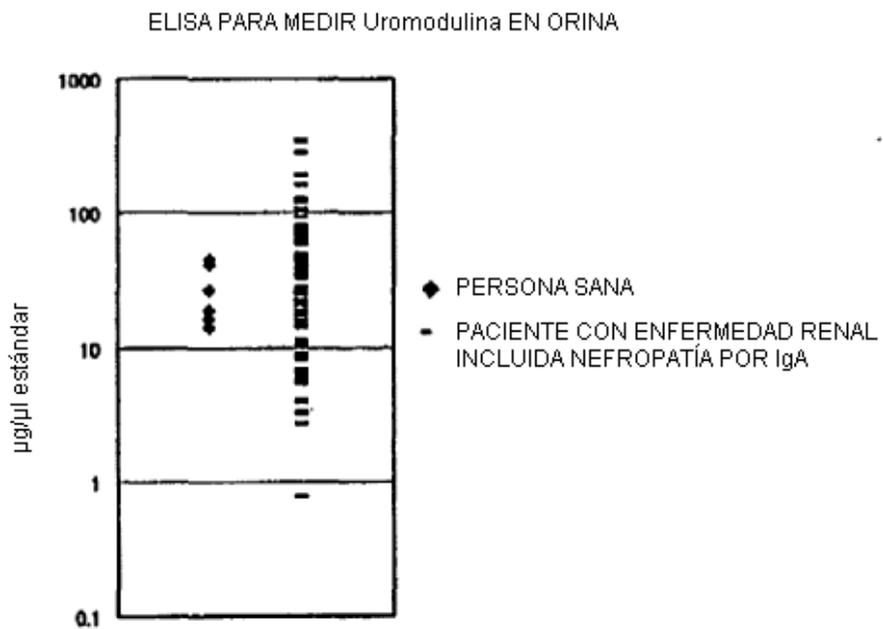


Fig. 15



Fig. 16

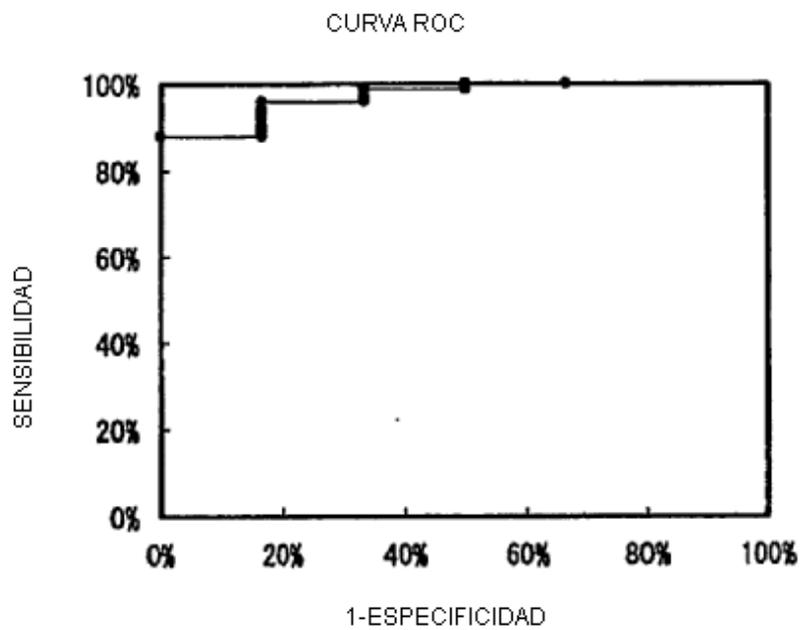


Fig. 17

ELISA PARA MEDIR IgA EN ORINA
(CORREGIDO PARA LA CONC. DE PROTEINAS)

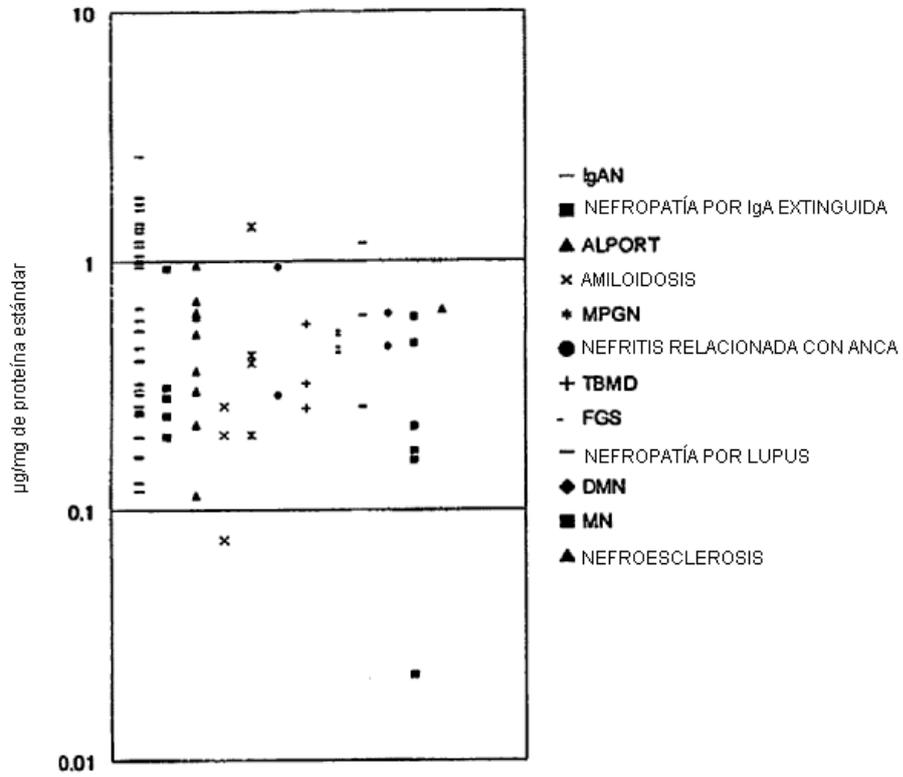


Fig. 18

