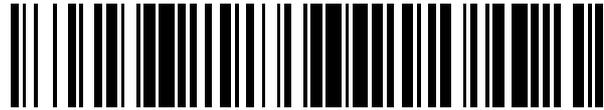


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 996**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009** **E 09822897 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2350669**

54 Título: **Métodos de pronóstico en enfermedad renal crónica**

30 Prioridad:

31.10.2008 AU 2008905617

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

18.12.2013

73 Titular/es:

**ST VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY LIMITED
(100.0%)
Centre for Immunology Victoria Street
Darlinghurst, NSW 2010, AU**

72 Inventor/es:

**BREIT, SAMUEL NORBERT y
BROWN, DAVID ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 434 996 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

Métodos de pronóstico en enfermedad renal crónica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de pronóstico de la supervivencia de un sujeto con enfermedad renal crónica (CKD), un método para la selección de sujetos con CDK en fase terminal para trasplantes de riñón y un método de pronóstico de la tolerancia de sujetos con CDK en fase terminal a la diálisis.

Antecedentes de la invención

10 La citoquina inhibidora del macrófago (MIC)-1 es una proteína de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). MIC-1 originalmente se clona como citoquina inhibidora del macrófago-1 y después se identifica como factor de crecimiento transformante placentario- β (PTGF- β), proteína morfogenética del hueso placentaria (PLAB), gen activado por el fármaco anti-inflamatorio no-esteroidal 1 (NAG-1), factor derivado de la próstata (PDF) y factor de desarrollo de crecimiento-15 (GDF-1) (Bootcov *et al.*, 1997; Hromas *et al.* 1997; Lawton *et al.*, 1997; Yokoyama-Kobayashi *et al.*, 1997; Paralkar *et al.*, 1998). Al igual que otras citoquinas relacionadas con TGF- β , MIC-1 se sintetiza como una proteína precursora inactiva, que experimenta homodimerización ligada por disulfuro. Tras la escisión proteolítica del pro-péptido N-terminal, MIC-1 madura se secreta como una proteína dimérica de aproximadamente 24.5 kDa (Bauskin *et al.*, 2000). Las secuencias de aminoácidos para MIC-1 se revelan en WO 99/06445, WO 00/70051, WO 01/81928, WO 2005/113585, Bottner *et al.* (1999b); Bootcov *et al.*, 1997; Baek *et al.*, 2001; Hromas *et al.* (1997), Paralkar *et al.*, 1998; Morrish *et al.*, 1996; y Yokoyama-Kobayashi *et al.*, (1997). La secuencia de aminoácido para el polipéptido de MIC-1 madura común o "tipo salvaje" se muestra en la Figura 1:

25 MIC-1 se expresa en varios tejidos (Moore *et al.*, 2000; Bottner *et al.*, 1999a; Fairlie *et al.*, 1999; Bauskin *et al.*, 2006). Por ejemplo, las transferencias de Northern de tejidos humanos indican la presencia de pequeñas cantidades de mRNA de MIC-1 en el riñón, páncreas y próstata, y grandes cantidades en la placenta (Moore *et al.*, 2000; Fairlie *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que los niveles de MIC-1 en suero aumentan con la edad en sujetos normales, aparentemente saludables. La sobreexpresión de MIC-1 se ha asociado con el cáncer, particularmente cáncer de próstata (Welsh *et al.*, 2003), y altas concentraciones en suero de MIC-1 se asocian con la presencia de enfermedad metastásica (Welsh *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2006). MIC-1 en suero también se eleva en enfermedades inflamatorias crónicas y predice los eventos ateroscleróticos independientemente de los factores de riesgo tradicionales. Los niveles de MIC-1 en suero también se aumentan en enfermedad renal crónica (CKD; Johnen *et al.*, 2007).

35 CKD (también conocido como enfermedad renal crónica) se caracteriza por una pérdida progresiva de la función renal durante un periodo de meses o años a través de cinco etapas. CKD inicialmente se caracteriza por la función renal suavemente disminuida con pocos síntomas manifiestos, que eventualmente pueden progresar a través de la etapa final, conocido como insuficiencia del riñón crónica (CKF), falla renal crónica (CRF), o insuficiencia renal en etapa terminal, que se caracteriza por una enfermedad grave y por lo general requiere algún tipo de "terapia de reemplazo renal" (por ejemplo, diálisis o trasplante renal). Más de 15.5 millones de adultos en los Estados Unidos de América tienen deterioro moderadamente severo de la función renal, y más de 480,000 están recibiendo tratamiento activo para insuficiencia renal en etapa terminal con más de 100,000 nuevos pacientes que inician el tratamiento anualmente. De los pacientes que recibieron tratamiento en 2005, más de 80,000 murieron.

40 Los pacientes con CKD tienden a sufrir de aterosclerosis acelerada (una enfermedad inflamatoria crónica que afecta los vasos sanguíneos arteriales), y son más propensos a desarrollar una enfermedad cardiovascular que la población general. Se considera que el aumento de niveles de marcadores inflamatorios tales como proteína C reactiva (CRP) es un factor de riesgo para eventos cardiovasculares agudos tanto para pacientes con insuficiencia renal en etapa terminal como poblaciones normales (Apple *et al.*, 2004). La enfermedad renal en etapa terminal se asocia con la anorexia, la pérdida de peso y la caquexia. Se piensa que es un enlace entre la desnutrición y la inflamación en pacientes con insuficiencia renal con las dos condiciones a menudo coexistiendo.

50 Algunos pacientes con CKD en etapa terminal pueden sobrevivir indefinidamente en diálisis; sin embargo, muchos pacientes por lo general mueren en la ausencia de un trasplante de riñón. La pérdida de peso, un índice de masa corporal (BMI) disminuido y elevados marcadores inflamatorios en suero se considera que son predictores de mortalidad. Sin embargo, la contribución de la desnutrición y la inflamación al resultado de la enfermedad y la naturaleza del enlace entre ellos está mal definida. Actualmente no hay métodos potenciales confiables para determinar que pacientes por lo general mueren en la ausencia de un trasplante de riñón, y en consecuencia es difícil determinar pacientes para los cuales un trasplante de riñón les puede salvar la vida.

El presente solicitante investigó la relación entre MIC-1 y la nutrición alterada en CKD y encontró que los niveles de MIC-1 tienen utilidad clínica para pronosticar la mortalidad en CKD. El presente solicitante también se ha dado cuenta que los niveles de MIC-1 ventajosamente pueden proveer una media para la selección de un sujeto con CKD en etapa terminal para un trasplante de riñón.

5 Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención provee un método de pronóstico de la probabilidad de muerte de un sujeto de prueba de una enfermedad renal crónica (CKD) de toda causa de mortalidad, el método que comprende la detección

10 WO2009/046495 A1 describe un método de tratamiento de la caquexia que involucra la eliminación o inactivación de MIC-1 presente en la sangre, plasma o suero de un sujeto con caquexia. WO2009/021293 A1 describe un método y tipos novedosos de agentes para modular el apetito y/o el peso corporal en un sujeto y un método de selección de agentes que interactúan y modulan la actividad del complejo del receptor para MIC-1.

15 WO 2009/141357 A1 describe un método para predecir si un paciente con diabetes tipo 1 sufrirá de una o más complicaciones seleccionadas de complicaciones cardiovasculares, insuficiencia renal en fase terminal, y muerte, el método que comprende a) determinación de la cantidad de MIC-1 (también conocido como GDF-15 en esta referencia) en una muestra de un paciente con diabetes tipo 1; y b) comparación de la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa a) con una cantidad de referencia y establecimiento de una predicción. Una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto.

20 En un segundo aspecto, la presente invención provee un método de pronóstico de la probabilidad de muerte de un sujeto de prueba con CKD de mortalidad por cualquier causa, el método comprende las siguientes etapas:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y

(ii) comparación de la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1, que es una cantidad elevada de MIC-1 asociada con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto;

25 de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto tiene una disminución de la probabilidad de muerte.

30 En un tercer aspecto, la presente invención provee un método de selección de un sujeto de prueba de CDK terminal para un trasplante de riñón, el método que comprende la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto en la ausencia de un trasplante de riñón.

El método del tercer aspecto preferiblemente comprende las siguientes etapas:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y

35 (ii) comparación de la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto en la ausencia de un trasplante de riñón; de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto
40 tiene una disminución de la probabilidad de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón.

En un cuarto aspecto, la presente invención provee un método de evaluación de un sujeto de prueba de CKD terminal que se somete a diálisis para la tolerancia de dicha diálisis, el método que comprende la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con una baja tolerancia a la diálisis.

45 El método del cuarto aspecto preferiblemente comprende las siguientes etapas:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y

(ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas de dicho sujeto de prueba en un momento al comienzo antes o después del inicio de dicha diálisis, o sujeto(s) control de CKD en etapa terminal con tolerancia a largo plazo a la diálisis, de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) sea una cantidad elevada en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), es probable que el sujeto tenga una baja tolerancia a la diálisis, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de o sustancialmente equivalente a la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), es probable que el sujeto tolere la diálisis; o (iii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que se asocia con una tolerancia a largo plazo a la diálisis, tal que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es una cantidad elevada en comparación con la cantidad de referencia de MIC-1, es probable que el sujeto tenga una baja tolerancia a la diálisis, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia de MIC-1, es probable que el sujeto tolere la diálisis.

En un quinto aspecto, la presente invención provee un método de prevención de la muerte o de reducción del riesgo de muerte en un sujeto con CKD, particularmente un sujeto con CKD que padece de insuficiencia renal en etapa terminal, que comprende el tratamiento de la sangre, el plasma o el suero de dicho sujeto con el fin de eliminar o inactivar MIC-1 presente en dicha sangre, plasma o suero.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 provee (A) la secuencia de aminoácido para el polipéptido MIC-1 humana madura común o de "tipo salvaje"; y (B) la secuencia de aminoácido de una variante MIC-1 humana madura D6;

Figura 2 provee un gráfico Kaplan-Meier de pacientes en una cohorte Sueca (n=98) en diálisis de 1.2 a 13 años, que muestra que los pacientes con niveles de MIC-1 en suero mayores de la media de 7.4 ng/ml (i.e. 7400 pg/ml; los círculos representan un nivel de MIC-1 por debajo de 7400 pg/ml, los cuadrados representan un nivel de MIC-1 por encima de 7400 pg/ml) tuvieron una mortalidad significativamente mayor que los pacientes con niveles de MIC-1 en suero por debajo de este nivel (p=0.0105); y

Figura 3 provee un gráfico Kaplan-Meier de (A) pacientes en una cohorte de Estados Unidos que completan no más de tres años de diálisis en el momento del censo (n=140), clasificados de acuerdo con su media de MIC-1 AC- de 6.3 ng/ml (i.e. 6300 pg/ml; los círculos representan un nivel de MIC-1 por debajo de 6300 pg/ml, los cuadrados representan un nivel de MIC-1 por encima de 6300 pg/ml), que clasificó significativamente la mortalidad del paciente (p=0.0124); (B) el mismo grupo de pacientes clasificado de acuerdo con el decil superior del nivel de MIC-1 en suero de 14.2 ng/ml (i.e. 14200 pg/ml; los círculos representan un nivel de MIC-1 por debajo de 14200 pg/ml, los cuadrados representan un nivel de MIC-1 por encima de 14200 pg/ml) mostrando que los pacientes con un nivel de MIC-1 en suero en el decil superior (>14200 pg/ml) tuvieron un riesgo de mortalidad significativamente mayor (p=0.0038); (C) pacientes con niveles de MIC-1 en suero en el decil superior (>14.2 ng/ml, i.e. 14200 pg/ml) con independencia del tiempo en diálisis (n=381) tuvieron una tasa de mortalidad del 50% (p=0.0040).

Descripción detallada de la invención

El presente solicitante ha encontrado que MIC-1 es un predictor de la mortalidad en enfermedad renal crónica (CKD).

De esta manera, en un primer aspecto, la presente invención provee un método de pronóstico de la probabilidad de muerte de un sujeto de prueba de una enfermedad renal crónica (CKD) de la mortalidad por cualquier causa, el método que comprende la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto.

Como se utiliza en este documento, el término "MIC-1" abarca monómeros, homodímeros y/o heterodímeros de un polipéptido de MIC-1, así como las variantes, subunidades y los fragmentos de este (por ejemplo productos de degradación o productos de digestión del MIC-1). Las variantes de MIC-1 abarcadas por el término incluyen proteínas de MIC-1 humanas maduras que comprenden un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que difiere de la que se muestra en la Figura 1A por 1 a 3 aminoácidos, debido a una sustitución, delección y/o adición de aminoácido, y que preferiblemente muestra una actividad biológica sustancialmente equivalente al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 1A (como se puede medir utilizando el ensayo descrito por Hromas *et al*, 1997 y/o la prueba descrita por Kempf *et al*, 2007); un ejemplo particular es la variante de MIC-1 humana madura D6 descrita en WO 01/81928, que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 1B. Las subunidades y los fragmentos de MIC-1 abarcados por el término incluyen subunidades y fragmentos del polipéptido que comprenden la secuencia de aminoácido mostrada en la Figura 1A o la Figura 1B y que muestran una actividad biológica y/o inmunológica sustancialmente equivalente a estos polipéptidos.

Preferiblemente, el MIC-1 detectado en el método del primer aspecto es la proteína de MIC-1 humana madura, variante de la proteína MIC-1 humana madura D6 y/o los heterodímeros de esta.

5 Como se utiliza en este documento, se debe entender que, el término "enfermedad renal crónica" y la abreviatura "CKD" se refiere a una condición caracterizada por la pérdida progresiva y permanente de la función renal durante un periodo de meses o años. Los sujetos con CKD frecuentemente tienen otras condiciones médicas tales como enfermedad cardiovascular (incluyendo aterosclerosis y cardiopatía isquémica), hipertensión, desnutrición, enfermedad inflamatoria y diabetes o combinaciones de estas. CKD se reconoce que progresa a través de cinco etapas como se describe en Tabla 1. Las etapas, en parte, se pueden caracterizar mediante la medición de la "tasa de filtración glomerular" (GFR), que se puede describir como la velocidad de flujo del líquido filtrado a través del riñón.

Tabla 1 Etapas de enfermedad renal crónica

Etapa 1	Función ligeramente disminuida; GFR* normal o aumento (>90 mL/min/1.73 m ²); daño de riñón se define como anomalidades patológicas o marcadores de daño, incluyendo anomalidades en prueba de sangre u orina o estudios de imágenes
Etapa 2	Reducción suave en GFR (60-89 mL/min/1.73 m ²); daño de riñón se define como anomalidades patológicas o marcadores de daño, incluyendo anomalidades en prueba de sangre u orina o estudios de imágenes
Etapa 3	Reducción moderada en GFR (30-59 mL/min/1.73 m ²)
Etapa 4	Reducción grave en GFR (15-29 mL/min/1.73 m ²)
Etapa 5 (insuficiencia renal en etapa terminal)	Insuficiencia renal establecida (GFR <15 mL/min/1.73 m ²), o recibir terapia de reemplazo renal permanente.

En algunas modalidades, el sujeto de prueba con CKD padece de CKD etapa 1, preferiblemente CKD etapa 2, más preferiblemente CKD etapa 3, aún más preferiblemente CKD etapa 4, y más preferiblemente, CKD etapa 5.

15 En la mayoría de los casos, el sujeto eventualmente experimentará la terapia de reemplazo renal. El término "terapia de reemplazo renal", como se utiliza en este documento, se debe entender que se refiere a algún tipo de intervención que es capaz de al menos compensar parcialmente la función renal reducida, por ejemplo, diálisis (incluyendo hemodiálisis, diálisis peritoneal o hemofiltración), un trasplante de riñón, etc. Sin embargo, también se debe entender que el tipo de terapias de reemplazo renal no se deben limitar a los siguientes ejemplos, como otras terapias pueden ser suficientes como terapias de reemplazo renal. Adicionalmente, se debe entender que el tiempo y la intensidad de terapia de reemplazo renal pueden variar de sujeto a sujeto, dependiendo de la progresión de la enfermedad y otros factores médicos asociados con un sujeto individual, así como los procedimientos operativos estándar en diversas instituciones (por ejemplo unidades de diálisis). Por ejemplo, algunos sujetos temporalmente pueden experimentar diálisis antes de progresar a la enfermedad renal en etapa terminal. En otro ejemplo, la intensidad de diálisis puede variar de sujeto a sujeto (por ejemplo, algunos sujetos pueden experimentar diálisis dos veces por semana, mientras algunos sujetos pueden experimentar diálisis diariamente). En la mayoría de los sujetos con CKD, terapia de reemplazo renal indefinida eventualmente será necesaria para la supervivencia.

30 Como se utiliza en este documento, el término "terapia de reemplazo renal indefinida" se debe entender que se refiere a la situación en la que la terapia de reemplazo renal normalmente se espera que se necesite para el resto de la vida del sujeto. En este punto, el sujeto por lo general se puede considerar que padece de enfermedad renal en etapa terminal.

35 Como se utiliza en este documento, el término "enfermedad renal en etapa terminal" se debe entender que se refiere a una condición caracterizada en la Tabla 1, en donde el sujeto ha perdido permanentemente función renal sustancial, por ejemplo, que tiene una tasa de filtración glomerular por debajo de 15 ml/min/1.73 m², o el sujeto está recibiendo terapia de reemplazo renal indefinida (por ejemplo, la diálisis tal como hemodiálisis o diálisis peritoneal).

40 Como se utiliza en este documento, el término "probabilidad de muerte" se debe entender que se refiere a la probabilidad de muerte prematura del sujeto con CKD en comparación con la expectativa normal de supervivencia de un sujeto sano u otros sujetos con CKD (i.e. sujetos con CKD con cantidades normales o reducidas de MIC-1). En algunas modalidades del método de la presente invención, la cantidad elevada de MIC-1 predice un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto dentro de un periodo de 10 años a partir de la toma de la muestra corporal de

prueba. En otras modalidades, la cantidad elevada de MIC-1 predice un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto dentro de un periodo de 3 años a partir de la toma de la muestra corporal de prueba. Además, En otras modalidades, la cantidad elevada de MIC-1 predice un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto dentro de un periodo de 1 año a partir de la toma de la muestra corporal de prueba.

5 El término "mortalidad por cualquier causa", como se utiliza en este documento, se refiere a la causa de muerte del sujeto debido a cualquier causa médica; es decir, la causa de muerte puede ser cualquier causa diferente de accidente o contratiempo. Por consiguiente, el sujeto puede morir a casusa de, por ejemplo, insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular (incluyendo aterosclerosis y cardiopatía isquémica), hipertensión, desnutrición, enfermedad inflamatoria, diabetes, o complicaciones de estas o una combinación de estas. Preferiblemente, la
10 muerte se debe a una causa seleccionada del grupo que consiste de insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular y enfermedad inflamatoria.

15 El pronóstico de la probabilidad de muerte en un sujeto con CKD es ventajoso ya que puede permitir la intervención para salvar la vida. Por ejemplo, el pronóstico de mortalidad puede facilitar la selección o priorización de sujetos para los cuales un trasplante de riñón les salvaría la vida. Adicional o alternativamente, puede indicar que un sujeto particular se beneficiaría de una alteración en terapia con el fin de intentar prolongar su vida. Por ejemplo, el sujeto se puede beneficiar de una terapia adicional de reemplazo renal (por ejemplo diálisis más frecuente); o alteración de otras terapias, por ejemplo, alteración de terapias que tienen la intención de replicar la función endocrina del riñón (tal como el reemplazo de eritropoyetina y vitamina D3, y la administración de calcio, aglutinantes de fosfato, etc.), o alteración de terapias para controlar otras enfermedades asociadas (tales como hipertensión, enfermedad
20 cardiovascular, diabetes, enfermedad inflamatoria, etc.).

25 El término "muestra corporal de prueba" como se utiliza en este documento se refiere a una muestra de un fluido corporal, células separadas (i.e. células tomadas del cuerpo y al menos parcialmente separadas de otros componentes del cuerpo), un tejido o un órgano. Las muestras de fluidos corporales se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas, y muestras de tejidos u órganos se pueden obtener de cualquier tejido u órgano, por ejemplo, por biopsia. Las células separadas se pueden obtener de un fluido corporal; tejido u órgano mediante técnicas de separación tales como centrifugación o selección de células. Preferiblemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de las células, tejidos u órganos que expresan o producen MIC-1.

30 La muestra corporal de prueba para utilizar en el método del primer aspecto, por lo tanto, preferiblemente se puede seleccionar de sangre total, plasma sanguíneo, suero, capa leucocitaria, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido seminal, líquido sinovial, una biopsia de tejido y/o una biopsia de órgano. Más preferiblemente, la muestra corporal de prueba se selecciona del grupo que consiste de sangre total, plasma sanguíneo, suero y orina. Más preferiblemente, la muestra corporal de prueba es suero.

35 La muestra corporal de prueba se puede tomar del sujeto a diferentes puntos de tiempo durante el curso de CKD. Por ejemplo, una muestra se puede tomar del sujeto antes de que el sujeto inicie una terapia de reemplazo renal (por ejemplo diálisis) o antes de iniciar una terapia de reemplazo renal indefinida, y luego otra vez en uno o más puntos de tiempo mientras que el sujeto está recibiendo una terapia de reemplazo renal o terapia de reemplazo renal indefinida.

40 El término "cantidad" como se utiliza en este documento abarca la cantidad absoluta de MIC-1, la cantidad relativa o concentración de MIC-1, así como cualquier valor o parámetro que se correlaciona o corresponde a esta, o se puede derivar de la misma, tal como, por ejemplo, valores o parámetros que comprenden valores de señal de intensidad a partir de todas las propiedades físicas o químicas específicas obtenidas de MIC-1 mediante mediciones directas (por ejemplo valores de intensidad en el espectro de masas o el espectro NMR) o mediciones indirectas (por ejemplo niveles de respuesta determinados de sistemas de lectura biológica en respuesta a MIC-1 o señales de intensidad obtenidas de ligandos unidos específicamente). Se debe entender que los valores que correlacionan con las
45 cantidades o parámetros mencionados anteriormente, también se pueden obtener mediante operaciones matemáticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

50 La cantidad de MIC-1 que se puede considerar como una "cantidad elevada" de MIC-1 para los propósitos de la presente invención pueden variar de acuerdo con cualquiera de un número de factores, por ejemplo, el tipo de muestra corporal particular utilizada, el sexo del sujeto (n.b. los sujetos hombres muestran un nivel promedio de MIC-1 en suero mayor que el de los sujetos mujeres), la edad del sujeto, el índice de masa corporal (BMI) del sujeto, el hábito de fumar del sujeto (n.b. los exfumadores tienden a mostrar un aumento de los niveles en suero de MIC-1 en comparación con aquellos que nunca han fumado, mientras que los fumadores habituales tienden a mostrar incluso niveles más grandes en suero de MIC-1), cualquier uso de fármacos anti-inflamatorios no-esteroidales (NSAIDs) (n.b. el uso de NSAID se puede asociar con el aumento de los niveles de MIC-1 en suero, particularmente en sujetos hombres), la proporción cintura-cadera en sujetos mujeres (n.b. elevada proporción de cintura-cadera en mujeres se asocia con el aumento de niveles de MIC-1 en suero), la etapa de CKD que padece el sujeto, cuando se tome la muestra corporal de prueba, y el periodo de tiempo previsto en el cual es probable que la muerte ocurra, si el paciente ya está recibiendo la terapia de reemplazo renal, y el método utilizado para detectar la cantidad elevada de
55

MIC-1. Los expertos en la técnica entenderán que cuanto mayor es la cantidad elevada de MIC-1 detectada en un sujeto, mayor es la probabilidad de muerte. Sin embargo, los expertos en la técnica también entenderán que un sujeto que recibe una terapia de reemplazo renal indefinida puede tener un nivel inferior de MIC-1 en suero que un sujeto con CKD que no está recibiendo terapia de reemplazo renal indefinida como, por ejemplo, la diálisis puede disminuir el nivel de MIC-1 en muestras de sangre total, plasma sanguíneo y suero.

Una cantidad elevada de MIC-1 para los propósitos de la presente invención puede estar representado por una cantidad mayor de una cantidad pre-determinada específica tal como, por ejemplo, un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 6000 pg/ml (o, en el caso de una muestra de sangre total o plasma sanguíneo, un nivel que corresponde a un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 6000 pg/ml); por ejemplo, dado que el suero comprende aproximadamente 50-55% de sangre total, un nivel de MIC-1 total en sangre de aproximadamente 3000 pg/ml corresponde aproximadamente a un nivel de MIC-1 en suero de aproximadamente 6000 pg/ml) o, preferiblemente, un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 7000 pg/ml (o, en el caso de una muestra de sangre total o plasma sanguíneo, un nivel que corresponde a un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 7000 pg/ml), más preferiblemente, un nivel de MIC-1 en suero mayor de 10000 pg/ml (o, en el caso de una muestra de sangre total o plasma sanguíneo, un nivel que corresponde a un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 10000 pg/ml), y más preferiblemente, un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 14000 pg/ml (o, en el caso de una muestra de sangre total o plasma sanguíneo, un nivel que corresponde a un nivel de MIC-1 en suero mayor de aproximadamente 14000 pg/ml). En algunas modalidades, el nivel de MIC-1 es (o corresponde a) un nivel en suero mayor de aproximadamente 6300 pg/ml, preferiblemente mayor de aproximadamente 7400 pg/ml, más preferiblemente mayor de aproximadamente 14200 pg/ml. En el contexto anterior, el término "aproximadamente" se debe entender que se refiere a una cantidad que es $\pm 25\%$ de la cantidad indicada, preferiblemente $\pm 20\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, y más preferiblemente $\pm 2\%$ de la cantidad indicada.

Una cantidad elevada de MIC-1 para los propósitos de la presente invención también puede estar representada por un aumento en la cantidad de MIC-1 en un sujeto que es detectable por la medición en serie.

Por consiguiente, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba se puede determinar a diferentes puntos de tiempo en el mismo sujeto. Por ejemplo, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba se puede detectar en ciertos intervalos de tiempo. Los intervalos de tiempo se pueden determinar sobre una base caso por caso de acuerdo con las necesidades del sujeto y pueden ser, por ejemplo, tres meses, un año, tres años, cinco años o diez años, pero se debe entender que los intervalos de tiempo se pueden ajustar de acuerdo con cualquiera de los factores médico y relevantes de la salud del sujeto. Una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba dentro de un sujeto, en consecuencia, se puede detectar mediante comparación de la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba en un momento dado con la cantidad de MIC-1 en la misma muestra corporal de prueba en un momento inicial. De esta manera, una cantidad elevada de MIC-1 se puede detectar mediante la determinación del incremento en la cantidad de MIC-1 presente en la muestra corporal de prueba dentro de cualquier sujeto dado en el tiempo.

De esta manera, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se puede detectar utilizando medición en serie mediante:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y

(ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas del mismo sujeto en un momento inicial;

en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s). Preferiblemente, el sujeto no sufrió de CKD o sufrió de una etapa menos avanzada de CKD en el momento anterior.

Alternativa o adicionalmente, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se puede detectar por comparación con un sujeto normal, por ejemplo, por

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y

(ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC- presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas del sujeto(s) normal;

en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).

Como se utiliza en este documento, el término "sujeto normal" se refiere a un sujeto que no muere de cualquier causa distinta de accidente o contratiempo dentro de los 10 años de la toma de la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s). Preferiblemente, el o los sujetos normales son emparejados por edad, en donde los sujetos normales están dentro de los 10 años de la edad del sujeto del cual se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Más preferiblemente, los sujetos normales están dentro de los 5 años de la edad del sujeto del cual se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante.

Alternativamente, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se puede detectar por comparación con un sujeto con enfermedad renal en etapa terminal, por ejemplo, mediante

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y

(ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de al menos otro sujeto que ha sido diagnosticado con enfermedad renal en etapa terminal;

de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se aumenta en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), el sujeto de prueba tiene un aumento de la probabilidad de muerte en comparación con al menos otro sujeto. Los expertos en la técnica también entenderán que cuando la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se disminuye en comparación con la cantidad de MIC-1 o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), el sujeto de prueba tiene una disminución de la probabilidad de muerte en comparación con al menos otro sujeto. Preferiblemente, al menos otro sujeto es emparejado por edad dentro de 10 años de la edad del sujeto del cual se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Más preferiblemente, al menos otro sujeto está dentro de los 5 años de la edad del sujeto del cual se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Preferiblemente, la comparación de la etapa (ii), en este caso, se hace contra el nivel promedio de MIC-1 en suero de un grupo de sujetos diagnosticados con enfermedad renal en etapa terminal.

El experto en la técnica también apreciara que la cantidad de MIC-1 en la muestra corporal de prueba también puede ser comparada con un conjunto de datos que comprende la información en relación con el nivel de MIC en cualquiera de los sujetos precedentes o una población que comprende lo mismo.

Una cantidad elevada de MIC-1 para los propósitos de la presente invención también se puede detectar por la comparación con una cantidad de referencia de MIC-1 que se conoce que se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte de un sujeto con CKD (por ejemplo un sujeto con enfermedad renal en etapa terminal), en el que la cantidad de referencia es una cantidad mayor en comparación con la cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de sujeto(s) normal(es).

Por consiguiente, en un segundo aspecto, la presente invención provee un método de pronóstico de la probabilidad de muerte de un sujeto de prueba con CKD de la mortalidad por cualquier causa, el método que comprende las siguientes etapas:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y

(ii) comparación de la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que es una cantidad elevada de MIC-1 asociada con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto;

de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto tiene una disminución de la probabilidad de muerte.

El método del segundo aspecto además puede comprender la etapa de:

(iii) establecer un pronóstico basado en la comparación de la etapa (ii) de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto tiene una disminución de la probabilidad de muerte.

Preferiblemente, el MIC-1 detectado en el método del segundo aspecto es la proteína de MIC-1 humana madura, variante de la proteína de MIC-1 humana madura D6 y/o heterodímeros de estas. La cantidad elevada de MIC-1 puede ser como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto. La muestra corporal de prueba también puede ser como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto, sin embargo preferiblemente,

la muestra corporal de prueba se selecciona del grupo que consiste de sangre total, plasma sanguíneo, suero y orina.

5 El método del segundo aspecto permite que la cantidad de referencia de MIC-1 sea utilizada como un marcador de pronóstico, en donde la cantidad de MIC-1 en la muestra corporal de prueba puede ser comparada simplemente con la cantidad de referencia. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad del mismo, un método puede depender de algo más que la "calidad" analítica del método; también puede depender de la definición de lo que constituye resultado anormal de la técnica. Es decir, por lo general, para cualquier marcador particular, la distribución de niveles de marcadores para los sujetos con y sin una enfermedad se superpone de tal manera que una prueba de diagnóstico/pronóstico basada en este marcador no distinguirá absolutamente un sujeto normal de un sujeto enfermo con precisión completa. De esta manera, en algunas modalidades, el método además puede comprender el cálculo de las curvas características operativas del receptor (ROC) mediante, por ejemplo, el trazado del valor de la cantidad de MIC-1 contra la frecuencia relativa de dicho valor en poblaciones "normales" y con la "enfermedad". El área bajo una curva ROC calculada de esta manera luego puede ser utilizada como una medida de la probabilidad de que la cantidad de MIC-1 determinada en la muestra corporal de prueba permitirá un pronóstico correcto de la probabilidad de muerte. Además, una curva ROC se puede utilizar incluso cuando, por cualquier razón, la cantidad de MIC-1 determinada se puede considerar como inexacta, puesto que tanto tiempo como sea posible clasificar los resultados, una curva ROC todavía puede ser calculada; por ejemplo, las cantidades de MIC-1 determinadas a partir de muestras corporales de los sujetos con CKD pueden ser clasificadas de acuerdo con el grado (suponemos 1 = bajo, 2 = normal, y 3 = alto) - este rango luego se puede correlacionar con los resultados en la población normal del sujeto y una curva ROC creada de acuerdo con los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo Hanley and McNeil, 1982).

25 En una modalidad del método del segundo aspecto, la presente invención provee un método para pronosticar la probabilidad de muerte de un sujeto con enfermedad renal en etapa terminal. Cuando se utiliza en relación con un sujeto que padece de enfermedad renal en etapa terminal, el pronóstico logrado por el método puede predecir que el sujeto poco probable sobrevivir sin un trasplante de riñón.

Por consiguiente, en un tercer aspecto, la presente invención provee un método de selección de un sujeto de prueba de enfermedad renal en etapa terminal para un trasplante de riñón, el método que comprende la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto en la ausencia de un trasplante de riñón.

30 En una modalidad el método del tercer aspecto puede comprender las siguientes etapas:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y

35 (ii) comparación de la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto en la ausencia de un trasplante de riñón; de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto tiene una disminución de la probabilidad de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón.

En otra modalidad del método del tercer aspecto, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante el uso medición en serie por:

40 (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y

(ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas del mismo sujeto en un momento inicial;

en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).

45 En otra modalidad del método del tercer aspecto, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta por comparación con un sujeto normal mediante:

(i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y

(ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas de sujeto(s) normal(es);

en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha muestra(s) corporal(es) comparativa(s).

El método del tercer aspecto además puede comprender la etapa de:

- 5 (iii) selección de un sujeto con enfermedad renal en etapa terminal para un trasplante de riñón basado en la comparación de la etapa (ii) de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto se selecciona para un trasplante de riñón, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto no se selecciona para un trasplante de riñón.

10 Preferiblemente, el MIC-1 detectado en el método del tercer aspecto es la proteína de MIC-1 humana madura, variante de la proteína MIC-1 humana madura D6 y/o heterodímeros de estos. La cantidad elevada de MIC-1 puede ser como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto, y pueden ser, por lo tanto, en comparación con una cantidad de referencia (como se describe anteriormente) con el fin de seleccionar un sujeto de prueba con enfermedad renal en etapa terminal para un trasplante de riñón, en donde la cantidad de referencia se conoce que se asocia con un aumento de riesgo de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón (i.e. de tal manera que 15 cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la muestra corporal de prueba es mayor de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto se selecciona para un trasplante de riñón, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la muestra corporal de prueba es menor de la cantidad de referencia, el sujeto no se puede seleccionar para un trasplante de riñón). La muestra corporal de prueba puede ser como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto, sin embargo preferiblemente, la muestra corporal de prueba se selecciona del 20 grupo que consiste de sangre total, plasma sanguíneo, suero y orina.

El presente solicitante también se ha dado cuenta que los niveles de MIC-1 tienden a ser inferiores en sujetos con CKD que pueden tolerar la diálisis a largo plazo.

25 En un cuarto aspecto, la presente invención provee un método de evaluación de un sujeto de prueba con enfermedad renal en etapa terminal sometido a diálisis para la tolerancia de dicha diálisis, el método que comprende la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con una baja tolerancia a la diálisis.

El método del cuarto aspecto preferiblemente comprende las siguientes etapas:

- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y
- 30 (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de dicho sujeto de prueba en un momento inicial antes o después del comienzo de dicha diálisis, o sujeto(s) control con insuficiencia renal en etapa terminal con tolerancia a largo plazo a la diálisis, de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es una cantidad elevada en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), es probable que el sujeto tenga una baja tolerancia a la diálisis, y 35 cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menos de o sustancialmente equivalente a la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), es probable que el sujeto tolere la diálisis; o (iii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que se asocia con tolerancia a largo plazo a la diálisis, tal que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es una cantidad elevada en comparación con la cantidad de referencia de MIC-1, es probable que el sujeto tenga una baja tolerancia a la diálisis, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menos de o sustancialmente equivalente a la cantidad de referencia de MIC-1, es probable que el sujeto tolere 40 la diálisis.

45 Preferiblemente, el MIC-1 detectado en el método del cuarto aspecto es una proteína de MIC-1 humana madura, proteína de variante MIC-1 humana madura D6 y/o heterodímeros de estos. La muestra corporal de prueba puede ser como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto, sin embargo preferiblemente, la muestra corporal de prueba se selecciona del grupo que consiste de sangre total, plasma sanguíneo, suero y orina.

De acuerdo con el método del cuarto aspecto, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede ser utilizada para evaluar un sujeto con enfermedad renal en etapa terminal sometido a diálisis para la tolerancia de dicha diálisis, en donde la determinación de: una cantidad elevada de MIC-1 (en la muestra corporal de prueba) con relación a, por ejemplo, preferiblemente uno o más sujetos emparejados con la edad con enfermedad renal en etapa terminal con tolerancia a largo plazo a la diálisis, se asocia con una baja tolerancia de la diálisis; una cantidad de MIC-1 sustancialmente equivalente o reducida con relación a, por ejemplo, preferiblemente uno o más sujetos emparejados con la edad con enfermedad renal en etapa terminal con tolerancia a largo plazo a la diálisis, se asocia con una tolerancia aceptable o buena de la diálisis; y una cantidad de MIC-1 sustancialmente sin cambios (i.e. 50

estable) o reducida con relación a una cantidad de MIC-1 determinada en un momento inicial antes o después del inicio de diálisis, se asocia con una tolerancia aceptable o buena de la diálisis.

Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo *in vitro* o *ex vivo*. Sin embargo, preferiblemente, los métodos se llevan a cabo *in vitro*.

5 Para los métodos *in vitro*, la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba se puede determinar fácilmente por cualquier método apropiado incluyendo, por ejemplo, inmunoensayos tales como ensayo inmuoabsorbente con enzima ligado (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica (por ejemplo con muestras de secciones de una biopsia de tejido) utilizando anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de estos. Los anticuerpos anti-MIC-1 y los fragmentos de estos, se pueden producir mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, es posible detectar y cuantificar los niveles de MIC-1 utilizando otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica tales como, por ejemplo, métodos que involucran la detección del enlace de MIC-1 con un receptor de MIC-1 (por ejemplo como se revela en WO 2009/21293), o cualquier otro ligando que puede unir MIC-1 (por ejemplo fetuina como se revela en WO 2005/99746). Los métodos particularmente apropiados para la determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba son inmunoensayos que utilizan moléculas marcadas en diversos ensayos en sándwich, competición, u otros formatos de ensayo. Tales inmunoensayos desarrollarán una señal que es indicativa de la presencia o ausencia de MIC-1. Adicionalmente, la fuerza de la señal generada por tales inmunoensayos se puede correlacionar directa o indirectamente (por ejemplo, inversamente proporcional) a la cantidad de MIC-1 presente en una muestra. Otros métodos particularmente apropiados para la determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba son los métodos que comprenden la medida de una propiedad física o química específica para MIC-1, tal como una masa molecular precisa o espectro de resonancia magnética nuclear (NMR). Tales métodos, por lo tanto, se pueden llevar a cabo utilizando biosensores, dispositivos ópticos acoplados a inmunoensayos, biochips, dispositivos analíticos tales como espectrómetros de masas, analizadores de NMR, o dispositivos de cromatografía. Adicionalmente, los métodos particularmente apropiados para la determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba incluyen métodos de micro-placa basados en ELISA, inmunoensayos robóticos o completamente automatizados (disponibles, por ejemplo, en analizadores Elecsys® (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, Estados Unidos of América), Ensayo de Enlace con Cobalto enzimático (CBA) (disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi (Roche Diagnostics Corporation), y ensayos de aglutinación en látex (disponible, por ejemplo, en analizadores Roche-Hitachi). Otros ejemplos adicionales de métodos particularmente apropiados para la determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba incluyen los métodos que involucran precipitación (por ejemplo inmunoprecipitación), electroquimioluminiscencia (i.e. quimioluminiscencia electro-generada), inmunoensayos de electroquimioluminiscencia de tipo sándwich (ECLIA), inmunoensayo de fluorescencia de lantánido potenciado por disociación (DELFA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, y turbidimetría y nefelometría potenciada por látex. Adicionalmente, los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como electroforesis en gel, Western Blotting, y espectrometría de masas, también se pueden utilizar solos o en combinación con otros métodos apropiados como se describe anteriormente.

Como tal, la determinación de la cantidad de MIC-1 en la muestra corporal de prueba puede comprender las etapas de (i) poner en contacto MIC-1 con un ligando específico, (ii) opcionalmente eliminar el ligando no-unido, y (iii) medición de la cantidad de ligando unido. El ligando unido (que se puede unir por enlace covalente y/o no-covalente) generará una señal de intensidad. Como se indica anteriormente, el ligando puede ser seleccionado de anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de estos pero de otro modo podría ser cualquier otro ligando que puede unir MIC-1 tal como, por ejemplo, cualquier compuesto (incluyendo péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, aptámeros (por ejemplo aptámeros de péptidos o ácido nucleico), glicoproteínas tales como fetuina, y moléculas pequeñas) que se unen a MIC-1. Sin embargo, preferiblemente, el ligando se selecciona de anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de estos (incluyendo anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de estos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que son capaces de unir MIC-1, y los anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo anticuerpos scFV)) y un receptor de MIC-1 (por ejemplo como se revela en WO 2009/21293) o fragmento de estos que comprende al menos un dominio de enlace que se une a MIC-1. Métodos de preparación de tales ligandos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Preferiblemente, el ligando se une específicamente a MIC-1. Como se utiliza en este documento, el término "enlace específico" y equivalentes gramaticales significa que el ligando no se debería unir sustancialmente a (es decir, sustancialmente "reaccionar en cruz" con) otro péptido, polipéptido o sustancia presente en la muestra corporal de prueba. Preferiblemente, la MIC-1 unida específicamente será unida con una afinidad al menos 3 veces mayor, más preferiblemente al menos 10 veces mayor, y más preferiblemente al menos 50 veces mayor que cualquier otro péptido, polipéptido o sustancia relevante. El enlace no-específico pueden ser tolerable, si este puede ser distinguido y medido inequívocamente, por ejemplo, de acuerdo con su tamaño en un Western Blot, o por la abundancia relativamente mayor de MIC-1 en la muestra, o si se puede controlar por el uso de una muestra control negativa o una muestra control de sujeto normal.

El ligando se puede acoplar covalentemente o no-covalentemente a una etiqueta permitiendo la detección y medición del ligando. La marcación apropiada se puede realizar por cualquiera de los métodos directos o indirectos bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, por medio de una breve explicación, el etiquetado directo involucra el acoplamiento de la etiqueta directamente (covalentemente o no covalentemente) al ligando, mientras que en el etiquetado indirecto involucra el enlace (covalentemente o no-covalentemente) de un ligando secundario con el ligando (i.e. "primer ligando") en donde el ligando secundario se uniría específicamente al primer ligando y se puede acoplar con una etiqueta apropiada y/o ser el objetivo (receptor) del enlace del ligando terciario con el ligando secundario. El uso de enlace secundario, terciario o incluso de ligandos de mayor orden se puede utilizar para aumentar la señal. Los ligandos secundario y de mayor orden apropiados pueden incluir anticuerpos, anticuerpos secundarios, y el bien conocido sistema estreptavidina-biotina (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, Estados Unidos de América). El ligando también puede ser "etiquetado" con una o más etiquetas bien conocidas por los expertos en la técnica, tags que luego pueden ser objetivos para los ligandos de mayor orden. Las tags apropiadas incluyen biotina, digoxigenina, His-Tag, glutationa-S-transferasa, FLAG, Proteína Fluorescente Verde (GFP), myc-tag, hemaglutinina del virus de la influenza A (HA), proteína de enlace maltosa y similares. Cuando el ligando es una proteína, péptido o polipéptido, el tag preferiblemente se localiza en las apropiadas etiquetas N-terminal y/o C-terminal. incluyen cualquiera de las etiquetas que son detectables por un método de detección apropiado tal como, por ejemplo, partículas de oro, perlas de látex, éster de acridano, luminol, rutenio, etiquetas activas enzimáticamente, etiquetas radioactivas, etiquetas magnéticas (por ejemplo, "perlas magnéticas", incluyendo etiquetas paramagnéticas y superparamagnéticas), y etiquetas fluorescentes. Las etiquetas activas enzimáticamente apropiadas incluyen, por ejemplo, peróxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, luciferasa y derivados de estas. Los sustratos apropiados de etiquetas enzimáticamente activas que permiten la detección incluyen di-amino-benzidina (DAB), 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina, cloruro de tetrazolio 4-nitro azul y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT-BCIP), disponibles como un solución madre ya preparada de Roche Diagnostics Corporation), CDP-Star™ (Amersham Biosciences Inc, Fairfield, CT, Estados Unidos de América), y ECF™ (Amersham Biosciences Inc). Las etiquetas radioactivas apropiadas incluyen ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P, ³³P y similares. Las etiquetas radioactivas se pueden detectar por cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, una película sensible a la luz o una imagen de fósforo. Las etiquetas fluorescentes apropiadas incluyen proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados, Cy3, Cy5, Rojo Texas, Fluoresceína, y los colorantes Alexa (por ejemplo, Alexa 568)). También se contempla el uso de puntos cuánticos como etiquetas fluorescentes.

En algunas modalidades, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba se puede determinar de la siguiente manera: (i) poner en contacto un soporte sólido que comprende un ligando para MIC-1 como se describe anteriormente con dicha muestra corporal de prueba que comprende MIC-1 y en lo sucesivo (ii) medición de la cantidad de MIC-1 que se ha convertido unida al soporte. Preferiblemente, en tales modalidades, el ligando se selecciona del grupo de ligandos que consiste de ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos y aptámeros, y, preferiblemente, se provee en el soporte sólido en una forma inmovilizada. El soporte sólido puede estar compuesto de cualquiera de los materiales típicos bien conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, *inter alia*, materiales de columna disponibles comercialmente, perlas de poliestireno, perlas de látex, perlas magnéticas, partículas de metal coloidal, astillas de silicona y/o vidrio y superficies, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos, pozos y paredes de placa de reacción apropiadas tales como placas de 96 pozos y otras placas, tubos plásticos etc. El ligando utilizado en tales modalidades también se puede unir a un portador apropiado tal como vidrio, poliestireno, polivinilcloruro (PVC), polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble. Los métodos apropiados de inmovilización del ligando con el soporte sólido son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, interacciones iónicas, covalentes, hidrofóbicas y similares. También se contempla el uso de "matrices de suspensión" (Nolan and Sklae, 2002), en donde un portador tal como un microlecho o microesfera está presente en la suspensión, y la matriz consiste de diferentes microperlas o microesferas, posiblemente marcadas, que llevan diferentes ligandos. Los métodos de producción de dichas matrices, por ejemplo se basan en química de fase sólida y grupos protectores foto-lábiles, son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, United States Patent No 5,744,305).

En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, el sujeto de prueba tendrá la necesidad de terapia de reemplazo renal. Se debe entender que la terapia de reemplazo renal puede ser temporal o indefinida como se describe anteriormente.

El presente solicitante ha encontrado que el nivel de MIC-1 se puede utilizar como un predictor independiente de la mortalidad. Como se utiliza en este documento, el término "predictor de la mortalidad" se debe entender que se refiere a un factor médico que se puede medir o considerar en un sujeto para determinar la probabilidad de muerte. El término "predictor independiente de la mortalidad", como se utiliza en este documento, se debe entender que indica que el factor (i.e. nivel de MIC-1) es capaz de predecir la probabilidad de muerte sin considerar cualquier otro factor (que puede o no ser medido simultáneamente). Por consiguiente, en algunas modalidades de los métodos del primer y segundo aspecto, la cantidad elevada de MIC-1 se utiliza como un predictor independiente de la mortalidad. Sin embargo, tales métodos de acuerdo con la presente invención alternativamente pueden ser utilizados en conjunto con otros predictores de la mortalidad. Por ejemplo, los métodos se pueden utilizar en combinación con

niveles de BMI, interleucina-6 (IL-6), niveles proteína Creactiva (CRP) y/o longitud corta del telómero (De Meyer *et al.*, 2008) como predictores de la mortalidad. Por lo tanto, la determinación de una cantidad de MIC-1 junto con BMI y/o CRP y MIC-1 en o por encima de los niveles predeterminados, se pueden utilizar para pronosticar la probabilidad de muerte de un sujeto con CKD.

5 El presente solicitante adicionalmente se ha dado cuenta que niveles de MIC-1 en suero en sujetos con CKD
 incidente tiene una relación independiente con la puntuación de la evaluación nutricional global subjetiva (SGA).
 Adicionalmente, el papel de MIC-1 en la regulación del peso (Johnen *et al.*, 2007), y la participación prominente de
 MIC-1 en procesos inflamatorios (Brown *et al.*, 2002b; Brown *et al.*, 2007) indican que otros factores se pueden
 10 asociar con las concentraciones de MIC-1 en suero. El presente aplicante se ha dado cuenta que los niveles de MIC-
 1 en sujetos con CKD se relaciona independientemente con el componente graso de BMI (FBMI), así como los
 niveles de fibrinógeno y los niveles de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), indicando que MIC-1 en suero es un
 importante, y no reconocido previamente, enlace entre la inflamación, estrés oxidativo, y nutrición reducida en la
 insuficiencia renal, los cuales se consideran determinantes de la mortalidad en enfermedad renal en etapa terminal.

15 Por consiguiente, los métodos de la presente invención se pueden utilizar en conjunto con al menos otro predictor de
 la mortalidad seleccionada del grupo que consiste de pérdida de peso, un BMI disminuido, un FBMI disminuido, SGA
 disminuida, historia de diabetes, historia de enfermedad cardiovascular, y aumento de los niveles de marcadores
 inflamatorios en suero (tales como nivel de proteína Creactiva (CRP) y nivel de fibrinógeno) y niveles de marcadores
 de oxidación (tales como 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG)); en donde al menos otro predictor de la mortalidad
 20 está en o más allá de un punto de partida pre-determinado. Los puntos de corte pre-determinados apropiados para
 cada uno de los anteriores predictores de la mortalidad para predecir la mortalidad serán bien entendidos por los
 expertos en la técnica.

En algunas modalidades de los métodos de la presente invención, la probabilidad de muerte puede ser prevista
 utilizando un análisis de riesgos. Por ejemplo, la probabilidad de muerte se puede predecir utilizando un modelo de
 25 peligro proporcional paramétrico, un modelo de peligro proporcional semi-paramétrico, un modelo de regresión, o un
 modelo de regresión de Poisson. Tales modelos, que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyen el
 modelo de riesgo proporcional de Cox, el modelo de riesgo proporcional de Weibull, y el modelo de regresión de
 Cox.

La invención se describe de ahora en adelante por medio de los ejemplos no limitantes y las figuras anexas.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1 Cohortes del Paciente

Materiales y Métodos

Participan los cohortes de pacientes de hemodiálisis incidentes (i.e. pacientes que han alcanzado la etapa que
 necesita de diálisis pero que aún no han comenzado dicho tratamiento) de Suecia (n=98) y de pacientes de
 hemodiálisis establecida de los Estados Unidos de América (n=381) tuvieron niveles en suero de MIC-1 y Proteína
 35 C-Reactiva (CRP)-4 y BMI medidos en el estudio. El suero CRP-4 (Dade Behring, Inc., Deerfield, IL, United States of
 America) fue determinado como se describe en Brown *et al.* (2002a); y MIC-1 en suero fue determinado como se
 describe anteriormente. La información demográfica recolectada incluyó edad, sexo, historia de enfermedad
 cardiovascular (CVD), historia de diabetes mellitus (DM), altura y peso. Marcadores adicionales de nutrición,
 composición del cuerpo e inflamación se evaluaron en los pacientes Suecos.

40 Cohorte Sueca

Los pacientes suecos fueron pacientes de diálisis incidentes con insuficiencia renal en etapa terminal inscritos en el
 programa de diálisis en el Hospital de la Universidad de Karolinska en Huddinge entre 1997 y 2004. Todos se
 incluyeron como participantes en un estudio prospectivo en curso, partes del cual se han descrito previamente
 (Axelsson *et al.*, 2006). Los pacientes fueron excluidos del estudio si tuvieron menos de 18 años o por encima de 70
 45 años de edad, tuvieron signos clínicos de infección aguda, vasculitis aguda o enfermedad hepática en el momento
 de la evaluación, o no estaban dispuestos a participar en el estudio. Después de una noche de ayuno, se extrajeron
 muestras de sangre venosa y se almacenaron a 70°C para análisis bioquímicos. La tasa de filtración glomerular,
 según lo estimado por el medio de la creatinina y aclaramiento de la urea, se calculó a partir de muestras de orina de
 24-h (i.e. muestras de orina recolectadas durante el curso de un día) utilizando métodos de rutina. Otros análisis
 50 bioquímicos se realizaron utilizando métodos de rutina incluyendo la medición de suero 8-hidroxideoxiguanosina (8-
 OHdG; como una medida de estrés oxidativo), albúmina y creatinina de suero. Los estatus nutricionales se
 evaluaron por evaluación global subjetiva (SGA) (Qureshi *et al.*, 1998) utilizando un cuestionario que incluía seis
 diferentes componentes: tres evaluaciones subjetivas desarrolladas por el paciente con referencia a la historia de
 pérdida de peso del paciente, incidencia de anorexia, e incidencia de vomito; y tres evaluaciones objetivas

desarrolladas por los evaluadores que se basan en la presencia de atrofia muscular (MA), el edema y la pérdida de grasa subcutánea. La clasificación de MA se evaluó por una enfermera especialmente entrenada que examina el músculo temporal, la prominencia de las clavículas, el contorno de los hombros (redondo indica bien alimentado; cuadrado indica desnutrición), visibilidad de la escápula, la visibilidad de las costillas, y masa muscular interósea entre el pulgar y el índice, y la masa muscular del cuádriceps. Los signos de MA se puntuaron de la siguiente manera: 1, ningún signo de MA; 2, signos suaves de MA; 3, signos moderados de MA; 4, signos graves de MA. Esta evaluación se completó ya sea en el momento de, o dentro de 1 semana de recolección de la muestra de sangre. El índice de masa corporal (BMI) se calculó como peso (kg)/ altura (m)². El componente magro de BMI (i.e. LBMI) según lo estimado por absorptiometría de doble energía con rayos-X (DXA) utilizando el dispositivo DPX-L (Lunar Corporation, Madison, WI, Estados Unidos de América) como se describe previamente (Kyle *et al.*, 2003). El componente graso de BMI (i.e. FBMI) se calculó como se describe previamente (Kyle *et al.*, 2003). La fuerza de empuñadura (HGS) se evaluó en ambos el brazo dominante y no-dominante utilizando el Dinamómetro para empuñadura Harpenden (Yamar, Jackson, MI, United States of America). La fuerza de empuñadura se repitió tres veces y el valor más alto se registró. La exposición del paciente fue censurada para trasplante renal (n=48). Tras el trasplante, los pacientes se clasificaron como vivos a partir del momento que entran en estudio para el trasplante y esto sirvió como el tiempo de exposición.

Cohorte de Estados Unidos

381 pacientes de hemodiálisis con insuficiencia renal en etapa terminal fueron reclutados, quienes fueron tratados por hemodiálisis intermitentes tri-semanales crónicas, durante al menos 30 días en unidades de diálisis para pacientes ambulatorios en toda Minneapolis-St. Paul, MN, de Abril de 1998 a Marzo de 1999. Una muestra de sangre antes de la diálisis (i.e. una muestra de antes de una sesión de diálisis tri-semanal regular) fue obtenida de cada paciente. Los pacientes estudiados fueron un subgrupo de la base de datos original de pacientes con enfermedad renal en etapa terminal reportada previamente (Apple *et al.*, 2002) para los cuales volúmenes adecuados de muestra de suero (congelados a 70°C) permanecieron para análisis de biomarcadores adicionales. La exposición del paciente fue censurada para trasplante renal (n=18), interrupción de hemodiálisis (n=1) y transferencia del paciente a otra unidad de diálisis renal (n=16).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar, a menos que se indique de otra manera con $p < 0.05$ indicando significancia. Las cohortes se compararon utilizando la prueba-t no apareada y el análisis de chi-cuadrado para variables continuas y categóricas, respectivamente. Como muchos valores no se distribuyeron normalmente, las correlaciones entre marcadores fueron calculadas por la prueba de rango de Spearman. Las diferencias en tasas de supervivencia acumulada se compararon entre los pacientes con niveles variados de MIC-1. La exposición se calculó a partir de los datos de extracción de la sangre hasta la fecha de muerte con censura primera para la longitud del intervalo de tiempo de interés. En las cohortes sueca y de Estados Unidos, el trasplante renal conduce a que el paciente sea clasificado como censurado y la exposición se calculó al tiempo del trasplante. Adicionalmente, los pacientes de Estados Unidos transferidos a otras instalaciones de diálisis (n=16) se clasificaron como censurados y el tiempo de exposición se calculó al tiempo de la transferencia. Los riesgos relativos ajustados y sin ajustar (RRs) de muerte y los intervalos de confianza al 95% fueron estimados, mediante el uso de modelos de riesgo proporcional de Cox. Los RRs ajustados fueron estimados después de los primeros modelos de ajuste con variables identificadas en análisis previos como factores de riesgo independientes. Las curvas de supervivencia fueron calculadas por el método de Kaplan-Meier y se compararon entre los grupos de estratificación de riesgo utilizando el estadístico log-rango. Los análisis se hicieron con el software StatView 5.0 (SAS Inc, Cary, N.C, United States of America).

Determinación de niveles en suero de MIC-1

Los niveles en suero de MIC-1 se determinaron como se describe en Brown *et al.* (2002) utilizando un ELISA de fase doble de MIC-1. En resumen, el ELISA de fase doble se estableció utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón (MAb) 26G6H6 (Brown *et al.*, 2002a; Moore *et al.*, 2000) para la captura de antígeno y un anticuerpo policlonal de oveja (PAb) 233B3-P para la detección (Brown *et al.*, 2002a). Se determinó la concentración óptima de ambos anticuerpos y luego se utilizó para todos los estudios posteriores. Las placas para ELISA Maxisorp de noventa y seis pozos se cubrieron con sobrenadante MAb 26G6H6 diluido 1:5 (la concentración final fue aproximadamente 20ng/mL) en solución reguladora de recubrimiento (0.1 mol/L de carbonato en agua destilada, pH 9.4-9.8) a 4°C, durante 24 horas. A continuación, las placas de ELISA se lavaron tres veces con 300 μ L/pozo 1% (peso/vol) de albúmina de suero de bovino (BSA) en solución salina regulada con fosfato (PBS) por 2 h a 37°C. A continuación fueron adicionados estándares de MIC-1 recombinante humana, sobrenadante de cultivo de tejido, o suero del paciente a las placas (100 μ L/pozo) y se incubaron, durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron tres veces, seguido por la adición de 100 μ L/pozo del PAb 233B3-P de oveja diluido 1:5000 en diluyente de anticuerpo (PBS que contiene 1% (peso/vol) de BSA y 0.05% (vol/vol) de Tween-20) y se incubaron, durante 1 h a 37°C. Las placas de ELISA se lavaron tres veces, y se adicionaron 100 μ L/pozo de IgG anti-oveja de burro biotinilado diluido a 1:5000 Ab dil y se

5 incubaron, durante 1h a 37°C. Las placas se lavaron cuatro veces, seguido por la adición de 100 µL/pozo de sustrato de peroxidasa (1 mg/mL de diclorhidrato de o-fenilendiamina, Sigma) en 0.05 mol/L de solución reguladora de fosfato-citrato que contiene 0.014% de H₂O₂, pH 5.0 (Sigma). Se dejó proceder el desarrollo del color, durante 5-15 min y se terminó mediante la adición de 100 µL/pozo de H₂SO₄ 4N. La absorbancia se midió a 490 nm en un lector de microplaca. Se determinó la concentración de MIC-1 humana en la muestras, mediante la comparación con la curva estándar de rhMIC-1. La curva estándar fue construida utilizando un software de ajuste de curvas estándar suministrado con el lector de microplaca (Pasteur Diagnostics). La concentración de rhMIC-1 en la curva estándar se determinó sobre la base de una comparación de este estándar con un estándar maestro de MIC-1 recombinante altamente purificado. La concentración del estándar maestro de la proteína se determinó por una media de ocho estimaciones de la composición total del aminoácido. Todas las muestras se ensayaron por triplicado en al menos dos ocasiones. Los resultados se representan como la media +/- SD.

Resultados

15 Las características clínicas y la información demográfica disponibles para ambas cohortes de pacientes se resumen en la Tabla 2. Las mediciones clave de los niveles de BMI, MIC-1 en suero y CRP no fueron significativamente diferentes entre las dos poblaciones (p=0.5117, 0.9672 y 0.0902 respectivamente; prueba-t no apareada). Todos los pacientes con CKD tuvieron niveles de MIC-1 en suero por encima del rango normal de 200-1150 pg/ml (Brown *et al.*, 2003).

Tabla 2 Mediciones demográficas y clínicas

	Cohorte de Estados unidos	Cohorte Sueca
Total	381	98
Edad (años)	61±16	53±13
Sexo		
Hombres	219 (57%)	58 (59%)
Mujeres	162 (43%)	40 (41%)
Diabetes mellitus	176 (46%)	28 (30%)
Historia de enfermedad cardiovascular y/o signos clínicos de cardiopatía isquémica	116 (30%)	29 (30%)
CRP (mg/L)	16.6 ± 24.9	12.0 ± 20.3
MIC-1 (pg/ml)	8345 ± 4996	8396 ± 3697
BMI (Kg/m ²)	25.3 ± 5.6	24.9 ± 4.6
Tiempo de seguimiento (meses)	19.4 ± 8.5	66.4 ± 34.9
Muertes	108 (28%)	36(37%)
Los datos se muestran como número absoluto (porcentaje) o media (± SD)		

20 De los 98 pacientes suecos, la edad media fue 53 años, y 58 (59%) fueron hombres. La media de seguimiento de los pacientes fue 5.5 años (rango: 1.2 años a 13.2 años), con un total de 36 muertes ocurridas durante 319 pacientes-año de seguimiento. Una historia de enfermedad cardiovascular y/o signos clínicos de cardiopatía isquémica (angina de pecho) se presentó en 29 pacientes (30%) y 28 (30%) tuvieron diabetes mellitus, lo cual fue significativamente menor que en la cohorte de los pacientes de Estados Unidos de América (p=0.0023, análisis de chi-cuadrado).

25 De los 381 pacientes de Estados Unidos, la edad media del paciente fue 61 años, que fue significativamente mayor que la población Sueca (p<0.0001, prueba-t no apareada), y 58% fueron hombres. La diabetes y una historia de

enfermedad de arteria coronaria (CAD) se encontraron en el 46% y el 30% de pacientes, respectivamente. La media del número de años con diálisis fue 2.0 años (rango: 0.1-22 años). La media de seguimiento de los pacientes fue 1.6 años (rango: 41 días a 3 años), con un total de 108 muertes que ocurrieron durante 615 pacientes-año de seguimiento.

5 Ejemplo 2 MIC-1 en suero se relaciona con evaluación nutricional global subjetiva (SGA) en la Cohorte Sueca

Los datos relativos a la cohorte de Estados Unidos se han publicado previamente indicando que los niveles de MIC-1 en suero se correlacionan negativamente con BMI (Johen *et al.*, 2007). Para estudiar más a fondo los cambios nutricionales asociados con niveles elevados de MIC-1 en suero, el presente solicitante analizó los datos de los pacientes suecos, de los que se disponía la información nutricional.

10 Resultados y Discusión

La SGA fue segregada en normal (SGA= 1, n=69) o anormal (SGA>1, n=27) con datos que no están disponibles para 2 pacientes. SGA se relacionó significativamente con S-creatinina (p=0.0050), BMI (p=0.0051), la fuerza de empuñadura (p=0.0016 y nivel de MIC-1 en suero (p=0.0065). Los pacientes con MIC-1 en suero por encima de la media (7430 pg/ml) fueron significativamente más propensos a tener una SGA anormal (p=0.0001, chi-cuadrado). El nivel de MIC-1 en suero por encima de la media fue asociado independientemente con SGA en regresión logística multivariante (Tabla 3). Este modelo además se ajustó para los factores que se pueden asociar con MIC-1, específicamente, la edad (Brown *et al.*, 2006, p=0.7024) y la CRP-5 (Brown *et al.* 2002b, p=0.1840).

No se observó una atenuación significativa de la asociación independiente de MIC-1 con SGA.

Tabla 3 Regresión logística multivariante para SGA en la Cohorte Sueca

	Beta	Error estándar	P
MIC-1 (>7400 pg/ml)	2.168	0.712	0.0006
CRP (≥ 10g/l)	2.140	0.014	0.0034
BMI (>24.15 kg/m ²)	-2.163	0.127	0.0047
Creatinina (mg/dl)	-0.006	0.002	0.0003
Edad (años)	-0.011	0.030	0.7024

Esta relación independiente de niveles de MIC-1 en suero con SGA, el papel de MIC-1 en la regulación del peso (Johen *et al.*, 2007) y la participación prominente de MIC-1 en los procesos inflamatorios (Brown *et al.*, 2002b; Brown *et al.*, 2007) sugirió que sería de utilidad examinar otros factores que se pueden asociar con las concentraciones de MIC-1 en suero.

25 Ejemplo 3 El nivel de MIC-1 en suero se relaciona con la nutrición y los marcadores de inflamación y el daño oxidativo en la Cohorte Sueca

Se examinó la relación entre los niveles de MIC-1 en suero y los marcadores de inflamación circulantes (CRP, fibrinógeno) y oxidación (8OHdG), la atrofia muscular, BMI y la edad.

Resultados y Discusión

Como se muestra en la Tabla 4, el nivel de MIC-1 en suero se comparó con los niveles de marcadores de inflamación circulantes (CRP, fibrinógeno), oxidación (8-OHdG) y edad en la población Sueca, ya que estos factores pueden ser indicadores de la mortalidad en enfermedad renal en etapa terminal. El análisis univariado inicial utilizando la prueba de correlación por rangos de Spearman demostró que los niveles de MIC-1 en suero se relacionan con la edad (p=0.252, p=0.0135), CRP (p=0.283, p=0.0056), el fibrinógeno (p=0.346, p=0.0018), 8-OHdG (p=0.308, p=0.0033) y la albúmina de suero (p=-0.211, p=0.0388). El nivel de MIC-1 en suero y la atrofia muscular no se asociaron significativamente como una variable continua; sin embargo, se observó una fuerte tendencia entre MIC-1 en suero por encima de la media (p=0.0514). Del mismo modo, el nivel de MIC-1 en suero y BMI no se asociaron como una variable continua; sin embargo, se observó una fuerte tendencia entre un nivel de MIC-1 en suero por encima de la media y BMI (p=0.0612). Adicionalmente, los pacientes con un MIC-1 en suero por encima

5 de la media fueron más propensos a tener un BMI menor de 25 kg/m² (p=0.0251). El componente graso de BMI (i.e. FBMI) se mantuvo asociado independientemente con los niveles en suero de MIC-1 (p= 0.0004) como los niveles en suero del fibrinógeno (p= 0.0007) y 8-OHdG (p= 0.0485) cuando se incluye en un análisis de regresión logística multivariante escalonada regresivo. Este análisis inicialmente incluyó todas las variables examinadas (Tabla 4) y excluyó los factores que no se asociaron significativamente con MIC-1 en suero de una manera escalonada.

Estos resultados muestran que MIC-1 se relaciona independientemente con FBMI, así como el fibrinógeno y 8-OHdG, indicando que MIC-1 en suero es un importante enlace, no reconocido previamente entre la inflamación, el estrés oxidativo, y la nutrición reducida en la insuficiencia renal, los cuales se consideran determinantes de la mortalidad en la enfermedad renal en etapa terminal.

10 **Tabla 4 Factores correlacionados con los niveles de MIC-1 en suero en la Cohorte Sueca**

Variable	MIC-1		Beta	Error estándar
	Rho	P		
Parámetros Clínicos de Análisis Univariado				
Edad (años)	0.266	0.0090		
GFR (ml/min)	-0.145	0.1799		
Marcadores Nutricionales de Análisis Univariado				
s-creatinina (mg/dl)	0.079	0.4488		
Fuerza de empuñadura (kg)	0.001	0.9910		
BMI (kg/m ²)	-0.066	0.5164		
S-albúmina (g/l)	-0.205	0.0405		
LBMI (kg)	0.060	0.5802		
FBMI (kg)	-0.105	0.3309		
SGA	0.275	0.0077		
Biomarcadores de Oxidación e Inflamatorios de Análisis Univariados				
CRP (mg/l)	0.301	0.0030		
Fibrinógeno (g/l)	0.343	0.0019		
Ferritina (mg/l)	0.198	0.0545		
8-OHdG (ng/ml)	0.308	0.0062		
Regresión multivariante escalonada para Factores Asociados con MIC-1 (pg/ml)				
FBMI (kg/m ²)		0.0004	-0.334	0.109

Fibrinógeno (g/L)		0.0007	0.774	0.264
8-OHdG (ng/ml)		0.0485	1.701	0.868 ($r^2=0.235$)

Ejemplo 4 MIC-1 en suero predice la mortalidad en pacientes de hemodiálisis incidentes en la Cohorte Sueca

El presente solicitante buscó determinar si el nivel de MIC-1 en suero fue predictivo de la mortalidad en pacientes de hemodiálisis.

5 Resultados y Discusión

Los 98 pacientes suecos se clasificaron como que están por encima de o por debajo del nivel medio de MIC-1 en suero (i.e. 7430 pg/ml). El análisis Kaplan-Meier indicó que un nivel en suero de MIC-1 por encima de la media se asocia con un aumento significativo de la tasa de mortalidad ($p=0.0105$, Figura 2). Durante el periodo de observación de más de 13 años, la tasa de supervivencia para pacientes con niveles de MIC-1 en suero por encima de la media fue 53% en comparación con una tasa de supervivencia del 73% para pacientes con niveles de MIC-1 en suero por debajo de la media.

10

Quando el nivel de MIC-1 en suero se incluyó en un análisis multivariado con nivel de edad, sexo, BMI, CRP, y una historia de CVD/DM y GFR, el nivel de MIC-1 en suero fue uno de los más potentes predictores independientes de la mortalidad ($p=0.01840$, riesgos proporcionales de Cox multivariado), mientras que el nivel de CRP y BMI no pudieron ser asociados independientemente con la mortalidad (Tabla 5). En consecuencia, el nivel de MIC-1 en suero fue el más potente predictor marcador en suero de la mortalidad.

15

Los pacientes con CKD tienen a menudo pérdida de energía proteica asociada con la inflamación significativa según lo determinado por la elevación de los marcadores inflamatorios circulantes y los marcadores de estrés oxidativo. Se cree que el daño oxidativo permite los estados inflamatorios crónicos vistos en CKD avanzada. En esta cohorte, MIC-1 en suero también se relaciona con BMI así como la medida de SGA nutricional, independientemente de BMI y CRP. Solo un componente de BMI, FBMI, fibrinógeno y 8-OHDG, una medida *in vivo* de estrés oxidativo, se relacionan independientemente con los niveles de MIC-1 en suero indicando que MIC-1 es un enlace importante, no reconocido previamente, entre el estrés oxidativo, la inflamación, el BMI reducido y la mortalidad in CKD. Estos resultados muestran que niveles de MIC-1 en suero se relacionan significativamente con los marcadores de inflamación circulantes y el estrés oxidativo.

20

25

Por consiguiente, estos resultados indican que el nivel de MIC-1 en suero se puede utilizar como marcador predictivo de la mortalidad por cualquier causa en enfermedad renal en etapa terminal. Después de haber obtenido estos resultados, una segunda cohorte independiente se analizó para validar la medición de MIC-1 en suero como un predictor de la mortalidad en insuficiencia renal en etapa terminal.

30 **Tabla 5 Análisis de riesgos proporcionales de Cox multivariante de la mortalidad por cualquier causa en pacientes de hemodiálisis prevalentes e incidentes**

Variable	Ajuste	Relación de riesgo	95% CI	p
Cohorte Sueca n=98				
MIC-1 pg/ml				
1	Crudo	1.1	1.0-1.2	0.0227
2	1+ edad, sexo, GFR, CVD, Diabetes	1.2	1.0-1.3	0.0149
3	2+ CRP, BMI	1.2	1.0-1.3	0.0184

Modelo final					
MIC (pg/ml)		1.1	1.1-1.2	0.0184	
Edad (1 año)		1.1	1.1-1.2	<0.0001	
Sexo (masculino)		0.5	0.2-1.3	0.1572	
Diabetes (presencia)		3.1	1.2-8.0	0.0172	
CVD (presencia)		1.7	0.8-3.8	0.1332	
GFR (1 ml/min)		1.1	0.9-1.4	0.3457	
CRP (1 mg/L)		1	1.0-1.0	0.635	
BMI (1 kg/m ²)		1	1.1-0.9	0.4524	
Cohorte Estados unidos (n=381)					
<i>MIC-1 pg/ml</i>					
	1	Crudo	1.1	1.0-1.1	0.0047
	2	1+edad, sexo, DV, CVD, Diabetes	1	1.0-1.1	0.0402
	3	2+ CRP, BMI	1	1.0-1.0	0.1117
Modelo final					
MIC (pg/ml)	1 1.0-1.0 0.1117				
Edad (1 año)		1	1.0-1.1	<0.0001	
Sexo (masculino)		1.1	0.7-1.7	0.6867	
Diabetes (presencia)		1.7	1.1-2.5	0.0149	
CVD (presencia)		1.1	0.8-1.1	0.5406	
DV* (días)		1	1.0-1.0	0.9826	
CRP (1 mg/L)		1.1	1.0-1.2	0.0006	
BMI (1 kg/m ²)		0.9	0.9-0.9	<0.0001	
*DV = diálisis vintage					

Ejemplo 5 Nivel de MIC-1 en suero predice mortalidad en los primeros tres años de diálisis

El presente solicitante investigó si MIC-1 puede predecir la mortalidad en pacientes de diálisis prevalentes.

Resultados y Discusión

- En contraste con la cohorte Sueca incidente, la cohorte de Estados Unidos la diálisis había comenzado de entre 30 días y 22 años antes de la medición de MIC-1 en suero. Se encontró que el nivel de MIC-1 en suero se relacionó significativamente con la diálisis vintage (DV) ($p=0.182$, $p=0.0004$) y BMI ($p=-0.224$, $p<0.0001$). Sin embargo, solo BMI fue asociado independientemente con MIC-1 en un análisis de regresión multivariado ($p=0.0019$) cuando se incluye con DV. El nivel de MIC-1 en suero predijo la mortalidad en pacientes de hemodiálisis prevalentes ($p=0.0047$, Tabla 5). Adicionalmente, cuando el nivel de MIC-1 en suero se ajustó por edad, sexo, DV e historia de CVD/DM, MIC-1 en suero permaneció como un predictor independiente de la mortalidad al final del estudio ($p=0.0420$, Tabla 5). Adicionalmente el ajuste para CRP y BMI significativamente atenuó el poder predictivo de MIC-1. En contraste con los resultados observados para la población Sueca, la media del nivel de MIC-1 en la población de USA prevalente fracasó para predecir independientemente de la mortalidad (los datos no se muestran). Sin embargo, los pacientes en esta cohorte prevalente fueron muestreados después de que la diálisis comenzó, lo que podía alterar potencialmente la concentración de MIC-1 en suero. En consecuencia, la relación del nivel de MIC-1 en suero con el riesgo de mortalidad con momentos variados en diálisis.
- En los pacientes suecos incidentes con insuficiencia renal, la asociación de riesgo de muerte rotativo para pacientes (ajustado por edad, sexo, GFR e historia de CVD/DM) con niveles de MIC-1 en suero fue significativa durante los primeros tres años después de la diálisis (para el cohorte completo, $RR=1.16$, 95% de $CI=1.03-1.38$; para pacientes con $DV>1y$, $RR=1.16$, 95% de $CI=1.03-1.38$; para pacientes con $DV>2y$, $RR=1.08$, 95% $CI=0.94-1.23$; para pacientes con $DV>3y$, $RR=0.98$, 95% de $CI=0.82-1.17$; Figura 2). Del mismo modo, en los 381 pacientes de Estados Unidos con diálisis prevalente, los niveles de MIC-1 en suero, después del ajuste para edad, sexo, DV e historia de CVD/DM, también fueron predictivos de la mortalidad en pacientes que han experimentado tres años o menos de diálisis (para el cohorte completo, $RR=1.04$, 95% de $CI=1.00-1.07$; para pacientes con $DV > 1y$, $RR=1.04$, 95% de $CI=1.01-1.08$; para pacientes con $DV > 2y$, $RR=1.04$, 95% de $CI=1.01-1.08$; para pacientes con $DV > 3y$, $RR=1.03$, 95% de $CI=0.98-1.10$). En vista del poder predictivo de MIC-1 en los primeros tres años después de recolección, en ambas poblaciones de diálisis incidente (i.e. cohorte Sueca) y prevalente (i.e. cohorte de Estados Unidos), a continuación se examinó la utilidad de niveles de MIC-1 en suero para predecir la mortalidad en pacientes que han estado con diálisis, durante tres años o menos en la cohorte prevalente de Estados Unidos.

Ejemplo 6 MIC-1 en suero es un predictor de mortalidad temprana en insuficiencia renal en etapa terminal en la Cohorte de Estados Unidos

- Se evaluó la capacidad de los niveles de MIC-1 en suero para predecir la mortalidad en pacientes que han estado con diálisis, durante tres o menos años.

Resultados y Discusión

- De los 149 pacientes de diálisis prevalentes de la cohorte de Estados Unidos con diálisis durante tres años o menos en el final del estudio, 46 murieron y se encontró que el nivel de MIC-1 en suero era un predictor independiente de la mortalidad en análisis multivariado ($p=0.0320$, Tabla 6). Utilizando el análisis Kaplan-Meier, los pacientes con niveles de MIC-1 en suero mayores de la media (i.e. 6300 pg/ml) tuvieron un aumento en el riesgo de la mortalidad en los primeros tres años ($p=0.0124$, Figura 3A). Cuando los pacientes de diálisis incidente fueron comparados con pacientes de diálisis prevalentes que tienen tres o menos años de diálisis, los pacientes sometidos a diálisis tuvieron una media de MIC-1 en suero significativamente inferior (i.e. 7430 pg/ml para pacientes de diálisis incidente en la cohorte Sueca en comparación con 6330 pg/ml para pacientes de diálisis prevalentes en la cohorte de Estados Unidos, $p=0.0136$) indicando que la diálisis disminuye los niveles en suero de MIC-1. Sin pretender imponer ninguna teoría, se razona que los pacientes con niveles de MIC-1 en suero en el decil superior estarían en un mayor riesgo de mortalidad y que este no sería afectado significativamente por la institución de la diálisis, y se vuelven a analizar los resultados estratificados para el decil superior. Se encontró que los pacientes sometidos a diálisis durante menos de tres años con un nivel de MIC-1 en suero en el decil superior (> 14200 pg/ml) tenían un aumento significativo del riesgo de la mortalidad ($p=0.0083$, Figura 3B) y tenían un riesgo relativo de la mortalidad de 2.4 (95% de $CI 1.1-5.2$) ajustado por la edad, CRP, BMI, historia de DM e IHD. Cuando se evaluó la cohorte de diálisis prevalente completa, los pacientes en el decil superior (> 14200 pg/ml para el cohorte completo), tuvieron una tasa de mortalidad de 50% ($p=0.0048$, Figura 3C) y un nivel de MIC-1 en suero mayor de 142000 pg/ml permanece como un predictor independiente de la mortalidad ($n=381$, $RR 1.9$, 95% de $CI 1.1-3.2$ cuando se ajusta por edad, CRP, BMI, historia de DM y IHD y longitud de tiempo de diálisis al entrar al estudio).

- De esta manera, el nivel de MIC-1 en suero es un predictor adicional de la mortalidad, parece tener un poder predictivo igual o superior a CRP y es independiente de los marcadores tradicionales. El poder predictivo del nivel de MIC-1 en suero fue mantenido en los primeros tres años de diálisis en ambas cohortes. La prueba de la población Sueca fue muestreada antes de que la institución de terapia de reemplazo renal, tuviera un número inferior de diabéticos y fue más joven mientras que la cohorte de validación prevalente de Estados Unidos fue muestreada después de la institución de diálisis. Estas diferencias de la población es probable que hayan afectado significativamente el poder del nivel de MIC-1 en suero para predecir la mortalidad en la cohorte de Estados Unidos,

5 como se indica por el hallazgo que la institución de la diálisis se asocia con niveles inferiores de MIC-1 en suero. Sin embargo, MIC-1 se validó como un marcador independiente de la mortalidad en una población sometida a diálisis prevalente tres o menos años de diálisis. Por consiguiente, la reducción en los niveles de MIC-1 por la institución de la diálisis no impactaría significativamente el efecto de MIC-1 en los procesos que conducen a la mortalidad. Adicionalmente, los pacientes con niveles de MIC-1 en suero en el decil superior tuvieron un aumento significativo de la mortalidad, independientemente del tiempo en diálisis.

Tabla 6 Análisis de riesgos proporcionales de Cox multivariante de la mortalidad por cualquier causa en pacientes de diálisis prevalentes sometidos tres o menos años de diálisis en la conclusión del estudio (n=149)

Variable	Ajuste	Relación de riesgo	95% CI	p
Nivel en suero de MIC-1 (pg/ml)				
1	Crudo	1.1	1.0-1.1	0.0025
2	1+ edad, sexo, CVD, Diabetes	1.1	1.1-1.1	0.0102
3	2+ CRP, BMI	1.1	1.0-1.2	0.0186
Modelo final				
MIC (pg/ml)		1.1	1.0-1.2	0.0186
Edad (1 año)		1.1	1.0-1.1	<0.0001
Sexo (masculino)		0.7	0.4-1.4	0.3045
Diabetes (presencia)		1.1	0.6-2.1	0.6665
CVD (presencia)		1.9	0.9-3.6	0.0759
CRP (1 mg/L)		1.1	1.0-1.2	0.0372
BMI (1 kg/m ²)		0.9	0.9-1.0	0.0186

10 De esta manera, se ha demostrado el valor predictivo del nivel de MIC-1 en suero como un posible marcador de la mortalidad por cualquier causa en ambos pacientes de diálisis incidente y prevalente. Adicionalmente, MIC-1 puede ser un mediador de la inflamación, el estrés oxidativo y la caquexia en CKD. La incidencia de CKD está aumentando constantemente y la demanda para trasplante renal sigue superando la disponibilidad de órganos, los que conduce a una morbilidad y mortalidad significativa en pacientes con diálisis esperando para trasplante. Claramente, la capacidad para discriminar entre aquellos pacientes que no toleraran la diálisis por largos periodos ofrece una manera de racionalizar la asignación de órganos.

15 Aunque una modalidad preferida del método de la presente invención se ha descrito en la anterior descripción detallada, se entenderá que la invención no se limita a la modalidad revelada, pero es capaz de numerosos reordenamientos, modificaciones y sustituciones de acuerdo con las reivindicaciones anexas.

20 A lo largo de esta especificación la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Cualquier discusión de los documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que han sido incluidos en la presente especificación es solamente con el fin de proveer un contexto para la presente invención. No se debe tomar como una admisión de que cualquiera o todas estas cuestiones forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimientos generales comunes en el campo relevante a la presente invención, tal como la existente en Australia o en otro lugar antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta aplicación.

Referencias

- Apple, FS et al. Predictive value of cardiac troponin I and T for subsequent death in end-stage renal disease. *Circulation* 106:2941-2945 (2002).
- Apple, FS et al. Multi-biomarker risk stratification of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, high-sensitivity Creactive protein, and cardiac troponin T and I in end-stage renal disease for all-cause death. *Clin Chem* 50:2279-2285 (2004).
- Axelsson, J et al. Are insulin-like growth factor and its binding proteins 1 and 3 clinically useful as markers of malnutrition, sarcopenia and inflammation in end-stage renal disease? *Eur J Clin Nutr* 60:718-726 (2006).
- Baek, SJ et al. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 59: 901-908 (2001).
- Bauskin, A et al. The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1. *Embo J* 19:2212-2220 (2000).
- Bauskin, AR et al. Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumourigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* 66(10):4983-4986 (2006).
- Bootcov, MR et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(21):11514-9 (1997).
- Bottner, M et al. Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res* 297(1):103-110(1999a).
- Bottner, M et al. Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* 237: 105-111 (1999b).
- Brown, DA et al. Antibody-based approach to high-volume genotyping for MIC-1 polymorphism. *BioTechniques* 33:118-20, 122, 124 passim (2002a).
- Brown, DA et al. Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *Lancet* 359:2159-2163 (2002b).
- Brown, DA et al. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: A potential marker of erosive joint destruction. *Arthritis Rheum* 56:753-764 (2007).
- Brown, DA et al. Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine I combined with prostate-specific antigen improves prostate cancer diagnosis. *Clin Cancer Res* 12:89-96 (2006).
- Brown, DA et al. MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:2642-2650 (2003).
- De Mayer, T et al. Studying telomeres in a longitudinal population based study. *Front Biosci* 13:2960-2970 (2008).
- Fairlie, WD et al. MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol* 65(1):2-5 (1999).
- Hanley, JA and BJ McNeil. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143(1):29-36 (1982).
- Hromas, R et al. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta* 1354(1): 40-44 (1997).
- Johnen, H et al. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat. Med* 13:1333-1340 (2007).

- Kalantar-Zadeh, K and VS Balakrishnan. The kidney disease wasting: inflammation, oxidative stress, and diet-gene interaction. *Hemodial Int* 10:315-325 (2006).
- 5 Kempf, T et al. Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay. *Clin Chem* 53 (2):284-291 (2007).
- Kyle, UG et al. Body composition interpretation. Contributions of the fat-free mass index and the body fat mass index. *Nutrition* 19:597-604 (2003).
- Lawton, LN et al., Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene* 203:17-26 (1997).
- 10 Moore, AG et al. The transforming growth factor- β superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is presente in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4781-4788 (2000).
- Morrish, DW et al. Identification by subtractive hybridization of a spectrum of novel and unexpected genes associated with in vitro differentiation of human cytotrophoblast cells. *Placenta* 17:431-441 (1996).
- 15 Nolan, JP and LA Sklar. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. *Trends Biotechnol.* 20 (1):9-12 (2002).
- Nordfors, L et al. End-stage renal disease--not an equal opportunity disease: the role of genetic polymorphisms. *J Intern Med* 258:1-12 (2005).
- Paralkar, VM et al. Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *J Biol Chem* 273 (22):13760-13767 (1998) Qureshi, AR et al. Factors predicting malnutrition in haemodialysis patients: a cross-sectional study. *Kidney Int* 53:773-782 (1998).
- 20 Welsh, JB et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(6):3410-3415 (2003).
- Yokoyama-Kobayashi, M et al. Human cDNA encoding a novel TGF-beta superfamily protein highly expressed in placenta. *J Biochem* 122(3):622-626 (1997).
- 25 REFERENCIAS ADICIONALES
- WO2009/046495 A1 (St Vincent's Hospital Sydney Limited), 16 April 2009. WO2009/021293 A1 (St Vincent's hospital, Sydney Limited), 19 February 2009. WO 2009/141357 A1 (F. Hoffmann La-Roche AG), 26 November 2009.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de pronóstico de muerte de un sujeto de prueba de una enfermedad renal crónica (CKD) de cualquier causa de mortalidad, comprendiendo el método la detección de una cantidad elevada de citoquina inhibidora del macrófago-1 (MIC-1) en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante el uso de medición en serie mediante:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- 10 (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en la(s) muestra(s) comparativa(s) corporal(es) tomada(s) del mismo sujeto en un momento anterior;
- en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).
- 3.** El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta por comparación con un sujeto normal mediante:
- 15 (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) a partir del sujeto(s) normal;
- en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).
- 20 **4.** El método de reivindicación 1, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta por comparación con un sujeto con enfermedad renal en etapa terminal mediante:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de al menos otro sujeto que ha sido diagnosticado con enfermedad renal terminal;
- 25 de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se aumenta en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), el sujeto de prueba tiene un aumento de la probabilidad de muerte en comparación con al menos otro sujeto.
- 30 **5.** El método de reivindicación 1, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta por comparación con una cantidad de referencia de MIC-1 asociada con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto, mediante:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con dicha cantidad de referencia de MIC-1;
- 35 de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto tiene una reducida probabilidad de muerte.
- 6.** Un método de selección de un sujeto de prueba de CDK terminal para un trasplante de riñón, comprendiendo el método la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con un aumento de la probabilidad de muerte del sujeto en la ausencia de un trasplante de riñón.
- 40 **7.** El método de reivindicación 6, en donde el método comprende las siguientes etapas:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y

- (ii) comparación de la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que se asocia con un incremento de la probabilidad de muerte del sujeto en la ausencia de un trasplante de riñón; de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es mayor de o equivalente a la cantidad de referencia, el sujeto tiene un aumento de la probabilidad de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menor de la cantidad de referencia, el sujeto tiene una reducida probabilidad de muerte en la ausencia de un trasplante de riñón.
- 5
- 8.** El método de la reivindicación 6, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta, mediante el uso de la medición en serie mediante:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- 10 (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas del mismo sujeto en un momento inicial;
- en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).
- 9.** El método de reivindicación 6, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta, mediante la comparación con un sujeto normal mediante:
- 15 (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) del mismo sujeto(s) normal(es);
- en donde la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).
- 20 **10.** El método de la reivindicación 6, en donde la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta por comparación con un sujeto con enfermedad renal en la etapa terminal mediante:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en la citada muestra corporal de prueba; y
- 25 (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de al menos otro sujeto que ha sido diagnosticado con enfermedad renal terminal; de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 presente en la etapa (i) se eleva en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), el sujeto de prueba tiene un aumento de la probabilidad de muerte en comparación con al menos otro sujeto.
- 30 **11.** Un método de evaluación de un sujeto de prueba de CDK terminal sometido a diálisis para la tolerancia de dicha diálisis, comprendiendo el método la detección de una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en donde la cantidad elevada de MIC-1 se asocia con una baja tolerancia a la diálisis.
- 12.** El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende las siguientes etapas:
- (i) determinación de la cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto; y
- 35 (ii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) contra una cantidad o un rango de cantidades de MIC-1 presente en la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomadas de dicho sujeto de prueba en un momento al comienzo antes o después del comienzo de dicha diálisis, o sujeto(s) control con enfermedad renal terminal con tolerancia a diálisis a largo plazo, de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es una cantidad elevada en comparación con la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), es probable que el sujeto tenga una baja tolerancia a la diálisis, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menos de o equivalente a la cantidad o rango de cantidades de MIC-1 presente en dicha(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s), es probable que el sujeto tolere la diálisis; o
- 40 (iii) comparación de dicha cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) con una cantidad de referencia de MIC-1 que se asocia con la tolerancia a largo plazo a la diálisis, de tal manera que cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es una cantidad elevada en comparación con la cantidad de referencia de MIC-1, es
- 45

probable que el sujeto tenga una baja tolerancia a la diálisis, y cuando la cantidad de MIC-1 determinada en la etapa (i) es menos de o equivalente a la cantidad de referencia de MIC-1, es probable que el sujeto tolere la diálisis.

- 5 **13.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el método además comprende la detección al menos un predictor de la mortalidad seleccionado del grupo que consiste de índice de masa corporal (BMI) disminuido, índice de masa corporal de componente de grasa disminuido (FBMI), puntuación de evaluación global nutricional (SGA) disminuida, una mayor pérdida de peso, aumento del nivel de proteína reactiva-C en suero (CRP), aumento del nivel de fibrinógeno, y aumento del nivel de 8- hidroxideoxiguanosina (8-OHdG); en donde el o los predictores de la mortalidad son iguales a o más allá de un punto de partida pre-determinado.
- 10 **14.** El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra corporal de prueba se selecciona del grupo que consiste de sangre, plasma, suero y orina.
- 15.** El método de la reivindicación 14, en donde la cantidad elevada de MIC-1 es o corresponde a un nivel de MIC-1 en suero de más de 6000 pg/ml.
- 16.** El método de la reivindicación 14, en donde la cantidad elevada de MIC-1 es o corresponde a un nivel de MIC-1 en suero de más de 7000 pg/ml.
- 15 **17.** El método de reivindicación 14, en donde la cantidad elevada de MIC-1 es o corresponde a un nivel de MIC-1 en suero de más de 14000 pg/ml.

FIGURA 1

(A) Secuencia de polipéptido de MIC-1 humana madura (H6) de tipo salvaje

ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ 60
 IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDDLAKDCH CI (SEQ. ID NO:1) 112

(B) Secuencia de polipéptido de MIC-1 humana madura D6

ARNGDDCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ 60
 IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSLOT YDDLAKDCH CI (SEQ. ID NO:2) 112

FIGURA 2

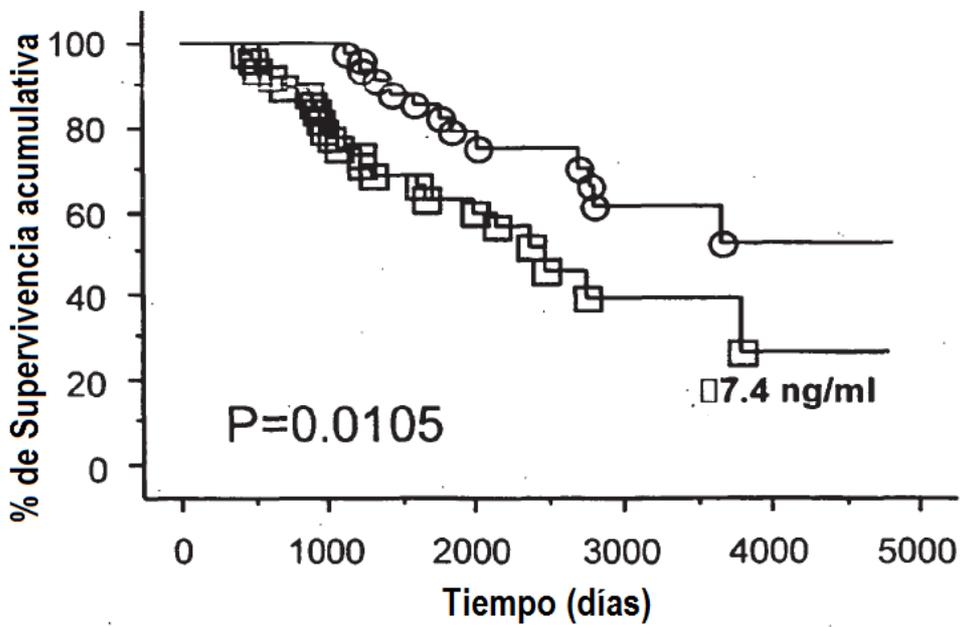


FIGURA 3

