(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 475 990**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008** **E 08850368 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2215481**

(54) Título: **Uso diagnóstico de formas moleculares individuales de un biomarcador**

(30) Prioridad:

**15.11.2007 US 988137 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**11.07.2014**

(73) Titular/es:

**BIOPORTO DIAGNOSTICS A/S (100.0%)**
**Tuborg Havnevej 15, st.**
**2900 Hellerup, DK**

(72) Inventor/es:

**UTTENTHAL, LARS OTTO y**
**BANGERT, KRISTIAN**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 475 990 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

Uso diagnóstico de formas moleculares individuales de un biomarcador

### Campo de la invención

La presente invención se refiere al diagnóstico y monitorización de afecciones patológicas caracterizadas por una alteración de los niveles y formas moleculares de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), en particular a un proceso pernicioso o patológico reciente o continuo en un mamífero que haya afectado o afecte a los riñones y haya conducido o pueda conducir a lesión renal o insuficiencia renal aguda (ARF). Como tal, es relevante para medicina interna y en particular para la medicina de cuidados críticos o intensivos, incluyendo traumatología, y para cirugía, oncología e imagenología de diagnóstico, en que se llevan a cabo procedimientos que pueden dañar los riñones. Es también relevante para medicina y cirugía veterinaria y para el estudio de la fisiopatología renal y las influencias nocivas o terapéuticas sobre el riñón de animales de laboratorio. El ámbito de protección se define por las reivindicaciones.

### Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere al uso diagnóstico de un nuevo biomarcador proteico de patología renal, que aparece tanto en sangre como en orina, para detectar, monitorizar y valorar la gravedad en un ser humano o mamífero de un trastorno o lesión no solo renal, sino también de un trastorno o lesión de otros órganos, tejidos o tipos celulares que liberen esta proteína. El biomarcador proteico es lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), también conocida como lipocalina de neutrófilo (NL; HNL en el caso de la lipocalina de neutrófilo humana), lipocalina 2 (LCN2) o siderocalina en diversos animales incluyendo seres humanos, proteína relacionada con microglobulina α2 de 25 kDa (NRL) en la rata o 24P3, proteína inducible secretada de 24 kDa (SIP24) o uterocalina en el ratón. La NGAL humana es una glucoproteína que se aisló por primera vez en los gránulos de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, designados de aquí en adelante como neutrófilos (Allen *et al.*, 1989; Venge *et al.*, 1990, Triebel *et al.*, 1992; Kjeldsen *et al.*, 1993). La proteína madura consiste en una sola cadena proteica de 178 residuos aminoacídicos y su masa molecular se estima según los casos como de 24 o 25 kDa en su estado glucosilado. La proteína contiene un puente disulfuro intracatenario y la forma humana contiene un residuo de cisteinilo adicional que se cree que participa en la formación de complejos consigo misma o con gelatinasa de neutrófilo. Este residuo de cisteinilo adicional no está presente en la NGAL de las especies no humanas para las que están disponibles secuencias de ADNc hasta la fecha (chimpancé, mono Rhesus, perro, cerdo, caballo, rata y ratón). La NGAL aislada de neutrófilos contiene regularmente una proporción sustancial de homodímeros y ocasionalmente material de masa molecular mayor que se ha propuesto que es un homotrímero. Además, se han detectado trazas de homooligómeros superiores de NGAL de masa molecular variable desde aproximadamente 150 kDa a más de 200 kDa. El hecho de que la NGAL aislada o secretada de neutrófilos humanos *in vitro* contenga una alta proporción de homodímeros ha conducido a que su masa molecular sea reseñada como de 40 o 45 kDa (Venge *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1994).

Una proporción pequeña y variable de la NGAL total aislada o secretada de neutrófilos humanos *in vitro* está asociada a gelatinasa de neutrófilo humana de 92 kDa, también llamada gelatinasa B, colagenasa de tipo IV o metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9), como monómero de NGAL que forma un complejo de 115 kDa aparentes (Monier *et al.*, 2000; Van *et al.*, 2001) o como dímero de NGAL que forma un complejo de 125 kDa aparentes (Yan *et al.*, 2001). Estos complejos se han identificado también en la orina de pacientes con una variedad de cánceres, incluyendo cánceres de próstata, vejiga, riñón y mama.

Los homodímeros, homotrímeros, homooligómeros superiores de NGAL y complejos de NGAL/MMP-9 pueden disociarse en sus monómeros constituyentes mediante reducción, sugiriendo que los complejos están, al menos en parte, ligados covalentemente por puentes disulfuro. Sin embargo, la presencia en NGAL humana de un solo residuo de cisteinilo que no participa en el puente disulfuro intracatenario no puede explicar la formación de trímeros u oligómeros superiores ligados por disulfuro, tanto si estos consisten en NGAL sola o en NGAL en complejo con MMP-9. Los mecanismos mediante los cuales estos homotrímeros, oligómeros superiores o complejos entre MMP-9 y homodímero de NGAL propuestos se mantienen juntos tiene aún que esclarecerse. Ha sido posible generar complejos de NGAL/MMP-9 *in vitro* mediante coincubación de monómero de NGAL humana recombinante con MMP-9 humana recombinante en presencia de tampón que contiene iones de calcio y cinc (Yan *et al.*, 2001). Se reseña que estos complejos tienen una masa molecular de 115 kDa y que tienen una existencia transitoria, mientras que la forma más común de complejo observada en la orina de pacientes con cáncer es la forma de 125 kDa.

Allen *et al.* (1989) observaron también que la masa molecular aparente de NGAL de neutrófilos humanos aumentaba de 24 kDa a 50-70 kDa en presencia de iones de calcio, sugiriendo la formación de dímetros y trímeros que, en opinión de los presentes inventores, podrían estar ligados no covalentemente, al menos inicialmente.

Resulta por tanto evidente que la NGAL humana aparece en neutrófilos en múltiples formas moleculares, incluyendo monómeros, homodímeros (como componente principal), homotrímeros, homooligómeros superiores, monómero complejado con MMP-9 y homodímero complejado con MMP-9. Además, se han observado complejos de NGAL/MMP-9 de masa molecular aparente aún mayor, del orden de 200 kDa. Estos pueden contener homodímeros

de MMP-9 y un número indeterminado de moléculas de NGAL. Las subunidades individuales de estas formas moleculares se mantienen juntas al menos en parte por puentes disulfuro intercatenarios, aunque los residuos de cisteinilo que participan en estos en los diferentes complejos no se han identificado con certeza. Es también posible que fuerzas no covalentes participen en la formación de complejo.

Está disponible menos información sobre las múltiples formas moleculares de NGAL en mamíferos no humanos, tales como rata y ratón. Sin embargo, Bu *et al.* (2006) han mostrado que NGAL y MMP-9 se cosintetizan por células de músculo liso vascular de rata en respuesta a daño angioplástico o estimulación con interleucina 1β. Se ha mostrado por transferencia Western que la NGAL de rata aparecía en formas monomérica, dimérica y trimérica, así como en una forma de 150 kDa. La MMP-9 aparecía en formas monomérica y dimérica. Aunque no pudieron demostrarse complejos de NGAL y MMP-9 de rata en células de músculo liso de íntima de rata lisadas, se demostraron complejos de NGAL/MMP-9 de aproximadamente 115 y 125 kDa en medio de cultivo acondicionado con estas células, demostrado la formación extracelular, pero no intracelular, de complejos de NGAL/MMP-9. La cadena proteica de NGAL de rata contiene solo dos residuos de cisteinilo, que se supone que forman un puente disulfuro intracatenario. Sin embargo, la no disponibilidad de un residuo de cisteinilo adicional en la cadena proteica no parece interferir con la formación de múltiples formas moleculares de NGAL en la rata, que se comportan en transferencia Western en estado no reducido y reducido como si dependieran de la presencia de enlaces disulfuro intercatenarios. Es desconocido cómo se ligan las subunidades de las múltiples formas moleculares observadas en la rata. Es una posibilidad que aparezca intercambio de disulfuro para romper el puente disulfuro intracatenario de modo que puedan formarse ligamentos disulfuro intercatenarios.

Zhao *et al.* (2006) han demostrado también la presencia de complejo de NGAL/MMP-9 en el plasma de ratones tanto de tipo silvestre como con desactivación génica de RECS-1 que tienden a dilatación aórtica. Como la NGAL de rata, la cadena proteica de NGAL de ratón contiene solo dos residuos de cisteinilo.

Por tanto, a pesar de la ausencia de un tercer residuo de cisteinilo en las cadenas proteicas de NGAL de los mamíferos no humanos analizados hasta ahora, la evidencia de rata y ratón sugiere que la NGAL de mamíferos no humanos aparece en múltiples formas moleculares que son comparables con las observadas en el hombre.

Como biomarcador de diagnóstico, la NGAL humana se dio a conocer inicialmente (patente de EE.UU. 6.136.526; solicitud PCT W095/29404), con su denominación HNL, como marcador específico de la activación de neutrófilos, al liberarse en la sangre cuando microorganismos invasores, en particular bacterias piogénicas, causan la desgranulación de los neutrófilos y la exocitosis de las proteínas granulares. Como tal, se ha propuesto la medida de niveles elevados de NGAL en una muestra de plasma o suero de un ser humano para indicar que el individuo está padeciendo un proceso inflamatorio, especialmente uno causado por una infección bacteriana. Este documento da a conocer que la inmunotransferencia de material no reducido liberado *in vitro* de neutrófilos contenía tres bandas inmunorreactivas con HNL de pesos moleculares aparentes de >200 kDa, 45 kDa y 24 kDa. Después de la reducción del material liberado, solo se observaba una banda a un peso molecular aparente de 24 kDa. No se ha realizado ninguna divulgación con respecto a la existencia simultánea de diferentes formas moleculares de la proteína en las muestras de fluidos corporales sobre las que se efectuó la medida de HNL, ni del uso de ningún procedimiento de cuantificación que podría ser selectivo o específico de una de las formas moleculares dadas a conocer.

En el ratón, la NGAL (con su denominación SIP24 o 24P3) se ha identificado como una proteína de fase aguda de tipo 1, estando localizada su expresión principalmente en el hígado durante la respuesta de fase aguda (Liu y Nilsen-Hamilton, 1995). Este documento no da a conocer la aparición de múltiples formas moleculares de la proteína. También contradice, en otra especie, la afirmación realizada en la patente de EE.UU. 6.136.526 de que la NGAL es una proteína que es completamente específica de granulocitos neutrófilos.

La solicitud de patente de EE.UU. 2004/0219603 da a conocer el uso de NGAL como biomarcador urinario para detectar lesión de células tubulares renales en una etapa temprana. La solicitud de patente de EE.UU. 2005/0272101 da a conocer el uso de NGAL en suero sanguíneo con el mismo fin. Sin embargo, ninguna divulgación describe cómo puede discriminarse la lesión de células tubulares renales de la inflamación sistémica, o de la infección bacteriana, o de cánceres, como causa del nivel elevado de NGAL. Ningún documento da a conocer la existencia de múltiples formas moleculares de NGAL ni el uso de ninguna medida selectiva o específica de una forma molecular particular de NGAL.

Los presentes inventores han presentado anteriormente la solicitud PCT W02006/066587 que da a conocer cómo los niveles de NGAL en orina o plasma o suero sanguíneo pueden separarse mediante un nivel de corte en elevaciones menores que no son de diagnóstico de lesión renal que conduce a ARF y elevaciones mayores que lo son. El documento W02006/066587 tiene en cuenta el hecho de que los niveles de NGAL en fluidos corporales pueden ser también elevados en inflamaciones, infecciones y ciertos cánceres, pero habitualmente a niveles menores que los asociados a lesión renal que conduce a ARF.

Los presentes inventores han presentado también una solicitud provisional de patente de EE.UU. (nº 60/919.277) que da a conocer un procedimiento de distinción entre subidas de NGAL en fluidos corporales que son debidas a lesión renal y aquellas que son debidas a causas no renales, sin recurrir al uso de un valor de corte para la

concentración de NGAL en un fluido corporal dado. Este procedimiento comprende determinar la relación de concentración de NGAL en una muestra de orina con la presente al mismo tiempo en una muestra de plasma o suero sanguíneo. Una relación que supere un valor aproximadamente unitario indica que el individuo del que se tomaron las muestras ha padecido una lesión renal que ha conducido a ARF o significa un riesgo inmediato de desarrollar ARF.

Ninguna de las divulgaciones anteriormente citadas por los presentes inventores depende de la detección o medida de una forma molecular particular de NGAL, así como ninguna de las divulgaciones anteriormente mencionadas por otros autores referentes al uso diagnóstico de la determinación de NGAL da a conocer la medida de una forma molecular individual específica de NGAL que no está complejada con MMP-9.

**Definiciones**

La presente divulgación hace uso de los siguientes términos que, debido a que se han usado a veces con diversos significados especializados o restrictivos en la técnica anterior, requieren la definición del sentido en que se usan en la presente memoria.

Trastorno renal: Cualquier afección anormal o patológica que afecte al funcionamiento de los riñones, tanto si la afección surge en el riñón o fuera de él.

Enfermedad renal: Cualquier trastorno renal que se considere que constituye una entidad patológica clasificable.

Lesión renal: Cualquier lesión del riñón, sea de origen físico (por ejemplo traumático), químico (nefrotóxico) o patológico (relacionada con la enfermedad), en particular cualquier lesión que afecte a un número suficiente de células renales para producir una deficiencia detectable de una función renal.

Lesión renal aguda: Una lesión renal que surge rápidamente, típicamente en unas pocas horas.

Insuficiencia renal aguda (ARF): Una deficiencia o pérdida de surgimiento rápido y variable (concretamente no necesariamente completa) de las funciones excretoras y homeostáticas principales del riñón, como se evidencia típicamente por una subida de la creatinina sérica por encima y más allá de las fluctuaciones debidas a cambios metabólicos y/o por una caída en el índice de producción de orina.

**Sumario de la invención**

Al analizar muestras de fluidos corporales de pacientes que han mostrado evidencias clínicas y bioquímicas de trastornos renales, incluyendo lesión renal aguda, y de individuos de control que no, se ha encontrado sorprendentemente que la NGAL liberada en la sangre y la orina por los riñones afectados está mayoritariamente en forma monomérica libre. Este hallazgo contrasta con la NGAL inmunorreactiva que se ha encontrado a menores niveles en el suero sanguíneo de individuos normales, que se cree que deriva en su mayoría de fuentes no renales tales como neutrófilos en circulación y quizás ciertas células epiteliales, y consiste en complejos superiores de NGAL que incluyen complejos de NGAL/MMP-9, homotrímero de NGAL, homodímero de NGAL y monómero de NGAL. Contrasta también con la NGAL encontrada en fluidos corporales en otras afecciones patológicas, tales como ciertos adenocarcinomas, que se caracteriza por la presencia de complejos de NGAL/MMP-9 y oligómeros de NGAL además del monómero de NGAL.

Esta observación posibilita mejorar la especificidad de la medida de NGAL en plasma sanguíneo, tanto separada de sangre completa anticoagulada antes de la medida como filtrada de sangre completa anticoagulada como parte del procedimiento de medida, o en suero u orina, para diagnosticar trastornos renales, incluyendo lesión renal. Resulta evidente que el mismo principio de medida de las formas moleculares individuales de NGAL puede aplicarse al diagnóstico de trastornos o lesiones de otros órganos, tejidos y tipos celulares que liberan un patrón diferente de estas formas moleculares que el riñón.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico, monitorización o valoración de la gravedad de una enfermedad o lesión de un órgano, tejido o tipo celular en un mamífero mediante la medida de la concentración de una forma molecular individual de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL) en una muestra de fluido corporal del mamífero. En una realización particular, la forma molecular individual de NGAL es monómero de NGAL libre.

El monómero de NGAL libre puede medirse mediante una molécula que se una específicamente a monómero de NGAL libre y no a formas complejadas de NGAL de la especie de mamífero a la que se aplica el procedimiento. El monómero de NGAL libre puede medirse también mediante una molécula de unión a NGAL o combinación de dichas moléculas que se unan tanto a monómero de NGAL libre como a formas complejadas de NGAL, una vez que se ha separado el monómero de NGAL libre de las formas complejadas mediante un procedimiento físico o químico que sea tanto rápido como adecuado para automatización, excluyendo estos requisitos la electroforesis en gel. El monómero de NGAL libre puede medirse también indirectamente por la diferencia entre la NGAL total y complejada en una muestra, midiéndose la NGAL total mediante una molécula de unión a NGAL o combinación de dichas moléculas que se unan tanto a monómero de NGAL libre como a formas complejadas de NGAL, y midiéndose la

NGAL complejada mediante una combinación de moléculas de unión a NGAL que son incapaces de unirse a la vez y al mismo tiempo a monómero de NGAL libre.

En otro ejemplo, la forma molecular individual de NGAL es homodímero de NGAL.

En otro ejemplo, se mide una combinación de homodímero de NGAL y oligómeros superiores, pero excluyendo el monómero de NGAL libre. Esta combinación de formas moleculares de NGAL puede medirse mediante una combinación de moléculas de unión que son incapaces de unirse a la vez y al mismo tiempo a monómero de NGAL libre.

Es un aspecto adicional de la presente invención el uso de una forma molecular individual de NGAL como molécula marcadora de diagnóstico de enfermedad o lesión celular o de tejido en un mamífero, en que dicha forma molécula de NGAL es NGAL que se ha glucosilado de manera particular por sus células originales, siendo esa manera particular distinguible de la NGAL que se ha glucosilado de otro modo por diferentes células originales.

Un aspecto de la presente invención comprende el uso de procedimientos de medida de NGAL en fluidos corporales que son específicos o selectivos de la forma de monómero libre de NGAL. Estos procedimientos registrarán niveles menores de NGAL que los procedimientos no selectivos de medida de NGAL en individuos normales o pacientes con elevaciones de los niveles de NGAL debidas a causas distintas de lesión o trastorno renal. Al mismo tiempo, la elevación del monómero de NGAL debido a lesión o trastorno renal se leerá completamente mediante el procedimiento de medida específico de monómero. El uso del procedimiento de medida de NGAL específico de monómero será por lo tanto más selectivo para detectar lesión o trastorno renal que aquellos procedimientos de medida de NGAL que muestran poca o ninguna selectividad por sus diferentes formas moleculares.

A la inversa, los procedimientos que miden exclusivamente homodímeros o procedimientos que miden exclusivamente homodímeros y oligómeros superiores de NGAL pueden ser útiles para el diagnóstico de afecciones caracterizadas por niveles elevados de NGAL secretada por tejidos no renales que sintetizan estas formas moleculares de NGAL.

Por consiguiente, un aspecto adicional se refiere al diagnóstico, monitorización o valoración de la gravedad de la enfermedad o lesión de un órgano, tejido o tipo celular en un mamífero, estando caracterizada dicha enfermedad o lesión por un cierto patrón de formas moleculares individuales de NGAL que están presentes en un fluido corporal de dicho mamífero, mediante la medida de las concentraciones de dos o más formas moleculares individuales de NGAL en una muestra del fluido corporal.

La medida de complejos de NGAL/MMP-9 es conocida por la técnica anterior y no forma parte de la presente invención, excepto en tanto que dicha medida se realice para comparar el resultado con los resultados obtenidos según la presente invención. La medida del complejo de NGAL/MMP-9 se describe, por ejemplo, en el inserto de producto del kit de inmunoensayo del complejo MMP-9/NGAL humano Quantikine, número de catálogo DM9L20, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.

Se han ideado procedimientos de unión a ligando específicos que miden específicamente monómeros de NGAL libres o dímeros y oligómeros superiores de NGAL, respectivamente.

**Descripción de los dibujos**

**Figura 1**

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) de plasma de un paciente con necrosis tubular aguda. La línea muestra los picos de absorción UV a 280 nm correspondientes (de izquierda a derecha) a macroglobulinas (pico a aproximadamente 54 ml), inmunoglobulinas (pico a aproximadamente 69 ml) y albúmina (pico a aproximadamente 79 ml). Las barras con bloques muestran la inmunorreactividad a NGAL en las fracciones recogidas analizadas con una ELISA que detecta tanto las formas monomérica como oligomerizadas de NGAL. Se observaron cuatro regiones de inmunorreactividad a NGAL: un pico pequeño que aparece aproximadamente a 60-65 ml y atribuible a formas complejadas superiores de NGAL (1,0 % de la inmunorreactividad a NGAL total asignable a una forma molecular individual), una cantidad traza que aparece aproximadamente a 74-79 ml y atribuible al homotrímero de NGAL (0,8 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total), un pico mayor que aparece aproximadamente a 79-87 ml y atribuible al homodímero de NGAL (22,3 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total) y un gran pico que aparece a aproximadamente 88-101 ml y atribuible al monómero de NGAL libre (75,9 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total).

**Figura 2**

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular de orina de otro paciente con necrosis tubular aguda efectuada como en la Figura 1. Se observaron dos picos de inmunorreactividad a NGAL: un pico pequeño que aparece a aproximadamente 78-86 ml y atribuible al homodímero de NGAL (3,0 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total) y un gran pico que aparece aproximadamente a 87-99 ml y atribuible al monómero de NGAL libre (97,0 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total).

**Figura 3**

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular de suero humano normal efectuada como en la Figura 1. Se observaron cuatro picos de inmunorreactividad a NGAL: un pico que aparece a aproximadamente 56-65 ml y atribuible a formas complejadas superiores de NGAL (24,1 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total), un pico que aparece a aproximadamente 70-78 ml y atribuible al homotrímero de NGAL (24,5 % de la inmunorreactividad asignable total), un pico que aparece a aproximadamente 78-86 ml y atribuible al homodímero de NGAL (33,1 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total) y un pico que aparece a aproximadamente 88-100 ml y atribuible al monómero de NGAL libre (18,3 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total).

**Figura 4**

Representaciones de la característica operativa del receptor (ROC) para niveles plasmáticos de monómero de NGAL (cruces), homodímero de NGAL (rombos) y NGAL "total" (triángulos), comprendiendo la NGAL "total" las formas monomérica y homodimérica con una posible contribución de formas oligoméricas superiores. Se obtuvieron los niveles plasmáticos máximos para 38 pacientes ingresados en cuidados intensivos, en 19 de los cuales se diagnosticó que tenían lesión renal aguda. Se observa que los niveles plasmáticos de homodímero de NGAL son inadecuados para el diagnóstico de lesión renal aguda.

**Descripción detallada de la invención**

En una serie de pacientes enfermos críticos ingresados en cuidados intensivos, se ha observado que la subida de las concentraciones de NGAL en fluido corporal debido a trastorno o lesión renal da lugar a un patrón diferente de formas moleculares de NGAL en el plasma sanguíneo y orina que el patrón observado normalmente en individuos sanos o pacientes sin trastorno o lesión renal.

En un individuo sano, la inmunorreactividad a NGAL en el plasma o suero sanguíneo ocurre en las formas moleculares (intervalos de concentración estimados entre paréntesis) correspondientes a monómero de NGAL libre (10-50 %), una cantidad generalmente mayor de homodímero de NGAL (25-60 %) y cantidades menores de homotrímero de NGAL (5-35 %) y formas complejadas superiores de NGAL, incluyendo el complejo de NGAL/MMP-9 (5-35 %). En la orina de individuos sano, el nivel basal de inmunorreactividad a NGAL total es muy bajo y por el momento ha sido impracticable analizar el contenido relativo de las formas moleculares anteriormente mencionadas.

En pacientes con un nivel moderadamente elevado de NGAL debido a enfermedad no renal, el patrón de formas moleculares de NGAL en el plasma sanguíneo permanece esencialmente similar al observado en el estado basal normal. En estos pacientes, el patrón de formas moleculares de NGAL en orina es tal que la forma monomérica predomina, pero sigue habiendo una cantidad moderada de homodímero de NGAL presente. La presencia de complejo de NGAL/MMP-9 en orina es irregular.

En pacientes con niveles elevados de NGAL debido a lesión renal aguda, el patrón de formas moleculares de NGAL en el plasma sanguíneo es muy diferente del observado en el estado normal o en enfermedad no renal. La forma molecular predominante en plasma sanguíneo es monómero de NGAL (70-80 %), con una cantidad relativamente pequeña de homodímero de NGAL (20-30 %), trazas de homotrímero de NGAL (0-2 %) y una presencia pequeña e irregular de formas de tamaño molecular mayor, incluyendo complejos de NGAL/MMP-9 (0-2 %).

Estas observaciones sugieren que la forma molecular predominante de NGAL secretada por el riñón en respuesta a la lesión renal es la forma monomérica libre de NGAL. Solo se secreta una cantidad relativamente pequeña de homodímero, y la secreción de formas de tamaño molecular mayor de NGAL, incluyendo complejos de NGAL/MMP-9, es baja y no ocurre regularmente.

Hasta la fecha, se ha propuesto a NGAL como una molécula marcadora de trastornos renales incluyendo lesión renal aguda, sin especificar que esté implicada una forma molecular particular de NGAL. Se propone ahora que el marcador molecular de lesión renal sea el monómero de NGAL, ya que los neutrófilos y otros tipos celulares que liberan también NGAL en sus alrededores liberan típicamente también grandes cantidades de homodímero de NGAL y cantidades variables de oligómeros superiores de NGAL, incluyendo complejo de NGAL/MMP-9.

En consecuencia, se propone que puede diagnosticarse la lesión renal con mayor especificidad de diagnóstico si la concentración de monómero de NGAL libre se mide mediante un procedimiento específico de esa forma molecular, en lugar de medir la mezcla de diferentes formas moleculares de NGAL mediante procedimientos existentes que no son conocidos por ser selectivos de ninguna de estas formas. Con respecto a la aplicabilidad de diagnóstico del procedimiento con vistas a una progresión rápida de la lesión renal aguda, es deseable que el procedimiento de medida sea rápido, de modo que el resultado esté disponible en poco tiempo, tal como en 4 horas o menos. Esto descartaría la separación de las formas moleculares de NGAL por electroforesis en gel, que se ha usado en la técnica anterior para el análisis retrospectivo de las formas moleculares de NGAL.

Por consiguiente, la presente divulgación comprende un procedimiento de diagnóstico o monitorización de una lesión, enfermedad o trastorno renal que ha conducido a ARF o que significa un riesgo inmediato de desarrollo de ARF en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

i) determinar la concentración de monómero de NGAL libre en una muestra de fluido corporal del mamífero y

ii) comparar dicho valor de concentración con un valor de corte determinado a partir del intervalo de concentraciones de monómero de NGAL libre en otros individuos de esa especie de mamífero que no muestran evidencias de lesión, enfermedad o trastorno renal, de modo que un valor mayor que el valor de corte indica la presencia de dicha lesión, enfermedad o trastorno renal.

En un ejemplo preferido, la etapa i) del procedimiento dado a conocer anteriormente no incluye electroforesis en gel.

En ejemplo particulares del procedimiento, el valor de corte para muestras de plasma sanguíneo o suero sanguíneo puede ser un valor entre 60 ng/ml y 600 ng/ml, tal como 65 ng/ml o más, tal como 70 ng/ml o más, tal como 80 ng/ml o más, tal como 90 ng/ml o más, tal como 100 ng/ml o más, tal como 120 ng/ml o más, tal como 150 ng/ml o más, tal como 200 ng/ml o más, tal como 250 ng/ml o más, tal como 300 ng/ml o más, tal como 350 ng/ml o más, tal como 400 ng/ml o más, tal como 450 ng/ml o más, tal como 500 ng/ml o más, tal como 550 ng/ml o más; y el valor de corte para muestras de orina puede ser un valor entre 10 ng/ml y 600 ng/ml, tal como 15 ng/ml o más, tal como 20 ng/ml o más, tal como 30 ng/ml o más, tal como 40 ng/ml o más, tal como 50 ng/ml o más, tal como 60 ng/ml o más, tal como 70 ng/ml o más, tal como 80 ng/ml o más, tal como 90 ng/ml o más, tal como 100 ng/ml o más, tal como 120 ng/ml o más, tal como 150 ng/ml o más, tal como 200 ng/ml o más, tal como 250 ng/ml o más, tal como 300 ng/ml o más, tal como 350 ng/ml o más, tal como 400 ng/ml o más, tal como 450 ng/ml o más, tal como 500 ng/ml o más y tal como 550 ng/ml o más.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico, monitorización o determinación del riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda en un mamífero, en el que dicho procedimiento discrimina entre un individuo que no tiene insuficiencia renal aguda y no está en riesgo inmediato de desarrollar insuficiencia renal aguda, y un individuo que puede tener insuficiencia renal aguda o estar en riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

i) determinar la concentración de monómero de NGAL libre en una muestra de fluido corporal del mamífero y

ii) comparar dicha concentración con un valor de corte predeterminado elegido para que una concentración de monómero de NGAL libre por debajo del valor de corte clasifique al mamífero por no tener y no estar en riesgo inmediato de desarrollo de insuficiencia renal aguda.

En un ejemplo preferido, la etapa i) del procedimiento dado a conocer anteriormente no incluye el uso de electroforesis en gel. En ejemplos particulares del procedimiento, el valor de corte para muestras de plasma sanguíneo o suero sanguíneo puede ser un valor entre 600 ng/ml y 60 ng/ml, tal como 550 ng/ml o menos, tal como 500 ng/ml o menos, tal como 450 ng/ml o menos, tal como 400 ng/ml o menos, tal como 350 ng/ml o menos, tal como 300 ng/ml o menos, tal como 250 ng/ml o menos, tal como 200 ng/ml o menos, tal como 150 ng/ml o menos, tal como 120 ng/ml o menos, tal como 100 ng/ml o menos, tal como 90 ng/ml o menos, tal como 80 ng/ml o menos, tal como 70 ng/ml o menos, tal como 65 ng/ml o menos; y el valor de corte para muestras de orina puede ser un valor entre 600 ng/ml y 10 ng/ml, tal como 550 ng/ml o menos, tal como 500 ng/ml o menos, tal como 450 ng/ml o menos, tal como 400 ng/ml o menos, tal como 350 ng/ml o menos, tal como 300 ng/ml o menos, tal como 250 ng/ml o menos, tal como 200 ng/ml o menos, tal como 150 ng/ml o menos, tal como 120 ng/ml o menos, tal como 100 ng/ml o menos, tal como 90 ng/ml o menos, tal como 80 ng/ml o menos, tal como 70 ng/ml o menos, tal como 60 ng/ml o menos, tal como 50 ng/ml o menos, tal como 40 ng/ml o menos, tal como 30 ng/ml o menos, tal como 20 ng/ml o menos y tal como 15 ng/ml o menos.

En una realización particular de la presente invención, los procedimientos de monitorización anteriores comprenden la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) una o más veces, particularmente durante el transcurso de una dolencia crítica, después de un procedimiento médico o quirúrgico conocido por conllevar un riesgo de lesión renal o después iniciar o completar un tratamiento de insuficiencia renal aguda.

Dichas etapas i) y ii) pueden repetirse en una realización particular dentro de 24 horas, por ejemplo dentro de 12 horas, tal como dentro de 6 horas, por ejemplo dentro de 3 horas, tal como dentro de 1 hora, por ejemplo dentro de 30 minutos o dentro de 15 minutos.

La práctica del procedimiento requiere un procedimiento de medida que sea específico de monómeros de NGAL libres. En una realización preferida de la invención, el procedimiento de medida es un ensayo de unión a ligando tal como un ensayo inmunoquímico que use anticuerpos monoclonales específicos u otras moléculas de unión específicas, aunque generadas para unirse específicamente a y medir la forma monomérica libre de NGAL, sin medir las demás formas moleculares de NGAL. Se dan detalles de dicho procedimiento en el Ejemplo 4 siguiente.

A la inversa, en otro ejemplo, es también posible medir la concentración de homodímero de NGAL en una muestra de fluido corporal de un mamífero. Se dan detalles de dicho procedimiento en el Ejemplo 5 siguiente. La medida de homodímeros de NGAL puede probarse útil en el diagnóstico de afecciones de otros órganos o tejidos que liberan homodímeros de NGAL, tales como neutrófilos y una serie de epitelios no renales, incluyendo epitelios del tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal incluyendo el hígado, y el tracto urogenital incluyendo la glándula mamaria. La medida de homodímeros de NGAL puede ser relevante para la detección de inflamación, tanto sistémica como

localizada, y el diagnóstico de afecciones patológicas que afecten a células, tejidos u órganos de dichos tractos, o incluso cualquier tipo celular, tejido u órgano que se encuentre que secreta homodímeros de NGAL

Es posible determinar las concentraciones tanto de monómero de NGAL libre por un lado como de homodímero de NGAL más oligómeros superiores por otro lado en una muestra de fluido corporal mediante un ensayo combinado que da ambos resultados de manera rápida y conveniente, sin requerir la separación de las dos formas moleculares. Esto se describe en el Ejemplo 6 siguiente. El monómero de NGAL libre, homodímero de NGAL y formas de mayor tamaño molecular de NGAL pueden analizarse también en una muestra separando estas formas mediante un procedimiento de separación de proteínas, después del cual se determina la cantidad de cada forma molecular mediante uno de los procedimientos no específicos de medida de NGAL conocidos en la técnica anterior. Combinar la medida de monómero de NGAL libre y homodímero de NGAL más oligómeros superiores mediante un procedimiento sin separación con procedimientos establecidos de determinación del complejo de NGAL/MMP-9 dará un perfil razonablemente completo de las formas moleculares de NGAL presentes en la muestra, sin necesidad de separación de proteínas, por ejemplo, mediante análisis cromatográfico. Este perfil de formas moleculares de NGAL puede ser de uso diagnóstico para identificar la afección de un órgano particular o enfermedades simultáneas que afecten a órganos diferentes.

Un aspecto del análisis del perfil de formas moleculares de NGAL comprende determinar las concentraciones absolutas de monómero y homodímero de NGAL como se afirma anteriormente y calcular la relación entre ellas. La relación obtenida en una muestra de un individuo dado puede usarse para distinguir entre patologías caracterizadas por determinados intervalos de valores de la relación de monómero: homodímero de NGAL. Por ejemplo, la relación de monómero a homodímero de NGAL observada en plasma o suero en lesión renal aguda es superior a la unidad, tal como un valor de 1,5 o más, tal como 2 o más, tal como 3 o más, tal como 4 o más, tal como 5 o más y hasta 10 o más. La relación de monómero a homodímero de NGAL observada en orina en lesión renal aguda está también muy por encima de la unidad, y es típicamente mayor que en plasma, comprendiendo cualquier valor entre 2 y 100 o más, tal como 3 o más, tal como 4 o más, tal como 5 o más, tal como 7 o más, tal como 10 o más, tal como 20 o más, tal como 30 o más y tal como 50 o más.

Es un procedimiento adicional de análisis del perfil de formas moleculares de NGAL determinar la concentración de una o más de aquellas formas de NGAL que no están complejadas con MMP-9 mediante los procedimientos aquí dados a conocer y comparar esto con la concentración de complejos de NGAL/MMP-9 determinada mediante otros procedimientos. La relación entre la concentración de aquellas formas de NGAL que no están complejadas con MMP-9 y la concentración de complejos de NGAL/MMP-9 puede calcularse. En plasma, suero u orina, estas relaciones pueden oscilar desde valores muy por debajo de la unidad a cualquier valor por encima de la unidad en diferentes afecciones patológicas. Se esperan relaciones bajas (por ejemplo, de menos de la unidad a un valor de 5) en ciertas afecciones neoplásicas, y se esperan relaciones mayores (por ejemplo, por encima de 5) en trastornos no neoplásicos. Es más, en muchos casos no se detecta complejo de NGAL/MMP-9.

El principio general de la presente divulgación es volver el uso de la determinación de NGAL específico de diagnóstico para afecciones de diferentes órganos y tejidos explotando las diferencias específicas en las formas moleculares de NGAL producidas por sus diferentes células de origen en respuesta a enfermedades o estímulos dañinos. Un aspecto adicional de la presente divulgación es que las diferencias en la glucosilación de NGAL por diferentes tipos de células o tejidos pueden explotarse también para diagnóstico para medir la NGAL originaria de un tejido u órgano particular

Los procedimientos de la presente invención son particularmente útiles en pacientes ingresados en departamentos de cuidados intensivos o críticos, y serán también útiles en pacientes que, aunque no críticamente enfermos, hayan padecido un ataque bien definido tal como una operación quirúrgica que pueda conducir a lesión isquémica del riñón o se hayan expuesto a agentes nefrotóxicos tales como medios de contraste administrados por vía intravenosa para imagenología de diagnóstico, o se hayan expuesto a agentes quimioterapéuticos nefrotóxicos. Los procedimientos de la presente invención son también particularmente útiles para determinar el riesgo de desarrollar ARF debido a lesión renal causada por isquemia, o debido a una complicación de una enfermedad inflamatoria, infecciosa o neoplásica, o cualquier causa que requiera cuidados intensivos o una intervención quirúrgica, en particular cuando la intervención quirúrgica pueda conducir a lesión isquémica del riñón. En estos casos, la identificación temprana de pacientes cuyos riñones se hayan afectado por un proceso patológico o un procedimiento médico o quirúrgico y que por lo tanto estén en riesgo de ARF puede permitir una intervención más temprana y más intensiva para evitar el desarrollo de ARF. Los procedimientos de la presente invención son también útiles para diagnosticar y monitorizar trastornos o lesiones de otros órganos, tejidos y tipos celulares que liberen un patrón diferente de formas moleculares de NGAL que las liberadas por el riñón. Además, dichos procedimientos serán útiles para determinar el daño de órganos y tejidos debido a la lesión por causas físicas o química externas o por exposición a radiación.

Los procedimientos de la presente invención serán también útiles en medicina veterinaria, la investigación de la fisiopatología renal en animales experimentales y el ensayo de candidatos a agentes terapéuticos o de diagnóstico para nefrotoxicidad en animales de laboratorio.

Es un aspecto adicional que el procedimiento puede usarse para monitorizar pacientes a lo largo del transcurso de una dolencia o en diversos momentos después de una intervención médica o quirúrgica que pueda aliviar la dolencia

o acarrear un riesgo de provocar daño de órganos o tejidos. Los intervalos en que se toman muestras de fluidos corporales para monitorizar pueden ser cortos, proporcionando por tanto la indicación más temprana posible del daño de órganos y permitiendo la institución temprana de medidas preventivas o terapéuticas. La monitorización de la concentración plasmática o urinaria de formas moleculares individuales de NGAL con este fin se lleva a cabo preferiblemente a intervalos no superiores a 24 horas, y más preferiblemente a intervalos más cortos tales como de 16 o 12 horas, más preferiblemente de 9 o 6 horas, hasta un periodo sugerido de no más de 3 horas, o incluso más corto tal como de 15 minutos o 30 minutos o 1 hora, por ejemplo si se sabe que ha ocurrido un ataque potencial, por ejemplo, durante un procedimiento quirúrgico o médico.

La medida del monómero de NGAL libre u homodímero de NGAL en una muestra de fluido corporal, incluyendo pero sin limitación orina, plasma o suero, puede efectuarse mediante cualquier procedimiento que proporcione una especificidad, sensibilidad y precisión analíticas satisfactorias. Son procedimientos preferidos ensayos de unión que usan una molécula de unión específica de monómero de NGAL libre o una molécula de unión o combinación de moléculas de unión específicas de homodímero de NGAL, siendo todas dichas moléculas de unión capaces de unirse a NGAL de la especie de mamífero de la que se obtienen las muestras. Dichas moléculas de unión incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales contra NGAL o moléculas de unión a NGAL específicas generadas por otros medios.

En un procedimiento preferido, se usan anticuerpos monoclonales creados contra NGAL recombinante de la especie de mamífero para analizar. El anticuerpo específico de monómero de NGAL puede seleccionarse mediante diversos procedimientos, describiéndose un ejemplo no limitante en el ejemplo 3 siguiente. Un anticuerpo se liga a un soporte sólido para capturar NGAL de una muestra, tal como una muestra de orina, una muestra de plasma o suero sanguíneo, mientras que el otro, por ejemplo un anticuerpo específico de la forma monomérica libre de NGAL, se liga con un marcador tal como un complejo de tinción, fluoróforo, resto de detección electroquímica, biotina o enzima, que puede detectarse mediante cualquier de los muchos procedimientos conocidos por los especialistas en la materia. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, una superficie de poliestireno o poli(cloruro de vinilo) para ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA), partículas de látex (poliestireno), partículas paramagnéticas, una frita de filtro compuesta por partículas de polietileno comprimidas o una matriz porosa de nitrocelulosa, o incluso cualquier soporte adecuado usado en análisis inmunoquímicos. Pueden usarse también partículas recubiertas con moléculas que se unen específicamente a NGAL de la manera requerida por la especificidad de la forma molecular del ensayo para determinar la concentración de una forma molecular particular de NGAL en una muestra mediante procedimientos turbidimétricos o nefelométricos potenciados con partículas, tanto efectuados manualmente como en aparatos automatizados.

Un medio preferido para medir la NGAL de una muestra de orina o sangre incluye una tira reactiva, un ensayo de flujo lateral (inmunocromatográfico) o ensayo de minicolumna, que permite el análisis rápido cerca del sujeto de una muestra. Sin embargo, como se entenderá por los especialistas en la materia tras la lectura de esta divulgación, pueden usarse otros medios de medida de formas moleculares individuales de NGAL, incluyendo procedimientos automatizados en laboratorios centralizados en que el aparato permite el acceso aleatorio de muestras para análisis urgentes.

El procedimiento de la invención no comprende una etapa quirúrgica, terapéutica o diagnóstico practicada en el cuerpo humano.

La presente divulgación cubre un procedimiento de selección de una molécula de unión, incluyendo un anticuerpo monoclonal, que es capaz de unirse específicamente a monómero de NGAL, seleccionándose dicha molécula de una serie de candidatas a moléculas de unión según su capacidad de unirse a una preparación de monómero de NGAL y su incapacidad de unirse a homodímero de NGAL.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Determinación de las formas moleculares de NGAL presentes en muestras normales y de pacientes

Se sometió un volumen de muestra (de plasma, suero, orina o NGAL humana recombinante), que contiene una cantidad conocida de inmunorreactividad a NGAL humana determinada mediante una ELISA que detecta tanto las formas monomérica como oligomerizadas de NGAL, a una cromatografía de exclusión por tamaño molecular (filtración en gel). Se diluyó la muestra en tampón de columna (solución salina tamponada con fosfato: PBS, pH 7,4) y se aplicó a una columna (1,6 cm x 60 cm) Superdex 200 prep-grade (GE Healthcare) equilibrada en el mismo tampón. Se cargó la columna, se procesó mediante un aparato cromatográfico GE Healthcare Akta y se recogieron las fracciones. Se monitorizó la absorción UV del eluido a 280 nm. Entre procesos, se lavó la columna y se desinfectó según las instrucciones del fabricante. Se determinó la inmunorreactividad a NGAL en las fracciones mediante la misma ELISA. Se representaron los picos de inmunorreactividad a NGAL y se determinó la recuperación de la inmunorreactividad.

Se ilustra en la Figura 1 la cromatografía de exclusión por tamaño molecular de plasma de un paciente con ARF

debido a necrosis tubular. Se observaron picos de absorción UV correspondientes a macroglobulinas, inmunoglobulinas y albúmina plasmáticas y se usaron como marcadores de tamaño molecular aproximados. El primer pico de inmunorreactividad a NGAL en aparecer fue un pico muy pequeño que aparece por el lado delantero del pico de inmunoglobulina. Este contenía formas complejadas superiores de NGAL incluyendo complejo de NGAL-MMP-9 y oligómeros de NGAL superiores. Se confirmó su contenido de complejo de NGAL/MMP-9 mediante ELISA de NGAL/MMP-9 (R&D Systems). Este pico contenía un 1,0 % de la inmunorreactividad a NGAL total que podía asignarse a los picos cromatográficos. Apareció una cantidad traza de homotrímero de NGAL antes y en el lado delantero del pico de albúmina y equivalía a un 0,8 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total. Apareció un pico mayor de inmunorreactividad a NGAL después del pico de albúmina. Este correspondía al homodímero de NGAL y contenía un 22,3 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total. Este fue seguido por un pico mucho mayor de inmunorreactividad a NGAL correspondiente al monómero de NGAL libre y que contenía un 75,9 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total. La separación de estos dos últimos picos confirmó que las formas monomérica y dimérica de NGAL no estaban en equilibrio rápido entre sí.

Se ilustra en la Figura 2 la cromatografía de exclusión por tamaño molecular de orina de otro paciente con ARF debido a necrosis tubular. Esta mostraba un pico muy pequeño de homodímero de NGAL que contenía un 3,0 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total, seguido de un pico muy grande de monómero de NGAL libre que contenía un 97,0 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total. No se observó ningún pico correspondiente a formas complejadas superiores de NGAL.

La cromatografía de exclusión por tamaño molecular de suero humano normal (Figura 3) produjo picos de formas complejadas superiores de NGAL (24,1 % de la inmunorreactividad a NGAL asignable total), homotrímero de NGAL (24,5 % de inmunorreactividad a NGAL asignable), homodímero de NGAL (33,1 % de inmunorreactividad a NGAL asignable) y monómero de NGAL libre (18,3 % de inmunorreactividad a NGAL asignable).

**Ejemplo 2: Preparación de monómeros libres y homodímeros de NGAL humanos**

Se aísla NGAL nativa o humana recombinante respectivamente de neutrófilos o sobrenadante de cultivo de células procarióticas o eucarióticas, transformadas o transfectadas con un vector que codifica la secuencia aminoacídica de NGAL humana, mediante técnicas de separación de proteínas bien conocidas por los especialistas en la materia. Tanto para NGAL nativa como recombinante humana, las preparaciones respectivas contienen tanto monómero de NGAL libre como homodímero de NGAL. Las formas monomérica y homodimérica se separan mediante cromatografía de intercambio iónico, y los picos que contienen respectivamente monómero y homodímero se identifican analizando muestras reducidas y no reducidas de los picos en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS). Se reúnen las fracciones que contienen monómero de NGAL y se usan dentro de 1-4 días, de modo que sea mínima cualquier nueva formación de dímero. Como alternativa, se trata la combinación con yodoacetamida o *N*-etilmaleimida para bloquear cualquier grupo sulfhidrilo libre y minimizar la posibilidad de formación de puentes disulfuro. Se dializa la solución frente a tres cambios de PBS ajustado a pH 6,5 con ácido clorhídrico y se almacena a 4 ºC. Se reúnen también las fracciones que contienen homodímeros de NGAL. El homodímero es más estable que el monómero, pero puede estabilizarse, si es necesario, tratándolo con un exceso molar de 20 veces de ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (OTSSP; Pierce) como se describe por Yan *et al.* (2001), antes de dializar y almacenar como anteriormente.

**Ejemplo 3: Selección de anticuerpos monoclonales específicos de monómero de NGAL libre**

Se criban mediante ELISA en sobrenadantes de hibridoma derivados de ratones Balb-C inmunizados con NGAL humana recombinante, principalmente en forma monomérica, anticuerpos capaces de unirse a NGAL humana recombinante recubierta. Se vuelven a cribar los anticuerpos de los pocillos positivos frente a i) monómero de NGAL humana ligeramente biotinilada unido a una capa de estreptavidina y ii) dímero de NGAL humana ligeramente biotinilada unido a la misma capa. Se seleccionan solo aquellos sobrenadantes que muestran unión de anticuerpo al monómero y no al dímero. Se supone que estos anticuerpos se unen a NGAL humana en un epítopo que está bloqueado por la formación de dímero.

Como alternativa, puede llevarse a cabo la inmunización con un portador ligado a un péptido sintético con una secuencia idéntica o estrechamente relacionada con la de una porción de la cadena proteica de NGAL humana, incluyendo dicha secuencia el residuo de cisteinilo en posición 87 de la proteína madura, que se cree que participa en la formación de homodímero de NGAL, seguido de un procedimiento de cribado similar al descrito anteriormente.

**Ejemplo 4: ELISA de sándwich específico de monómero de NGAL libre**

Se recubren los pocillos de ELISA con un anticuerpo monoclonal de NGAL que es capaz de unirse tanto a monómeros como a dímeros. Después de la aplicación de muestra y lavado, se detecta el monómero de NGAL unido mediante un anticuerpo monoclonal seleccionado según el ejemplo 3 por ser específico del monómero de NGAL y estar apropiadamente marcado para permitir una detección sensible.

Como alternativa, se recubren los pocillos de ELISA con un anticuerpo monoclonal seleccionado según el ejemplo 3 por ser específico de monómero de NGAL, y se detecta el monómero de NGAL unido mediante otro anticuerpo monoclonal marcado de NGAL que es capaz de unirse a monómero de NGAL unido al anticuerpo específico de

monómero.

Los procedimientos indicados pueden realizarse en un kit o dispositivo para medir el monómero de NGAL libre, comprendiendo dicho kit o dispositivo un soporte sólido y anticuerpos monoclonales u otras moléculas de unión seleccionadas según los principios anteriores.

**Ejemplo 5: ELISA DE sándwich específico de homodímero de NGAL y oligómeros superiores**

Se recubren los pocillos de ELISA con un anticuerpo monoclonal de NGAL que es capaz de unirse tanto a monómeros como a dímeros. Después de la aplicación de muestra y lavado, se detecta el monómero de NGAL unido mediante el mismo anticuerpo monoclonal, que se ha marcado apropiadamente para permitir una detección sensible. El hecho de usar el mismo anticuerpo para captura y detección significa que las formas de NGAL darán señal solo si contienen dos o más copias del epítopo idéntico en posiciones suficientemente alejadas entre así para permitir la unión simultánea del mismo anticuerpo. Esto hace al ensayo específico de homodímeros y oligómeros superiores de NGAL.

No es esencial que los dos anticuerpos monoclonales usados sean idénticos. También es posible encontrar pares de anticuerpos diferentes cuyos epítopos, aunque no idénticos, estén dispuestos en la molécula de NGAL de modo que cualquier unión del segundo anticuerpo al monómero de NGAL esté bloqueada por la unión del primer anticuerpo al monómero de NGAL.

Los procedimientos indicados pueden realizarse en un kit o dispositivo para medir homodímero de NGAL y oligómeros superiores, comprendiendo dicho kit o dispositivo un soporte sólido y anticuerpos monoclonales u otras moléculas de unión seleccionadas según los principios anteriores.

**Ejemplo 6: ELISA de sándwich que permite la medida paralela tanto de monómero de NGAL como homodímero de NGAL más oligómeros superiores**

Se recubren los pocillos de ELISA con un anticuerpo monoclonal de NGAL que es capaz de unirse tanto a monómeros como a dímeros. Después de la aplicación de muestra y lavado, se detecta el monómero de NGAL unido mediante un anticuerpo monoclonal seleccionado según el ejemplo 3 por ser específico de monómero de NGAL y estar apropiadamente marcado para permitir una detección sensible. En pocillos paralelos en los que se ha aplicado la misma muestra, se detectan homodímero de NGAL unido y oligómeros superiores como en el ejemplo 5 con una forma marcada del mismo anticuerpo que el usado para el recubrimiento de pocillos u otro anticuerpo cuya unión al monómero de NGAL esté bloqueada por la unión previa al anticuerpo de recubrimiento.

Los procedimientos indicados pueden realizarse en un kit o dispositivo para la medida paralela tanto de monómero de NGAL libre como homodímero de NGAL más oligómeros superiores, comprendiendo dicho kit o dispositivo un soporte sólido y anticuerpos monoclonales u otras moléculas de unión seleccionadas según los principios anteriores.

**Ejemplo 7: ELISA de sándwich para medir la suma de monómero de NGAL libre y homodímero de NGAL**

No se han dado a conocer las reactividades de ELISA de NGAL existentes con las formas monomérica, homodimérica y homooligomérica superior de NGAL. Los anticuerpos policlonales de NGAL reaccionan con todas las formas moleculares de NGAL, y la mayoría de anticuerpos monoclonales de NGAL reaccionan también tanto con la forma monomérica como dimérica. Las combinaciones de anticuerpos adecuados para las ELISA específicas descritas en los ejemplos 4 y 5 requieren una selección especial. Por lo tanto, ha de esperarse que la mayoría de ELISA de NGAL existentes reaccione en cierta medida con cada una de dichas formas moleculares. Al usar las preparaciones de monómeros de NGAL libres y homodímeros de NGAL descritas en el ejemplo 2, es posible caracterizar pares de anticuerpos monoclonales de NGAL en términos de su cuantificación de estas dos formas moleculares de NGAL como se describe en a) y b) a continuación.

a) Se recubren los pocillos de ELISA con un primer anticuerpo monoclonal de NGAL que es capaz de unirse tanto a monómeros como a homodímeros de NGAL. Después de la aplicación de muestra y lavado, se detecta la NGAL unida mediante un segundo anticuerpo monoclonal que es también capaz de unirse a monómeros y homodímeros de NGAL y que se ha marcado apropiadamente para permitir una detección sensible. Se ensayan diferentes pares de primer y segundo anticuerpos con muestras que contienen preparaciones purificadas de monómero de NGAL y homodímero de NGAL, respectivamente, a concentraciones conocidas. Se seleccionan pares de primer y segundo anticuerpos que dan la misma señal para una concentración másica dada de NGAL independientemente de si está en forma monomérica o dimérica. Esto implica que los epítopos de dichos pares de anticuerpo están dispuestos en la cadena proteica de NGAL de modo que permitan la unión del segundo anticuerpo a cada subunidad de NGAL cuando los monómeros o dímeros de NGAL se unen al primer anticuerpo. El ensayo resultante dará el mismo resultado para una concentración másica dada de NGAL independientemente de su contenido relativo de monómero y dímero. Ignorando la pequeña posible contribución de oligómeros superiores de NGAL, cuya reactividad en el ensayo no se ha cuantificado, una ELISA de sándwich de este tipo puede denominarse libremente ELISA de NGAL “total”.

b) También es posible seleccionar pares de primer y segundo anticuerpos que dan la misma señal para una

molécula dimérica de NGAL que para una molécula monomérica. En este caso, la señal obtenida no es proporcional a la concentración másica de NGAL, sino a la concentración molar de monómeros y dímeros de NGAL. Esto implica que los epítopos de dichos pares de anticuerpos están dispuestos en la cadena proteica de NGAL de tal modo que la dimerización de los bloques de NGAL evita la unión del segundo anticuerpo a ambas subunidades del dímero. Una ELISA de sándwich de este tipo muestra una selectividad moderada por monómeros de NGAL en términos de concentración másica, ya que se necesita dos veces la masa de dímero para dar la misma señal que una masa dada de monómero.

**Ejemplo 8: Ensayo de tira reactiva de NGAL para monómero de NGAL libre**

Se recubre el área analítica de una tira reactiva compuesta por una superficie de poliestireno con un anticuerpo monoclonal de captura capaz de unirse a formas tanto monomérica como homodimérica de NGAL humana. Se añade una alícuota de la muestra diluida centrifugada a una solución de anticuerpo de detección marcado enzimáticamente específico de monómero de NGAL libre en el primer tubo, en el que se sumerge la tira reactiva. Se unen los complejos de anticuerpo de detección marcado enzimáticamente con NGAL a la tira reactiva, que se lava entonces con agua del grifo y se pone en una solución de sustrato cromogénico en un segundo tubo. El color desarrollado en la solución de sustrato dentro de un tiempo dado se lee visualmente y se compara con una tabla de intensidades de color, que indica la concentración de NGAL en la muestra de orina, o en un colorímetro sencillo que puede programarse, por ejemplo, para indicar la concentración de NGAL directamente.

**Ejemplo 9: Dispositivo de flujo lateral para medir NGAL monomérica libre**

Se recubre un dispositivo de flujo lateral compuesto por una tira de nitrocelulosa porosa u otro material con canales capaces de promover la migración de líquido por fuerzas capilares cerca de su extremo distal con un anticuerpo de captura capaz de unirse tanto a formas monomérica como dimérica de NGAL, aplicándose dicho anticuerpo como una banda transversal. Se dispone una banda transversal adicional de anticuerpo contra anticuerpos de la especie de la que deriva el anticuerpo de detección distalmente a la banda de anticuerpo de captura, y sirve como control del funcionamiento de la tira. El extremo proximal de la tira contiene el anticuerpo de detección específico del monómero de NGAL adsorbido o ligado con partículas de poliestireno marcadas o partículas del complejo de tinción. Cuando se aplica una alícuota de la muestra centrifugada o filtrada al extremo proximal de la tira, las partículas marcadas enlazadas con el anticuerpo de detección viajan a lo largo de la tira por atracción capilar. Cuando alcanzan la banda de anticuerpo de captura, solo se retendrán aquellas partículas que tengan monómero de NGAL unido en la muestra, dando lugar a una banda detectable. Las partículas que alcancen la banda de control de anticuerpo contra el anticuerpo de detección producirán una banda detectable se hayan unido o no a cualquier NGAL. La intensidad de las bandas marcadas puede leerse visualmente en el caso de partículas coloreadas o mediante el dispositivo de detección apropiado para el marcador usado. Se indica un resultado positivo por el desarrollo de color o la acumulación de marcador en ambas bandas, mientras que se indica un resultado negativo por el desarrollo de color u otro marcador solo en la banda de control. La falta de desarrollo de color u otro marcador en la banda de control indica un funcionamiento de tira inadecuado. La sensibilidad del ensayo puede regularse mediante la dilución de la muestra aplicada, que se ajusta de modo que solo las concentraciones de monómero de NGAL superiores a valores de corte determinados den lugar a un resultado positivo. La sensibilidad del ensayo puede ajustarse también ligando el anticuerpo de detección con una mezcla de partículas marcadas y no marcadas. Los lotes de tiras pueden precalibrarse y dotarse con un código de calibración que pueda leerse por el dispositivo de detección, de modo que pueda leerse del dispositivo un resultado cuantitativo o semicuantitativo. Son posibles muchas variaciones de los aspectos individuales de esta tecnología de flujo lateral, como es conocido por los especialistas en la materia.

**Ejemplo 10: Ensayo de minicolumna para monómero de NGAL libre**

Una minicolumna contiene una frita compuesta por partículas de polietileno comprimidas que permiten el paso de fluido y células. Se recubre la frita con un anticuerpo de captura contra NGAL humana que puede unirse tanto a monómeros como a dímeros de NGAL. Se incorpora la minicolumna a un dispositivo que, mediante un manejo automatizado de líquidos, permite aplicar la muestra diluida a un caudal y volumen fijos, seguido de un anticuerpo de detección complejado con tinte que es específico de monómero de NGAL libre. Después del paso de la solución de lavado, se lee la intensidad de color de la frita mediante fotometría de difusión de luz. Se precalibran los lotes de fritas y se dotan las minicolumnas con un código de calibración que pueda leerse por el dispositivo, de modo que pueda exhibirse un resultado cuantitativo por el instrumento sin necesidad de calibración previa con patrones.

**Ejemplo 11: Comparación del rendimiento de diagnóstico con respecto a lesión renal aguda de medir monómero de NGAL, homodímero de NGAL y NGAL "total" en muestras plasmáticas**

Se seleccionaron muestras de plasma con EDTA de 38 pacientes ingresados en una unidad de cuidados intensivos, 19 de los cuales se diagnosticó clínica y bioquímicamente que tenían lesión renal aguda, no mostrando el resto de pacientes evidencias de dicha lesión. Se volvieron a ensayar en las muestras que habían mostrado anteriormente la mayor concentración de NGAL para cada paciente medida según el ejemplo 7b) el homodímero de NGAL según el ejemplo 5 y la NGAL "total" según el ejemplo 7a), a partir de los cuales pudo calcularse también la concentración de monómero de NGAL. Se muestran en la Figura 4 las curvas características operativas del receptor (ROC) para los valores de monómero, dímero y "total" de NGAL.

Se obtuvo el mejor rendimiento con respecto al diagnóstico de lesión renal aguda con los valores de monómero de NGAL, siendo el área bajo la curva (AUC) 0,853 y siendo la sensibilidad y especificidad de diagnóstico ambas de 84 % usando un valor de corte de 450 ng/ml. El rendimiento de diagnóstico de los valores de NGAL "total" era inferior (AUC 0,812, sensibilidad 74 % y especificidad 89 % a un valor de corte de 580 ng/ml). El rendimiento de diagnóstico de los valores de dímero de NGAL era muy bajo (AUC 0,609) hasta el punto de no contribuir al diagnóstico de lesión renal aguda. Además, los resultados de homodímero de NGAL no mostraron una correlación significativa con los resultados de monómero de NGAL. Estos hallazgos indican que los niveles plasmáticos de NGAL, pero no aquellos de homodímero de NGAL, se relacionan con la presencia o ausencia de lesión renal aguda en estos pacientes.

El valor de corte de 450 ng/ml como concentración plasmática de monómero de NGAL que ha de superarse para conseguir una alta especificidad de diagnóstico para lesión renal aguda en este pequeño grupo de compuestos no es necesariamente representativo de los valores de corte apropiados para otros grupos de pacientes. El presente grupo de pacientes se caracterizaba por la aparición en casi cualquier paciente de afecciones simultáneas graves conocidas por estar asociadas a la liberación no renal de NGAL, tales como infección aguda incluyendo sepsis, inflamación sistémica y adenocarcinomas. Esto eleva el valor de corte apropiado para el diagnóstico de lesión renal aguda a un valor alto, posiblemente el valor más alto que es probable encontrar en cualquier grupo de pacientes. Otros grupos de pacientes pueden consistir en individuos que tienen pocas o ninguna afección simultáneas que influyan en los niveles de NGAL pero que, por ejemplo, puedan ponerse en riesgo de lesión renal aguda por intervenciones quirúrgicas opcionales que implican derivación cardiopulmonar. En dichos grupos, los valores de corte para la concentración de monómero de NGAL en plasma por encima de los cuales la concentración es diagnóstica de lesión renal aguda pueden aproximarse al límite superior del intervalo normal, aproximadamente 60 ng/ml para monómero de NGAL. Con respecto a las concentraciones en orina, los valores de corte de la concentración de monómero de NGAL que pueden ser diagnósticos de lesión renal aguda pueden aproximarse también, por la misma razón, al límite superior normal, aproximadamente 12 ng/ml.

**Referencias**

Allen RA, Erickson RW, Jesaitis AJ (1989) "Identification of a human neutrophil protein of Mr 24 000 that binds N-formyl peptides: co-sedimentation with specific granules". Biochim. Biophys. Acta 991: 123-133.

Anónimo (2007) "Product inlay of the Quantikine Human MMP-9/NGAL Complex immunoassay kit", número de catálogo DM9L20, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.

Bu DX, Hemdahl AL, Gabrielsen A, Fuxe J, Zhu C, Eriksson P, Yan ZQ (2006) "Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappaB". Am. J. Pathol. 169: 2245-2253.

Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N (1993) "Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase". J. Biol. Chem. 268: 10425-10432.

Kjeldsen L, Koch C, Arnljots K, Borregaard N (1996) "Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils". J. Immunol. Methods 198: 155-164.

Liu Q, Nilsen-Hamilton M (1995) "Identification of a new acute phase protein". J. Biol. Chem. 270: 22565-22570.

Monier F, Surla A, Guillot M, Morel F (2000) "Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients". Clin. Chim. Acta 299: 11-23.

Venge P, Carlson M, Fredens K, García R (1990) "The 40 kD-protein. A new protein isolated from the secondary granules of human neutrophils". "Joint International Conference on Leukocyte Biology", resumen. J. Leukocyte Biol. 1 (supl.): 28.

Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H (1992) "A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase". FEBS Lett. 314: 386-388.

Xu SY, Carlson M, Engstrom A, García R, Peterson CG, Venge P (1994) "Purification and characterization of a human neutrophillipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils". Scand. J. Clin. Lab. Invest. 54: 365-376.

Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA (2001) "The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL". J. Biol.Chem. 276: 37258-37265.

Zhao H, Ito A, Sakai N, Matsuzawa Y, Yamashita S, Nojima H (2006) "RECS1 is a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 production and aged RECS1 knockout mice are prone to aortic dilation". Circ. J. 70: 615-624.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de diagnóstico, monitorización o valoración de la gravedad de una lesión, enfermedad o trastorno renal mediante la medida de la concentración de monómero de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL) libre, mediante un procedimiento que es específico o selectivo de la forma monomérica libre, en una muestra de fluido corporal del individuo humano y comparación de dicha concentración con el intervalo de concentraciones de dicha forma molecular individual que ocurre en individuos que se sabe no están afectados por dicho trastorno o lesión renal, con lo que una desviación de la concentración de dicho intervalo determina la presencia de trastorno o lesión renal.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 de diagnóstico, monitorización o valoración de la gravedad de una lesión, enfermedad o trastorno renal que ha conducido a insuficiencia renal aguda, o que significa un riesgo inmediato de desarrollo de insuficiencia renal aguda en un individuo humano, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

i) determinación de la concentración de monómero de NGAL libre en una muestra de fluido corporal del individuo humano y

ii) comparación de dicho valor de concentración con un valor de corte determinado a partir del intervalo de concentraciones de monómero de NGAL libre en otros individuos humanos que no muestran evidencias de lesión, enfermedad o trastorno renal, de modo que un valor mayor que el valor de corte indica la presencia de dicha lesión, enfermedad o trastorno renal.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 de diagnóstico, monitorización o determinación del riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda en un individuo humano, en el que dicho procedimiento discrimina entre un individuo que no tiene insuficiencia renal aguda y no está en riesgo inmediato de desarrollar insuficiencia renal aguda y un individuo que puede tener insuficiencia renal aguda o estar en riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

i) determinación de la concentración de monómero de NGAL libre en una muestra de fluido corporal del individuo humano y

ii) comparación de dicho valor de concentración con un valor de corte predeterminado elegido de tal modo que una concentración de monómero de NGAL libre por debajo del valor de corte clasifique al individuo humano por no tener y no estar en riesgo inmediato de desarrollar insuficiencia renal aguda.

4. El procedimiento de las reivindicaciones 2 y 3, que comprende la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) de dichas reivindicaciones una o más veces o que comprende la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) de la reivindicación 2 o 3 dentro de 24 horas, por ejemplo, dentro de 12 horas, tal como dentro de 6 horas, por ejemplo dentro de 3 horas, tal como dentro de 1 hora, por ejemplo dentro de 30 minutos o dentro de 15 minutos, o que comprende la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) de la reivindicación 2 o 3 después de iniciar o completar un tratamiento de insuficiencia renal aguda.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la lesión renal o el riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda es debida a isquemia, o es debida a una complicación de una enfermedad inflamatoria, infecciosa o neoplásica, o es debida a una dolencia crítica de cualquier causa que requiera cuidados intensivos, o es debida a una intervención quirúrgica, o es debida a la administración de un agente nefrotóxico.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la lesión es debida a causas físicas o químicas externas o es debida a exposición a radiación.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido corporal es plasma sanguíneo o suero sanguíneo u orina.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la NGAL monomérica libre se mide mediante una molécula que se une específicamente a monómero de NGAL libre y no a formas complejadas de NGAL en individuos humanos.

9. Un kit o dispositivo para efectuar el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho kit o dispositivo un soporte sólido y moléculas de unión que se unen específicamente a monómero de NGAL humano y no a formas complejadas de NGAL humana.

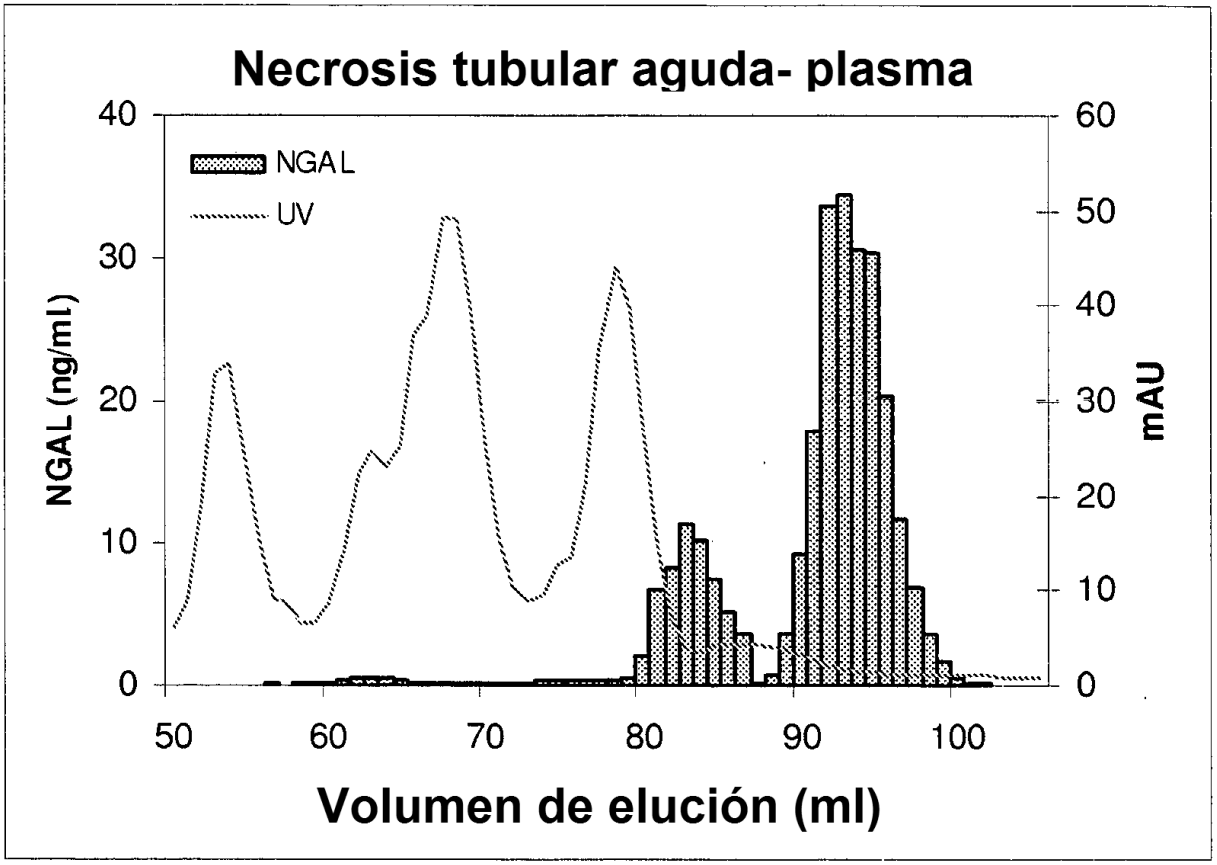
Necrosis tubular aguda- plasma
NGAL
UV
NGAL (ng/ml)
mAU
Volumen de elución (ml)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

**Figura 1**

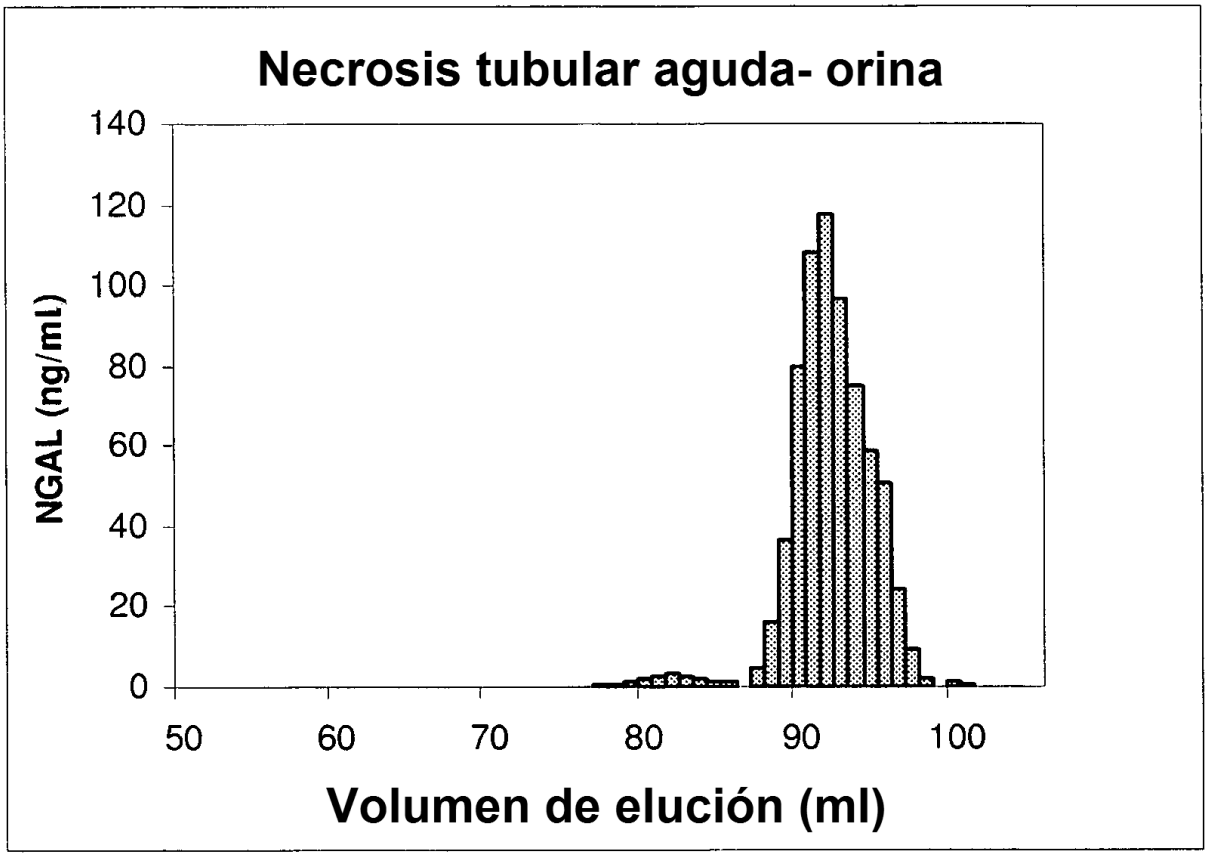
Necrosis tubular aguda- orina
NGAL (ng/ml)
140
120
100
80
60
40
20
0
50
60
70
80
90
100
Volumen de elución (ml)

**Figura 2**

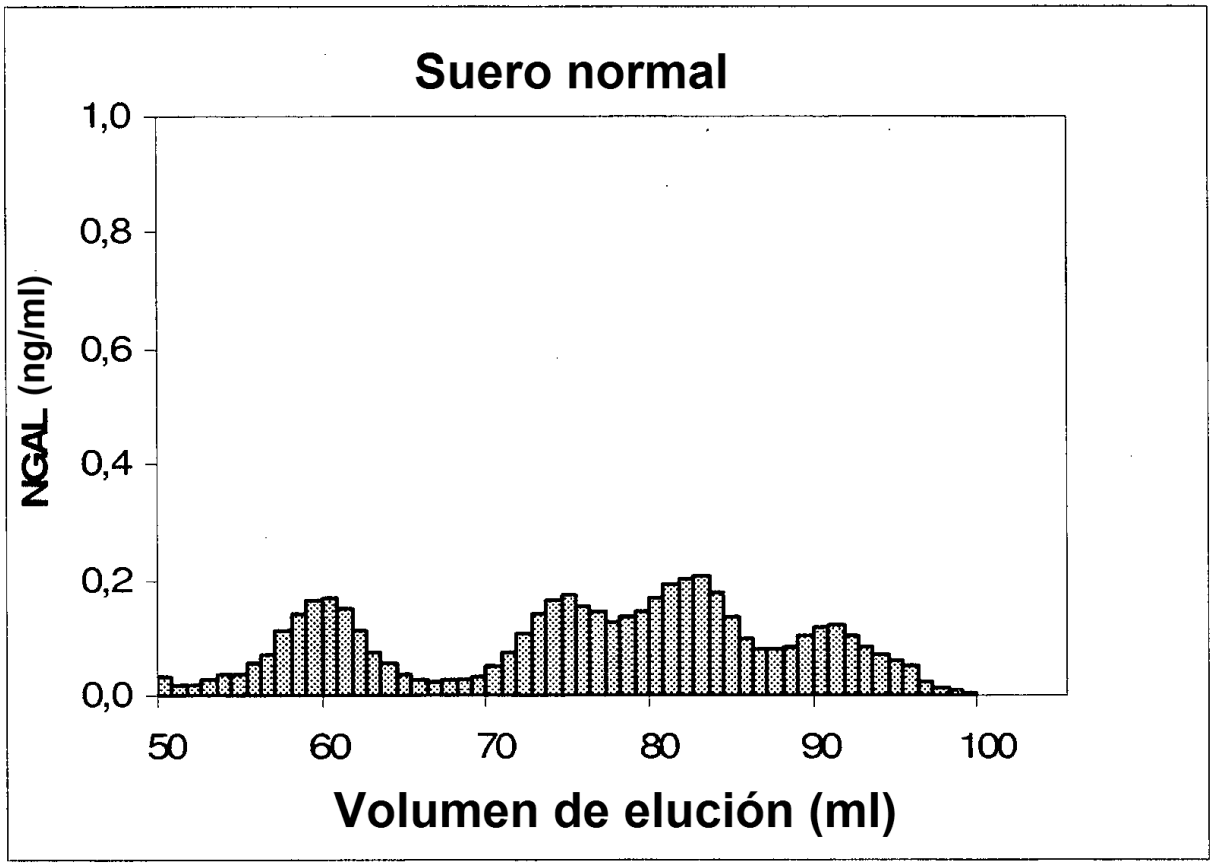
Suero normal
NGAL (ng/ml)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
50
60
70
80
90
100
Volumen de elución (ml)

**Figura 3**

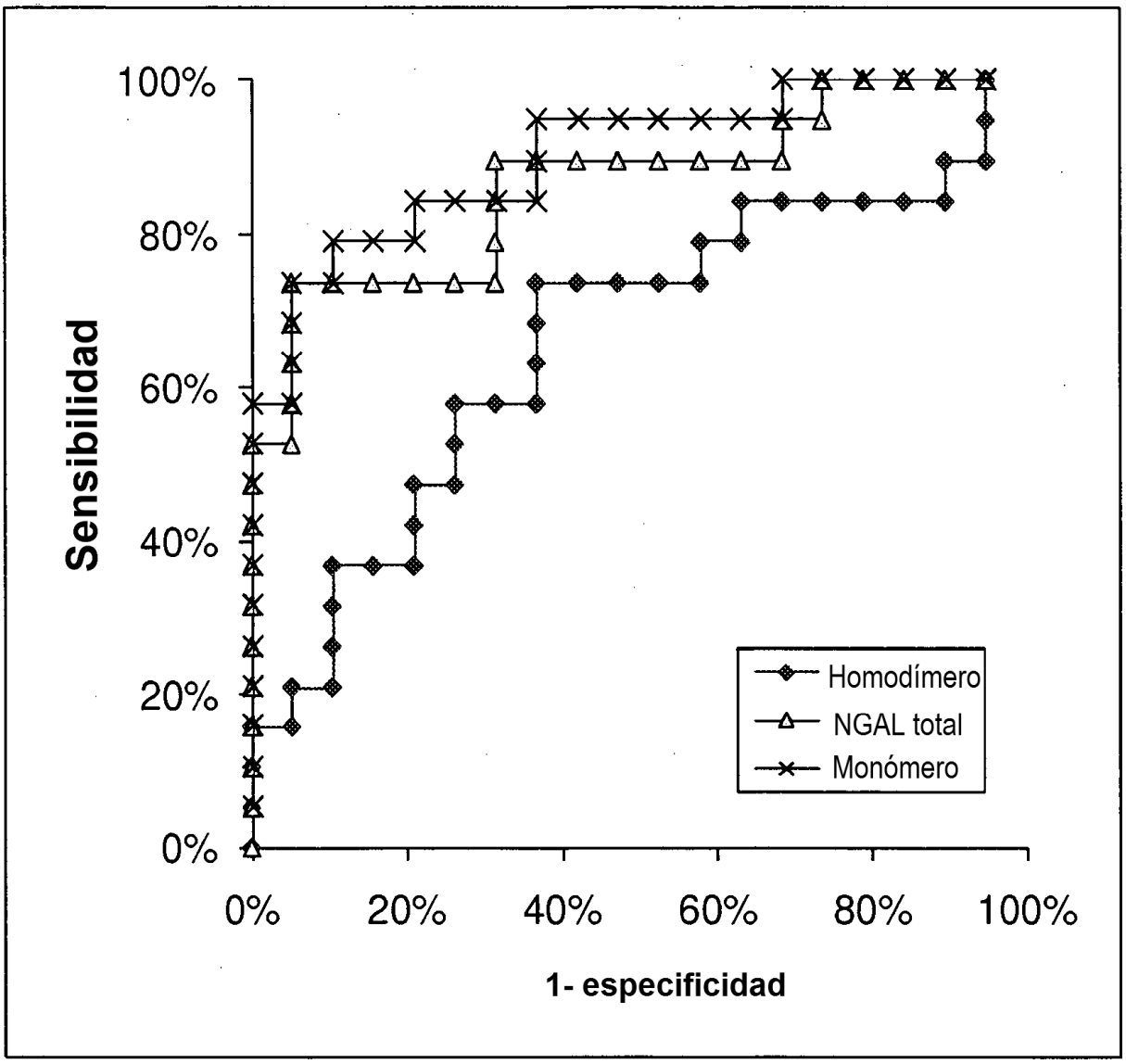
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Sensibilidad
0%
20%
40%
60%
80%
100%
1- especificidad
Homodímero
NGAL total
Monómero

**Figura 4**