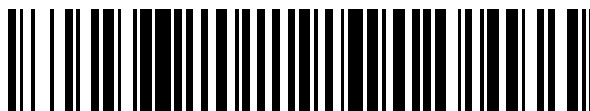


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 241**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2009** **E 09733187 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 2279270**

54 Título: **Marcadores de fallo renal agudo**

30 Prioridad:

15.04.2008 EP 08450055

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

03.10.2014

73 Titular/es:

OBERBAUER, RAINER (100.0%)
Gregor Mendel Strasse 44
1190 Wien, AT

72 Inventor/es:

MAYER, BERND;
PERCO, PAUL y
KAINZ, ALEXANDER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 502 241 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**Marcadores de fallo renal agudo**

5 La presente invención se refiere a un método para la detección, diagnóstico, pronóstico, o seguimiento del riesgo de lesión renal aguda (AKI, por sus siglas en inglés) midiendo un panel de biomarcadores. En particular, la invención se refiere a un ensayo de predisposición.

10 La AKI se describe en el campo clínico como fallo renal agudo (ARF) o necrosis tubular aguda (ATN), y se refiere a la disminución espontánea y significativa de la función renal. La AKI, por lo tanto, refleja todo el espectro del ARF, reconociéndose que una disminución aguda de la función renal es consecuencia a menudo de una lesión que causa cambios funcionales o estructurales en los riñones. El ARF es un problema frecuente y serio, con diversas consecuencias clínicas a corto y largo plazo. La pérdida de función del riñón, un órgano vital, en la forma de fallo renal agudo, representa un riesgo especial, en particular para los pacientes más mayores, a pesar de las terapias modernas, que incluyen el uso de las diversas formas de riñón artificial. En la diagnosis y pronóstico, se debe tener cuidado en diferenciar entre insuficiencia renal funcional y lesión intrínseca con daño morfológico.

15 La AKI, en particular en la unidad de cuidados intensivos, está asociada a menudo con fallo orgánico múltiple y sepsis. Además, la AKI está asociada con alta mortalidad y morbilidad en los seres humanos. Los pacientes, por ejemplo, experimentan AKI en lesión por reperfusión isquémica, junto con tratamiento con compuestos nefrotóxicos, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antibióticos o anticancerosos, aplicación de medios de contraste, p.ej., cuando se realiza una angiografía que da como resultado nefropatía o nefrotoxicidad, o en la unidad de cuidados intensivos, p.ej., en el contexto de sepsis. El número anual de pacientes que reciben medios de contraste es mayor que 100 millones en los países desarrollados, y la tasa de lesión renal aguda oscila en un intervalo porcentual, si está acoplado con factores de riesgo como hipotensión o diabetes.

La AKI se clasifica usualmente según causas pre-renales, intrínsecas y post-renales.

Pre-renales (causas en el suministro sanguíneo):

- 25 • hipovolemia (volumen sanguíneo disminuido), usualmente por apoplejía o deshidratación y pérdida de fluidos o uso excesivo de diuréticos.
- síndrome hepatorenal, en el que la perfusión renal es comprometida en fallo del hígado
- problemas vasculares, tales como enfermedad ateroembólica y trombosis de la vena renal (que puede ocurrir como complicación del síndrome nefrótico)
- infección, usualmente sepsis, inflamación sistémica debido a infección
- 30 • quemaduras graves
- secuestación debida a pericarditis y pancreatitis
- hipotensión debida a antihipertensivos y vasodilatadores

Intrínsecas (daño al riñón en sí):

- 35 • toxinas o medicación (p.ej., algunos NSAIDs, antibióticos de aminoglicósido, contraste yodado, litio, nefropatía por fosfato debida a preparación del intestino para colonoscopia con fosfatos de sodio)
- rabdomiolisis (rotura del tejido muscular) - la liberación resultante de mioglobina en la sangre afecta al riñón; puede ser causada por lesión (especialmente lesión por aplastamiento y contusión extensa), estatinas, estimulantes y algunos otros fármacos
- 40 • hemólisis (rotura de los glóbulos rojos de la sangre) - la hemoglobina daña los túbulos; puede ser causada por diversas afecciones, tales como enfermedad de células falciformes y lupus eritematoso
- mieloma múltiple, bien debido a hipercalcemia o bien "nefropatía por cilindros" (el mieloma múltiple también puede causar fallo renal crónico por un mecanismo diferente)
- 45 • glomerulonefritis aguda, que puede ser debida a diversas causas, tales como enfermedad de la membrana del basamento glomerular/síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener o nefritis por lupus aguda con lupus eritematoso sistémico

Post-renales (causas obstructivas en el tracto urinario) debidas a:

- medicación que interfiere con el vaciado normal de la vejiga (p.ej., anticolinérgicos)
- hipertrofia benigna de próstata o cáncer de próstata

- piedras en el riñón
- debido a malignidad abdominal (p.ej. cáncer ovárico, cáncer colorrectal)
- catéter urinario obstruido
- fármacos que pueden causar cristaluria y fármacos que pueden conducir a mioglobinuria y cistitis

5 Según el estado actual de la técnica, se diagnostica fallo renal cuando los análisis de creatinina o bien de nitrógeno ureico en sangre son notablemente elevados en un paciente enfermo, especialmente cuando está presente oliguria. Las medidas previas de la función renal pueden ofrecer comparación, lo que es especialmente importante si se sabe que un paciente tiene fallo renal crónico también. Si la causa no es aparente, se realiza típicamente una gran cantidad de análisis de sangre y exámenes de muestras de orina para dilucidar la causa del fallo renal agudo, la
10 ultrasonografía médica del tracto renal es esencial para descartar la obstrucción del tracto urinario.

Un criterio de consenso ilustrativo para la diagnosis de AKI es al menos uno de los siguientes:

- Riesgo: creatinina en suero aumentada 1,5 veces o producción de orina menor que 0,5 ml/kg de peso corporal durante 6 horas
- Lesión: creatinina aumentada 2,0 veces o producción de orina menor que 0,5 ml/kg durante 12 h
- 15 • Fallo: creatinina aumentada 3,0 veces o creatinina mayor que 355 $\mu\text{mol/l}$ (con un aumento mayor que 44) o producción de orina por debajo de 0,3 ml/kg durante 24 h
- Pérdida: AKI persistente o pérdida completa de la función renal durante más que cuatro semanas
- Enfermedad renal de fase terminal: pérdida completa de la función renal durante más que tres meses.

20 Un aumento rápido en la creatinina en suero también puede ser un indicador de un alto riesgo de AKI después de un tratamiento médico, p.ej., un daño en la función renal es indicado por un aumento en la creatinina en suero en más que 0,5 mg/dl o más que 25% a los 3 días después de la medicación.

Se puede realizar una biopsia del riñón en el diagnóstico del fallo renal agudo, para proporcionar una diagnosis definitiva y a veces una idea de la prognosis, a menos que la causa sea clara y las investigaciones de cribado apropiadas sean tranquilizadamente negativas.

25 Para diagnosticar la AKI, se hacen usualmente análisis de orina y sangre, y se hace un seguimiento del volumen de la orina producida.

El estándar principal para diagnosticar la AKI es la medida de la creatinina en suero. Por desgracia, la creatinina como marcador tiene varias limitaciones. Por una parte, los niveles de creatinina en suero varían ampliamente entre individuos dependiendo de la edad, el sexo, la masa muscular o el estado de medicación. Por otra parte, la
30 creatinina en suero no representa con exactitud la función renal durante cambios agudos en la filtración glomerular, ya que es un marcador que sólo puede ser interpretado en estado estacionario. Además, los niveles de creatinina no aumentan hasta que el daño es grave y la función renal ya disminuye. Otros biomarcadores tales como lipocalina 2 (LCN2), también conocida como NGAL (lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos), molécula de lesión renal 1 (KIM1), inductor angiogénico rico en cisteína 61 (CYR61), o interleucina 18 (IL18) han sido propuestos
35 recientemente como parámetros alternativos para la detección de lesión renal aguda.

La solicitud de patente internacional WO2008/017306A1 describe una prueba diagnóstica para excluir una lesión renal significativa midiendo la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL).

La solicitud de patente internacional WO2007/013919A2 describe el Gro-alpha humano como marcador de lesión renal aguda.

40 Perco et al (European Journal of Clinical Investigation (2006) 36, 753-763) describen biomarcadores proteicos asociados con fallo renal agudo y enfermedad renal crónica.

La solicitud de patente internacional WO2004/088276A2 describe la detección de lesión de células tubulares renales y el fallo renal utilizando NGAL como biomarcador.

45 Hauser et al (Laboratory Investigation (2004) 84, 353-361) describe un patrón de expresión de genes de biopsias de riñón de donantes. Se determinan las diferencias en la expresión de genes entre riñones de donantes de órgano vivos o de cadáveres. Entre otros genes, el versican estaba regulado en ascenso en las muestras de donantes de cadáveres en comparación con las muestras de donantes vivos.

El documento US2007/0249002A1 describe sistemas y métodos para caracterizar enfermedades del riñón por detección de citocinas, compuestos relacionados con citocinas y quimiocinas en orina, entre ellos la proteína
50 quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1).

- Rice et al (Renal Failure (2002) 24(6), 703-723) describen que la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 se correlaciona con la infiltración de monocitos en el riñón post-isquémico. La MCP-1 es supuestamente aumentada por la lesión por isquemia-reperfusión.
- 5 Grandaliano et al (Transplantation (1997) 63(3), 414-420) describen la expresión de MCP-1 y la infiltración de monocitos en el rechazo agudo de trasplante renal.
- Jee Ko et al (Nephrol Dial Transplant (2008) 23, 842-852) describen la isquemia/reperfusión como causa principal de la lesión renal aguda, y la cuantificación de marcadores inflamatorios, entre ellos MCP-1.
- Maier et al (Shock (2000) 14(2), 187-192) describen la transcripción masiva de quimiocinas, entre ellas MCP-1, en el fallo renal agudo debido a sepsis polimicrobiana.
- 10 Wang et al (J Am Soc Nephrol (2002) 13, 548A) describen la expresión regulada en ascenso de genes de quimiocinas, tales como MCP-1, en el fallo renal agudo endotoxémico.
- Moon et al (J Korean Med Sci (2007) 22, 810-4) asocian polimorfismos en el promotor de MCP-1 con el fallo renal diabético.
- 15 La solicitud de patente internacional WO2005/054502A2 describe un método para diagnosticar el rechazo en un sujeto trasplantado. Se proporciona una lista de biomarcadores indicativos de rechazo al trasplante.
- Akalin et al (Transplantation (2001) 72, 948-953) realizan un análisis de expresión de genes en muestras de biopsias de aloinjerto renal humano, y determinan transcritos de genes que están regulados en ascenso durante el rechazo agudo.
- Langer et al (J Am Soc Nephrol (2004) 15, 2893-2901) describen el CCL19 como marcador de rechazo al aloinjerto.
- 20 Yang et al (Nephrol Dial Transplant (2007) 22, 445-456) describen la evaluación de la lesión tubulointersticial por métodos inmunohistoquímicos, que determinan varios antígenos, tales como colágeno III.
- Yoshida et al (Biochemical and Biophysical Research Communications (2002) 291, 787-794) describen la expresión de genes en isquemia-reperfusión renal. Entre los genes regulados en ascenso en el modelo AKI estaba el procolágeno tipo III alfa 1 (Col3a1).
- 25 Forbes et al (Kidney International (2000) 57, 375-385) describen la histología de los cambios en el fallo renal agudo isquémico. El colágeno intersticial III estaba aumentado durante los primeros días, seguido de una disminución.
- Mishra et al (J Am Soc Nephrol (2003) 14, 2534-2543) describen la lipocalina como biomarcador urinario para la lesión renal isquémica.
- 30 La solicitud de patente internacional WO2007/104537A2 describe métodos para evaluar el rechazo agudo al trasplante.
- También se sabe que algunos de los productos de expresión de genes juegan un papel en la neovascularización e inflamación.
- La solicitud de patente internacional WO2007/096142A2 describe marcadores de tumores vasculares, tales como versican, y un método para identificar enfermedades asociadas con la neovascularización.
- 35 La solicitud de patente internacional WO2005/010213A2 describe marcadores para la detección de cáncer gástrico, tales como proteoglicano de sulfato de condroitina 2 (CSPG2).
- La solicitud de patente internacional WO2005/024603A2 describe un método para detectar, diagnosticar y tratar el carcinoma humano de células renales. Se identifican expresiones de genes diferenciales en células epiteliales renales normales y células de carcinoma renal. Entre otros, se determina que la neuropilina 1 está expresada diferencialmente.
- 40 Latil et al (Int. J. Cancer (Pred. Oncol.) (2000) 89, 167-171) describen la sobreexpresión de neuropilina 1 en tumores metastásicos.
- Kreuter et al (Leukemia (2006) 20, 1950-1954) describen la correlación de la sobreexpresión de neuropilina-1 con la supervivencia en leucemia mieloide aguda.
- 45 La solicitud de patente internacional WO99/55855A2 describe secuencias de oligonucleótidos antisentido de neuropilina para inhibir el crecimiento de células tumorales.
- La solicitud de patente internacional WO2007/056470A2 describe anticuerpos anti-NRP1 capaces de inhibir una actividad biológica mediada por neuropilina.

La solicitud de patente internacional WO2007/041623A2 describe métodos para la diagnosis en síndromes de respuesta inflamatoria sistémica que emplean varios marcadores, entre ellos CCL19.

Krumbholz et al (Journal of Neuroimmunology (2007) 190, 72-79) describen la regulación en ascenso de CCL19 en neuroinflamación.

- 5 Pao et al (The Journal of Immunology (2005) 175, 3235-3245) describen el papel de la granzima M en la inmunidad a la infección.

El documento EP0913692A1 describe un inmunoensayo para el propéptido procolágeno-III-C-terminal, que usa anticuerpos de unión específica.

- 10 Chen et al (J Mol Cell Cardiol (2000) 32, 1805-1819) describen niveles del factor de crecimiento de tejido conectivo y de mRNA de TGF-beta que estaban aumentados después de infarto de miocardio, que se correlacionaban bien con aumentos concomitantes de otros marcadores, entre ellos mRNA de colágeno de tipo III.

Krenacs et al (Blood (2003) 101(9), 3590-3593) describen la expresión de serina proteasa granzima M en el linfoma.

Bade et al (International Immunology (2005) 17(11) 1419-1428) describen la expresión diferencial de granzimas A, K y M en linfocitos humanos de sangre periférica.

- 15 Sayers et al (The Journal of Immunology (2001) 166, 765-771) describen la expresión restringida de granzima M en linfocitos humanos usando anticuerpos específicos.

Los pacientes con función renal normal no se analizan actualmente para ningún biomarcador de enfermedad renal. En ausencia de ningún trastorno renal funcional, tal como reducción del volumen de orina o nivel de creatinina, se supone que no hay riesgo de desarrollar AKI. Sin embargo, hay pacientes que tienen un potencial para desarrollar AKI tras ciertos tratamientos médicos, que podrían ser dañinos para la función renal, tales como radiografía simple usando un medio de contraste o quimioterapia. Se han identificado hasta ahora varios factores de riesgo para el fallo renal agudo.

- 20 Se consideran pacientes de alto riesgo aquellos con enfermedades crónicas que puedan afectar a los riñones, tales como diabetes, hipertensión y enfermedad cardíaca. Las pacientes embarazadas que padecen eclampsia, una afección hipertensiva, también tienen un alto riesgo de daño en el riñón.

Algunos fármacos son nefrotóxicos, es decir, venenosos para el riñón, y que dañan por tanto a los riñones. Esto incluye ciertos antibióticos como aminoglicósidos, fármacos antiinflamatorios y los medios de contraste usados en pruebas de rayos X específicas del tracto urinario. Existe por lo tanto una necesidad de un marcador que pueda ser usado para detectar específicamente y de manera reproducible la presencia de, o la predisposición a, adquirir AKI, que conduce clínicamente a ARF.

- 30 Es el objeto de la presente invención proporcionar marcadores para identificar pacientes con un comienzo temprano de AKI o predisposición a experimentar AKI.

Según la invención se proporciona un método para determinar el riesgo de lesión renal aguda en un paciente, determinando el nivel de al menos dos factores de riesgo para el riñón (KRF, por sus siglas en inglés) en una muestra de dicho paciente, en donde un KRF es CCL2 y al menos un KRF se selecciona del grupo que consiste en VCAN, NRP1, CCL19, COL3A1 y GZMM, y comparando los niveles determinados con un control, y en donde un aumento del nivel de dicho KRF de al menos 1,2 veces comparado con el control indica que el paciente está en riesgo de AKI. El riesgo de AKI también se refiere a la predisposición a AKI y pronosis de desarrollar AKI o ARF, respectivamente. Así, se entiende que un individuo en riesgo de AKI también tiene una predisposición y pronosis de desarrollar AKI y/o ARF. En particular, el riesgo de AKI genuino se determina según la invención. Se entiende que el método de diagnóstico según la invención es empleando comúnmente ensayos *ex vivo*, en particular *in vitro*.

- 35 Preferiblemente el método según la invención comprende determinar el nivel de dicho KRF, que está aumentado al menos 1,2 veces, preferiblemente aumentado al menos 1,5 veces, comparado con un control.

En un método según la invención, que emplea la determinación de al menos dos de dichos KRFs, el nivel preferido de cada KRF está aumentado al menos 1,2 veces comparado con un control, para distinguir pacientes en riesgo de AKI.

- 45 En una realización preferida se determina la expresión de KRF en dicha muestra, tal como el nivel de polipéptido o polinucleótido de dicho KRF.

El método preferido según la invención emplea una muestra, que se selecciona del grupo que consiste en tejido o fluidos fisiológicos, tales como muestras de sangre, suero, plasma u orina. Menos preferida, pero posible, es la determinación de un KRF en una muestra invasiva, tal como una muestra de biopsia. Se obtienen muestras más preferidas de tejidos, extractos, cultivos celulares, lisados celulares y fluidos de lavado.

- 50

La condición que puede ser detectada con los métodos inventivos es en particular un paciente en riesgo de desarrollar AKI, que se puede determinar p.ej. usando una muestra de biopsia de riñón y también detectando los marcadores en suero, sangre, plasma u orina comparando valores de referencia de valores de enfermedad renal no progresiva o de sujetos sanos.

- 5 Preferiblemente el método según la invención se aplica a un paciente que padece una enfermedad crónica, tal como enfermedad metabólica, diabetes, hipertensión o enfermedad cardíaca.

En otra realización preferida el paciente se analiza en cuanto al estado de riesgo según la invención antes de recibir medicación potencialmente nefrotóxica.

Según un método preferido, el KRF se determina por hibridación en micromatriz con sondas específicas o por PCR.

- 10 En otro aspecto, la invención se refiere a un panel de biomarcadores para determinar el fallo renal agudo o el riesgo de AKI, que consiste en al menos dos marcadores, CCL2 con al menos un KRF seleccionado del grupo que consiste en VCAN, NRP1, CCL19, COL3A1 y GZMM. Se contempla, por tanto, que se usen uno o más de dichos biomarcadores para fabricar un producto de diagnóstico para determinar AKI o el riesgo de AKI.

- 15 Así, un juego de reactivos para determinar el riesgo de AKI es preferiblemente de unión específica con al menos dos marcadores del panel según la invención.

El juego preferido según la invención comprende reactivos, que son ligandos que se unen específicamente a dichos marcadores.

Preferiblemente, los ligandos son oligonucleótidos específicos de secuencias de nucleótidos o anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Es más preferido que los reactivos estén marcados.

- 20 Por tanto, la presente invención proporciona un método de detección, diagnóstico, pronóstico, seguimiento o ensayo de predisposición de lesión renal aguda determinando la cantidad de al menos dos marcadores, en donde un KRF es CCL2 y al menos un KRF se selecciona de VCAN, NRP1, CCL19, COL3A1 y GZMM o cualquier combinación de los mismos en una muestra. Para el método inventivo, puede ser detectado uno de estos marcadores, o una combinación de cualesquiera tres, cuatro, cinco o seis de estos marcadores, o cualquier combinación con al menos CCL2 con un factor de riesgo adicional asociado con AKI.
- 25

Los marcadores inventivos son:

1. VCAN - Versican (UniGene: Hs.643801, Hs.715773, GeneID: 1462, GenBank: AA056022/AA056070): El versican es un proteoglicano de sulfato de condroitina extracelular principal detectado en la pared vascular, donde contribuye a la formación de vasos sanguíneos. Es altamente expresado por las células endoteliales aórticas y células vasculares del músculo liso.
- 30

2. NRP1 - Neuropilina 1 (UniGene: Hs.131704, GeneID: 8829, GenBank: AA098867/AA099262): La NRP1 es un co-receptor unido a la membrana para un receptor de tirosina cinasa tanto para miembros de la familia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF; MIM 192240) como de semaforinas (véase SEMA3A; MIM 603961). La NRP1 juega papeles versátiles en la angiogénesis, guía de axones, supervivencia, migración e invasión celulares.

- 35 3. CCL2 - ligando de quimiocinas (motivo C-C) 2 (UniGene: Hs.303649, GeneID: 6347, GenBank: T77817/T77816): Este gen es uno de varios genes de citocinas arracimados en el brazo q del cromosoma 17. Las citocinas son una familia de proteínas secretadas implicadas en procesos inmunorregulatorios e inflamatorios. La proteína codificada por este gen está relacionada estructuralmente con la subfamilia CXC de citocinas. Los miembros de esta subfamilia se caracterizan por dos cisteínas separadas por un solo aminoácido. Esta citocina muestra actividad quimiotáctica para monocitos y basófilos, pero no para neutrófilos o eosinófilos. Ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades caracterizadas por infiltrados monocíticos, como psoriasis, artritis reumatoide y aterosclerosis. Se une a los receptores de quimiocinas CCR2 y CCR4.
- 40

4. CCL19 - ligando de quimiocinas (motivo C-C) 19 (UniGene: Hs.50002, GeneID: 6363, GenBank: AA680186): Este gen es uno de varios genes de citocinas CC arracimados en el brazo p del cromosoma 9. Las citocinas son una familia de proteínas secretadas implicadas en procesos inmunorregulatorios e inflamatorios. Las citocinas CC son proteínas caracterizadas por dos cisteínas adyacentes. La citocina codificada por este gen puede jugar un papel en la recirculación y alojamiento normal de linfocitos. También juega un papel importante en el tráfico de células T en el timo, y en la migración de células T y B a órganos linfoides secundarios. Se une específicamente al receptor de quimiocinas CCR7.

45

- 50 5. COL3A1 - colágeno, tipo III, alfa 1 (UniGene: Hs.443625, GeneID: 1281, GenBank: A1679372): Este gen codifica las cadenas pro-alfa1 del colágeno de tipo III, un colágeno fibrilar que se encuentra en tejidos conectivos extensibles tales como piel, pulmón, útero, intestino y el sistema vascular, frecuentemente en asociación con colágeno de tipo I. Las mutaciones en este gen son asociadas con el síndrome de Ehlers-Danlos tipos IV, y con aneurismas aórticos y arteriales. Se han identificado para este gen dos transcritos, que resultan del uso de señales de poliadenilación

alternada.

6. GZMM - granzima M (met-asa de linfocitos 1) (UniGene: Hs.465511, GeneID: 3004, GenBank: AI24941): Las células asesinas naturales (NK) humanas y linfocitos activados expresan y almacenan un claro subconjunto de serina proteasas neutras junto con proteoglicanos y otras moléculas efectoras inmunitarias en grandes gránulos citoplasmáticos. Estas serina proteasas se denominan colectivamente granzimas, e incluyen 4 productos genéticos distintos: granzima A, granzima B, granzima H y Met-asa, también conocida como granzima M.

Estos marcadores, que incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos respectivos y secuencias de nucleótidos, tales como polipéptidos de secuencia nativa, isoformas, polipéptidos quiméricos, cualquier derivado, parte o polimorfismo (incluyendo, sin limitación, variante de empalme) de tales biomoléculas, todos los homólogos, fragmentos y precursores de los marcadores, y formas modificadas de los polipéptidos y derivados, o ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, se denominan en la presente memoria "Factores de Riesgo para el Riñón" (KRF, por sus siglas en inglés).

Así, la presente invención proporciona un panel de biomarcadores que se pueden usar en un método para la detección, diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la lesión renal aguda (AKI), que incluye el riesgo de experimentar fallo renal agudo (ARF). En particular, el método inventivo permite la determinación de la predisposición a desarrollar AKI o fases de riesgo respectivas, p.ej. distinguir entre pacientes de bajo, medio y alto riesgo.

En una realización específica, la invención contempla juegos de marcadores que contienen o consisten esencialmente en al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis KRF, en donde al menos uno de los KRFs es CCL2 y al menos un KRF se selecciona del panel inventivo, preferiblemente al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis de los KRFs según la invención. Los juegos de marcadores son preferiblemente juegos de polipéptidos o marcadores genéticos que representan el KRF o ligantes respectivos, p.ej. que comprenden una pluralidad de polipéptidos, genes o polinucleótidos respectivos.

Los KRF se determinan preferiblemente por tanto ensayando polipéptidos de KRF y polinucleótidos de KRF. En lo que sigue, la determinación de KRF siempre se refiere a la detección y/o ensayo de uno o más polipéptidos de KRF o polinucleótidos de KRF. La determinación de KRF es propuesta específicamente en el método acorde con la invención para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad renal aguda o un trastorno renal agudo, y en particular en la detección del riesgo de desarrollar AKI dentro de un periodo de corto, medio o largo plazo, dependiendo del tratamiento y cuidado médico. Además de determinar la predisposición o estado de riesgo de un paciente, los marcadores se pueden usar para diagnóstico, seguimiento, es decir, seguir la progresión, o tratamiento terapéutico, pronóstico, tratamiento, o clasificación de la enfermedad renal respectiva, o como marcadores antes o después de terapia.

Preferiblemente, los pacientes se analizan en cuanto a KRF con función renal normal, donde no está diagnosticada ninguna enfermedad renal. La función renal normal se define como una tasa de filtración glomerular por encima de 70 ml/min, preferiblemente por encima de 80 ml/min, más preferiblemente por encima de 90 ml/min, y esencialmente sin proteinuria. Otras funciones endocrinas no son de relevancia en esta propuesta, y por tanto no se discuten aquí.

La identificación del riesgo o predisposición de un paciente es esencial en la población de pacientes que están ya clasificados como pacientes de alto riesgo. Se prefiere por tanto ensayar una población de pacientes acorde con la invención, que ya está clasificada como pacientes en riesgo, por ejemplo, pacientes con factores de riesgo por edad, enfermedad crónica preexistente, malnutrición, cáncer, trauma severo o sepsis. En particular, está indicado para analizar pacientes que padecen enfermedad metabólica, tal como enfermedad de diabetes, hipertensión o enfermedad cardíaca o vascular. Típicamente, los pacientes que padecen AKI no son ensayados en cuanto al riesgo de AKI según la invención.

El método inventivo también puede incluir la etapa de obtener la muestra de un paciente en riesgo de desarrollar lesión renal aguda, p.ej., antes de la administración de un medio de contraste en el curso de angiografía. Por tanto, el término "pacientes" en la presente memoria siempre incluye sujetos sanos. El sujeto puede, p.ej., ser cualquier mamífero, en particular un ser humano, pero también seleccionado de ratón, rata, hámster, gato, perro, caballo, vaca, cerdo, etc.

Los valores de referencia para el KRF se obtienen preferiblemente de un grupo de control de pacientes o sujetos con expresión normal de dicho KRF, o una expresión de KRF que está aquejada de afecciones estresantes para el riñón, tales como pacientes sépticos, con cáncer o diabéticos, sin proteinuremia o AKI, que representa el grupo de pacientes de referencia apropiado. En un aspecto particular, el control comprende material derivado de un grupo de muestras de pacientes normales.

Por tanto, el método según la invención se proporciona específicamente para determinar la susceptibilidad a enfermedad del riñón, tal como AKI, determinando al menos dos KRF en un paciente, que comprende:

- (a) obtener una muestra de un paciente,
- (b) detectar o identificar en la muestra un KRF, y

(c) comparar la cantidad detectada con una cantidad detectada para una referencia.

El término “detectar” o “detección” incluye ensayar, tomar imágenes o establecer de otro modo la presencia o ausencia del KRF diana que codifica los marcadores, subunidades de los mismos, o combinaciones de dianas unidas a reactivos, y similares, o ensayar, tomar imágenes, averiguar, establecer o determinar de otro modo una o más características factuales de enfermedad renal o afecciones similares. El término abarca aplicaciones diagnósticas, pronósticas y de seguimiento para un KRF.

La invención también proporciona un método para evaluar si un paciente está en riesgo de AKI, que comprende comparar:

(a) niveles de al menos dos KRF en una muestra de dicho paciente, y

(b) niveles normales de un KRF en muestras del mismo tipo obtenidas de pacientes de control, en donde niveles alterados del KRF en relación a los correspondientes niveles normales son una indicación de que el paciente tiene un riesgo de AKI, p.ej. una predisposición a enfermedad renal, tal como AKI, en particular donde la detección de un nivel de KRF que difiere significativamente del estándar indica enfermedad renal aguda o comienzo de enfermedad renal o riesgo aumentado de desarrollar ARF. Una diferencia significativa entre los niveles de un KRF en un paciente y los niveles normales es una indicación de que el paciente tiene un riesgo de enfermedad renal o una predisposición a enfermedad renal, tal como AKI.

En una realización preferida, el método según la invención para evaluar si un paciente tiene un riesgo de enfermedad renal o una predisposición a enfermedad renal, niveles más altos de KRF en una muestra en relación a los correspondientes niveles normales son una indicación de que el paciente tiene enfermedad renal o una predisposición a enfermedad renal.

El riesgo de lesión renal aguda es indicado si la cantidad de un marcador o la combinación de marcadores está aumentada al menos 1,2 veces el valor de referencia de sujetos que no padecen AKI, que son preferiblemente sujetos de un grupo de control o sujetos sanos. Usualmente un aumento por debajo de 1,5 veces de un marcador individual refleja un riesgo relativamente bajo; un aumento de al menos 1,5 veces, pero por debajo de 2,0 veces, se considera un riesgo medio; un aumento de al menos 2,0 veces indicaría un alto riesgo. Si están aumentados al menos dos KRFs, se considera que el riesgo está aumentado también. Por tanto, el aumento de al menos 1,2-1,4 veces de cada uno de al menos dos KRFs ya determina las fases de medio a alto riesgo.

En realizaciones especiales la cantidad de VCAN es al menos 1,5, preferiblemente al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 veces el valor de referencia, en particular determinado por PCR con ACTB (actina beta) como control endógeno o determinado por análisis de micromatriz.

En realizaciones especiales la cantidad de NRP1 es al menos 1,5, preferiblemente al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 veces el valor de referencia, en particular determinado por PCR con ACTB como control endógeno o determinado por análisis de micromatriz.

En realizaciones especiales la cantidad de CCL2 es al menos 1,2, preferiblemente al menos 1,5, más preferiblemente al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 veces el valor de referencia, en particular determinado por PCR con ACTB como control endógeno o determinado por análisis de micromatriz.

En realizaciones especiales la cantidad de CCL19 es al menos 1,5, preferiblemente al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 veces el valor de referencia, en particular determinado por PCR con ACTB como control endógeno o determinado por análisis de micromatriz.

En realizaciones especiales la cantidad de COL3A1 es al menos 1,2, preferiblemente al menos 1,5, más preferiblemente al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 veces el valor de referencia, en particular determinado por PCR con ACTB como control endógeno o determinado por análisis de micromatriz.

En realizaciones especiales la cantidad de GZMM es al menos 1,5, preferiblemente al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2, al menos 3, o al menos 4 veces el valor de referencia, en particular determinado por PCR con ACTB como control endógeno o determinado por análisis de micromatriz.

Si se detecta más que un marcador, la comparación se hace para cada valor único de referencia para cada marcador en la propia referencia. El método de prognosis inventivo puede predecir si un paciente está en riesgo de desarrollar lesión renal aguda. Cuanto más alto es el aumento en veces, más alto es el riesgo de AKI del paciente. Un KRF elevado indica, por ejemplo, tratamiento especial del paciente, usando medicación o medios de contraste apropiados. El método de la invención se puede usar por tanto para evaluar un paciente antes, durante y después de tratamiento médico.

Asimismo, el nivel de KRF se puede comparar con una concentración de corte, y el potencial de desarrollo de enfermedad renal se determina a partir de la comparación; en donde concentraciones de KRF por encima de las concentraciones de referencia son predictivas de, p.ej., se correlacionan con, desarrollo de enfermedad renal en el

paciente.

Por tanto, el método preferido según la invención comprende la etapa de comparar el nivel de KRF con un estándar predeterminado o valor de corte, que es preferiblemente al menos 50% más alto que el estándar, más preferido al menos 60% o 70% más alto, pero también puede ser al menos 100% más alto.

- 5 En aspectos de los métodos de la invención, los métodos son no invasivos para ensayos de predisposición a AKI, lo que a su vez permite la diagnosis de diversas afecciones o enfermedades asociadas con enfermedad renal aguda. En particular, la invención proporciona un método no quirúrgico no invasivo para la detección, diagnosis, seguimiento o predicción de enfermedad renal aguda o comienzo de enfermedad renal en un paciente, que comprende: obtener una muestra de sangre, plasma, suero, orina o saliva o una muestra de tejido del paciente;
- 10 someter la muestra a un procedimiento para detectar uno o más KRF, comparando los niveles de KRF con los niveles de KRF obtenidos de un control.

La invención también contempla un método para evaluar el potencial de un compuesto de ensayo para contribuir a enfermedad renal o comienzo de enfermedad renal, que comprende:

- 15 (a) mantener alícuotas independientes de una muestra de un paciente en presencia y ausencia del compuesto de ensayo; y

(b) comparar los niveles de uno o más de KRF en cada una de las alícuotas.

- Esto es particularmente útil en el seguimiento del nivel de KRF en ensayos clínicos. Una diferencia significativa entre los niveles de un KRF en una alícuota mantenida en presencia de o expuesta al compuesto de ensayo en relación a la alícuota mantenida en ausencia del compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo contribuye
- 20 potencialmente a enfermedad renal o comienzo de enfermedad renal.

Asimismo, el método según la invención se puede emplear para determinar el efecto de un factor del entorno sobre la enfermedad renal, que comprende comparar uno o más KRF asociados con enfermedad renal o comienzo de enfermedad renal en presencia y ausencia del factor del entorno.

- 25 Los marcadores inventivos se pueden detectar en cualquier muestra de un sujeto que comprende dichos marcadores, p.ej., donde se determina una expresión de un KRF bien como polinucleótido, p.ej., como mRNA, o bien polipéptido o proteína expresados. La comparación con el valor de referencia debe ser del mismo tipo de muestra.

- En realizaciones preferidas, determinar la cantidad del marcador o cualquier combinación del mismo comprende determinar la expresión del (de los) marcador(es), preferiblemente determinando la concentración de mRNA del (de los) marcador(es). En este punto, se puede aislar el mRNA de la muestra, si fuera necesario, después de etapas adecuadas de preparación de muestra, p.ej. homogeneización de tejidos, e hibridar con sondas específicas de marcadores, en particular en una plataforma de micromatriz con o sin amplificación, o cebadores para métodos de detección basados en PCR, marcado de extensión en PCR con sondas específicas para una porción del mRNA del marcador. En realizaciones preferidas el (los) marcador(es) o una combinación del (de los) mismo(s) se determina(n)
- 30 por hibridación en micromatriz con sondas específicas de VCAN, NRP1, CCL2, CCL19, COL3A1, GZMM, o por PCR.

- La expresión diferencial de los polinucleótidos se determina preferiblemente por micromatriz, hibridación o por amplificación de los polinucleótidos extraídos. La invención contempla un perfil de expresión de genes que comprende uno o más de los KRF que están asociados con la predisposición a AKI. Este perfil proporciona un
- 40 ensayo altamente sensible y específico, con valores predictivos tanto positivos altos como negativos que permiten la diagnosis y predicción del riesgo del paciente de desarrollar enfermedad.

Por ejemplo, la invención proporciona un método para determinar el riesgo de AKI en un paciente, que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra obtenida de dicho paciente con oligonucleótidos que hibridan a un KRF, y
- 45 (b) detectar en la muestra un nivel de polinucleótidos que hibridan al KRF en relación con un valor de corte predeterminado, y determinar a partir de ello el riesgo de AKI en el sujeto.

- Dentro de ciertas realizaciones preferidas, la cantidad de polinucleótidos que son mRNA se detectan por reacción en cadena de la polimerasa usando, por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos que hibridan a un KRF, o complementos de tales polinucleótidos. Dentro de otras realizaciones, la cantidad de mRNA se detecta usando una técnica de hibridación, empleando sondas de oligonucleótidos que hibridan a un KRF, o complementos del mismo.
- 50 Cuando se usa detección de mRNA, el método se puede llevar a cabo combinando mRNA aislado con reactivos para convertir a cDNA según métodos estándar y analizando los productos para detectar la presencia de KRF en la muestra.

En aspectos particulares de la invención, los métodos descritos en la presente memoria utilizan uno o más KRF situados en una micromatriz, de tal modo que el estado de expresión de cada uno de los marcadores es evaluado

simultáneamente. En una realización, la invención proporciona una micromatriz que comprende un juego definido de genes de KRF, cuya expresión es significativamente alterada por un riesgo de AKI. La invención se refiere además al uso de la micromatriz como herramienta de pronóstico para predecir enfermedad renal.

En realizaciones adicionales la cantidad de un marcador o cualquier combinación del mismo se determina por la concentración de polipéptido o proteína del (de los) marcador(es), p.ej. con ligandos específicos a marcadores, tales como anticuerpos o socios de unión específica. El evento de unión puede ser detectado, p.ej., por métodos competitivos o no competitivos, que incluyen el uso de restos específicos de ligandos marcados o marcadores, p.ej., anticuerpos, o restos competitivos marcados, que incluyen un estándar de marcador marcado, que compite con proteínas del marcador por el evento de unión. Si el ligando específico del marcador es capaz de formar un complejo con el marcador, la formación del complejo indica expresión de los marcadores en la muestra.

En particular, la invención se refiere a un método para diagnosticar y hacer un seguimiento de la enfermedad renal aguda en un paciente cuantificando un KRF en una muestra biológica del sujeto, que comprende

(a) hacer reaccionar la muestra biológica con uno o más agentes de unión específicos para el KRF, p.ej. un anticuerpo que está directa o indirectamente marcado con una sustancia detectable, y

(b) detectar la sustancia detectable.

Los niveles de KRF se pueden determinar construyendo una micromatriz de anticuerpos, en la que los sitios de unión comprenden anticuerpos inmovilizados, preferiblemente monoclonales, específicos para un marcador. La invención también se refiere a kits para llevar a cabo los métodos de la invención.

La invención contempla además los métodos, composiciones y kits descritos en la presente memoria usando marcadores adicionales asociados con enfermedad renal. Los métodos descritos en la presente memoria pueden ser modificados incluyendo reactivos para detectar los marcadores adicionales, o polinucleótidos para los marcadores.

Se conocen en la técnica sondas apropiadas, anticuerpos específicos o métodos para determinar los biomarcadores, y se han usado para diferentes fines. Por ejemplo, el mRNA y la concentración proteica del versican pueden ser ensayados con herramientas diagnósticas respectivas según las solicitudes de patente internacionales WO2007/096142A2 y WO2005/010213A2. El mRNA o la concentración proteica de la NRP1 pueden ser ensayados según la solicitud de patente internacional WO2005/024603A2. Se describen oligonucleótidos específicos de NRP1 y anticuerpos específicos de NRP1 en las solicitudes de patente internacionales WO99/55855A2 y WO2007/056470A2, respectivamente. Se describen anticuerpos específicos para CCL2 (MCP-1) en el documento US2007/249002A1. Rice et al (2002, véase anteriormente) describen la determinación de mRNA o proteína de MCP-1 usando las herramientas respectivas. La solicitud de patente internacional WO2005/054503A2 describe medios para determinar mRNA o proteína de CCL19. Se han descrito anticuerpos u oligonucleótidos específicos para COL3A1 en el documento EP0913692A1 y Chen et al (2000, véase anteriormente), respectivamente. La proteína GZMM y su secuencia de nucleótidos puede ser determinada usando anticuerpos específicos y cebadores de PCR según las enseñanzas de Bade et al (2005, véase anteriormente) y Sayers et al (2001, véase anteriormente).

En general, los inmunoensayos implican poner en contacto una muestra que contiene o se sospecha que contiene un biomarcador de interés con al menos un anticuerpo que se une específicamente al biomarcador. Se genera entonces una señal indicativa de la presencia o cantidad de complejos formados por la unión de polipéptidos en la muestra al anticuerpo. Después, la señal se relaciona con la presencia o cantidad del biomarcador en la muestra.

Son bien conocidos por el experto en la materia numerosos métodos y dispositivos para la detección y análisis de biomarcadores. Véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. 6.143.576; 6.113.855; 6.019.944; 5.985.579; 5.947.124; 5.939.272; 5.922.615; 5.885.527; 5.851.776; 5.824.799; 5.679.526; 5.525.524; y 5.480.792, y The Immunoassay Handbook, David Wild, ed. Stockton Press, Nueva York, 1994, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad, incluyendo todas las tablas, figuras y reivindicaciones.

Los dispositivos y métodos de ensayo conocidos en la técnica pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo tipo sandwich, competitivos o no competitivos, para generar una señal que está relacionada con la presencia o cantidad del biomarcador de interés. Los formatos de ensayo adecuados incluyen métodos cromatográficos, espectrográficos de masas, y de "blotting" de proteínas. Adicionalmente, se pueden emplear ciertos métodos y dispositivos, tales como biosensores e inmunoensayos ópticos, para determinar la presencia o cantidad de analitos sin necesidad de una molécula marcada. Véanse, p.ej., las patentes de EE.UU. 5.631.171 y 5.955.377, cada una de las cuales se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad, incluyendo todas las tablas, figuras y reivindicaciones. Un experto en la técnica reconoce también que la instrumentación robótica, que incluye, pero no se limita a, sistemas Beckman ACCESS®, Abbott AXSYM®, Roche ELECSYS®, Dade Behring STRATUS®, está entre los analizadores de inmunoensayo que son capaces de realizar inmunoensayos. Pero se puede utilizar cualquier inmunoensayo adecuado, por ejemplo, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIAs), ensayos de unión competitiva y similares.

Se pueden inmovilizar anticuerpos u otros polipéptidos sobre diversos soportes sólidos para uso en ensayos. Las

fases sólidas que se pueden usar para inmovilizar miembros de unión específicos incluyen las desarrolladas y/o usadas como fases sólidas en ensayos de unión en fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas adecuadas incluyen filtros de membrana, papeles basados en celulosa, perlas (incluyendo partículas poliméricas, de látex y paramagnéticas), vidrio, obleas de silicio, micropartículas, nanopartículas, TentaGels, Agrogels, geles PEGA, geles SPOCC, y placas de pocillos múltiples. Se podría preparar una tira de ensayo revistiendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. Después esta tira podría ser sumergida en la muestra de ensayo y procesada después rápidamente mediante lavados y etapas de detección para generar una señal mensurable, tal como una mancha coloreada. Pueden unirse anticuerpos u otros polipéptidos a zonas específicas de dispositivos de ensayo bien conjugándose directamente con la superficie de un dispositivo de ensayo, o bien por unión indirecta. En un ejemplo de este último caso, pueden ser inmovilizados anticuerpos u otros polipéptidos sobre partículas u otros soportes sólidos, y ese soporte sólido ser inmovilizado a la superficie del dispositivo.

Los ensayos biológicos requieren métodos para la detección, y uno de los métodos más comunes para la cuantificación de los resultados es conjugar una etiqueta detectable a una proteína o ácido nucleico que tiene afinidad por uno de los componentes en el sistema biológico que se estudia. Las etiquetas detectables pueden incluir moléculas que son detectables en sí mismas (p.ej., restos fluorescentes, etiquetas electroquímicas, quelatos metálicos, etc.) así como moléculas que pueden ser detectadas indirectamente por producción de un producto de reacción detectable (p.ej., enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) o por una molécula de unión específica que puede ser detectable por sí misma (p.ej., biotina, digoxigenina, maltosa, oligohistidina, 2,4-dinitrobenzeno, arseniato de fenilo, ssDNA, dsDNA, etc.).

La preparación de fases sólidas y conjugados de etiquetas detectables comprende a menudo el uso de reticuladores químicos. Los reactivos reticuladores contienen al menos dos grupos reactivos, y se dividen generalmente en reticuladores homofuncionales (que contienen grupos reactivos idénticos) y reticuladores heterofuncionales (que contienen grupos reactivos no idénticos). Están disponibles en muchas fuentes comerciales reticuladores homobifuncionales que se acoplan mediante aminas, sulfhidrilos, o reaccionan no específicamente. Las maleimidias, haluros de alquilo y arilo, alfa-haloacilos y disulfuros de piridilo son grupos reactivos de tiol.

Las maleimidias, haluros de alquilo y arilo y alfa-haloacilos reaccionan con los sulfhidrilos para formar enlaces tiol-éter, mientras que los disulfuros de piridilo reaccionan con los sulfhidrilos para producir disulfuros mixtos. El producto de disulfuro de piridilo es escindible. Los imidoésteres son también muy útiles para retículos proteína-proteína. Están disponibles en el mercado diversos reticuladores heterobifuncionales, que combinan cada uno diferentes atributos para una conjugación exitosa.

En realizaciones ilustrativas, el analito se mide usando técnicas de inmunoensayos enzimáticos de tipo sandwich estándar. Un primer anticuerpo que se une al analito es inmovilizado en pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos. Los patrones del analito y las muestras de ensayo se pipetea en los pocillos apropiados, y cualquier analito presente es unido por el anticuerpo inmovilizado. Después de retirar por lavado cualesquiera sustancias no unidas, se añade a los pocillos un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante que se une al analito, formando de este modo complejos de tipo sandwich con el analito (si está presente) y el primer anticuerpo. Después de un lavado para retirar cualquier reactivo de anticuerpo-enzima no unido, se añade a los pocillos una disolución sustrato que comprende tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno. El color se desarrolla en proporción a la cantidad de analito presente en la muestra. El desarrollo del color se detiene, y la intensidad del color se mide a 540 nm o 570 nm. Se asigna una concentración de analito a la muestra de ensayo por comparación con una curva patrón determinada a partir de los patrones de analito.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un juego de al menos dos restos específicos de marcadores diferentes, cada uno específico para un KRF para determinar al menos dos KRFs, en donde al menos uno de los KRFs se selecciona del panel acorde con la invención, p.ej., más que dos, tres, cuatro, cinco o seis restos específicos de marcadores, en donde al menos dos, tal como tres, cuatro, cinco o seis marcadores seleccionados de VCAN, NRP1, CCL2, CCL19, COL3A1 o GZMM pueden ser determinados.

Las combinaciones de marcadores preferidas pueden derivarse de los ejemplos y la Tabla 4 más adelante, que alcanzan valores de área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de al menos 0,8, preferiblemente al menos 0,85, más preferido al menos 0,9, p.ej., ilustrativamente, VCAN, CCL2, y COL3A1, así como VCAN y NRP1. Asimismo, cualquier combinación de al menos un KRF del panel acorde con la invención con otro KRF que cause un valor AUC como los descritos anteriormente, se considera una combinación preferida para determinar el riesgo de AKI.

Los restos específicos de marcadores son sustancias que pueden unirse a o detectar al menos uno de los marcadores para un método de detección descrito anteriormente, y son en particular herramientas detectoras de secuencias de nucleótidos de marcadores o anticuerpos específicos de proteínas de marcadores, incluyendo fragmentos de anticuerpo, tales como Fab, F(ab), F(ab)', Fv, scFv, o anticuerpos de cadena única. Los restos específicos de marcadores se pueden seleccionar también de oligonucleótidos específicos de secuencias de nucleótidos de marcadores, que se unen específicamente a una porción de las secuencias del marcador, p.ej., mRNA o cDNA, o son complementarios a tal porción en la orientación de sentido o antisentido complementario,

como la hebra complementaria de cDNA.

Para una fácil detección, los restos son preferiblemente marcados, tal como mediante etiquetas ópticas, que incluyen etiquetas fluorescentes, y radiactivas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin que se limite a los mismos.

Figuras

Fig. 1: Resultados para VCAN: Matrices: 11 ta-alto (ta = daño agudo en los túbulos) frente a 21 ta-bajo (cambio múltiplo para AA056022/AA056070: 2,40)

Fig. 2: Resultados para NRP1: Matrices: 11 ta-alto frente a 21 ta-bajo (cambio múltiplo para AA098867/AA099262: 2,16)

Fig. 3: Resultados para CCL2: Matrices: 11 ta-alto frente a 21 ta-bajo (cambio múltiplo para T77817/T77816: 2,19)

Fig. 4: Resultados para CCL19: Matrices: 11 ta-alto frente a 21 ta-bajo (cambio múltiplo para AA680186: 3,23)

Fig. 5: Resultados para COL3A1: Matrices: 11 ta-alto frente a 21 ta-bajo (cambio múltiplo para AI679372: 2,20)

Fig. 6: Resultados para GZMM: Matrices: 11 ta-alto frente a 21 ta-bajo (cambio múltiplo para AI124941: 2,18)

Ejemplos

Ejemplo 1: Muestras de pacientes

Se recogieron biopsias renales humanas de donantes de transplantes de riñón. Se incluyeron 82 biopsias de riñón para análisis de micromatriz de cDNA. Las biopsias de riñones de donantes fueron examinadas antes del transplante por un patólogo, y el grado de glomerulosclerosis (gs), arteriolasclerosis (as), fibrosis intersticial (if), inflamación intersticial (ii), atrofia tubular (tc), así como daño agudo en los túbulos (ta) fue evaluado siguiendo un sistema de graduación semicuantitativo: 0 - ningún daño; 1 - daño menor; 2 - daño moderado; 3 - daño severo. En base al parámetro histológico de daño agudo en los túbulos (ta) se definieron dos grupos, a saber, las muestras que no mostraban ningún daño o sólo daño menor en los túbulos (n = 21) y el otro grupo de muestras con daño en los túbulos severo (n = 11). El daño tubular agudo es un parámetro histológico fuertemente correlacionado con la lesión renal aguda, y por tanto se usó para identificar marcadores candidatos separando muestras sin daño o sólo daño leve frente a muestras con daño tubular severo. Se realizó un perfilado de expresión de genes basado en micromatriz en esas muestras de 32 pacientes, mientras que se realizaron experimentos de validación por PCR en tiempo real en 18 muestras.

Ejemplo 2: Aislamiento de RNA e hibridación en micromatriz

La preparación de muestras siguió etapas experimentales establecidas, descritas previamente (Hauser et al. Lab Invest 2004, Kainz et al. Am J Transpl 2004). Todos los órganos fueron perfusionados con una solución conservante fría de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK) a 4 °C durante la obtención de los órganos. Se realizó una biopsia en cuña de cada riñón bajo condiciones estériles al final del tiempo isquémico frío justo antes del transplante. Los especímenes de las biopsias se sumergieron inmediatamente en RNAlater™ (Ambion, Austin, Texas) y se almacenaron a 4 °C durante no más que cinco días.

El RNA total fue aislado y purificado usando cloroformo y reactivo trizol (Invitrogen, Carlsbad, California), y el rendimiento y calidad del RNA fue comprobado con el kit Agilent 2100 Bioanalyzer y RNA6000 LabChip® (Agilent, Palo Alto, California). Se usó RNA de referencia humano universal Stratagene (Stratagene, La Jolla, California).

Se amplificaron dos microgramos de RNA total aislado usando el kit de amplificación RiboAmp RNA (Arcturus, Mountain View, California). El RNA amplificado se inspeccionó sobre un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y sobre el Agilent 2100 Bioanalyzer.

Se obtuvieron micromatrices de cDNA que contenían 41.409 rasgos de la instalación central de la Genómica Funcional de la Universidad de Stanford (lotes No.: shcm, shdb, shem, sheo, sher y shfr). Se usó una configuración experimental de tipo II, donde cada una de las muestras se hibridó junto con una referencia común a una micromatriz. El RNA de referencia humano universal Stratagene, compuesto de RNA total de 10 líneas celulares humanas, sirvió como referencia. Un microgramo de muestra y RNA de referencia humano universal Stratagene estándar fueron marcados con el kit de post-marcado CyScribe cDNA (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) en un procedimiento de dos etapas. Las muestras fueron cargadas en matrices e incubadas durante 16 h en un baño de agua a 65 °C. Después de tres etapas de lavado, las imágenes fluorescentes de las micromatrices hibridadas se examinaron usando un escáner GenePix 4100A (Axon Instruments, Union City, CA). Se usó el programa GenePix Pro 4.1 para organizar las imágenes y para calcular intensidades de punto. Las matrices fueron numeradas según la ID del donante de órgano anónimo y fueron procesadas en orden aleatorio.

Ejemplo 3: Análisis estadístico y selección de biomarcadores putativos

Las señales que muestran valores de intensidad de señal sobre fondo más bajos que 1,5 en cada canal fueron excluidas, y los análisis se enfocaron a genes con datos válidos en al menos 80% de las muestras procesadas, dejando 24.123 clones de cDNA en el conjunto de datos del análisis. Se usó un test t de dos muestras ($p < 0,05$) y el criterio del cambio al doble para identificar genes diferencialmente expresados (DEGs) cuando se comparan muestras sin o sólo con daño tubular leve frente a muestras con daño tubular severo.

La ubicación subcelular de DEGs se determinó usando datos almacenados en la base de datos SwissProt, así como rutinas de predicción bioinformáticas basadas en la secuencia proteica, y se identificaron las proteínas secretadas. Los DEGs secretados que mostraron los valores de cambio múltiplo más altos se seleccionaron para validación por experimentos de PCR en tiempo real.

Ejemplo 4: Validación por PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real usando los ensayos TaqMan Universal PCR Master Mix, TaqMan Gene Expression (cebadores y TaqMan FAM-MBG con sondas NFQ) con el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7300. Se usaron los siguientes ensayos de expresión de genes para los seis marcadores CCL2, CCL19, VCAN, COL3A1, GZMM, NRP1 respectivamente: Hs00234140_m1, Hs00171149_m1, Hs00171642_m1, Hs00164103_m1, Hs00193417_m1, Hs00826128_m1. Todos los instrumentos y reactivos se adquirieron en Applied Biosystems. Los valores de expresión de genes relativos fueron evaluados con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando ACTB (actina beta) como gen constitutivo y RNA de referencia humano universal Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA) como RNA de referencia. Este RNA de referencia también se usó como RNA estándar en los experimentos en micromatriz. Condiciones de qRT-PCR según las recomendaciones del fabricante (ABI): 10 min, 95 °C, 40 ciclos (15 s 95 °C, 1 min 60 °C) con lectura de fluorescencia durante la etapa de recocido.

Ejemplo 5: Análisis en micromatriz

Se pudieron identificar 22 transcritos diferencialmente expresados que mapeaban a 18 genes únicos regulados en ascenso en la muestras con daño tubular agudo severo que tenían isoformas proteicas que fueron secretadas según información almacenada en la base de datos Swiss Prot. Los autores de la invención seleccionaron 10 de los 18 genes para experimentos de verificación por PCR cuantitativa en tiempo real. La selección de estos 10 se basó en cambios múltiples, valores p, así como información sobre la función de genes derivada de la bibliografía científica. Estos genes son versican (VCAN), neuropilina 1 (NRP1), ligando de quimiocina (motivo C-C) 2 (CCL2), ligando de quimiocina (motivo C-C) 19 (CCL19), colágeno tipo III alfa 1 (COL3A1), granzima M (GZMM), apolipoproteína B (APOB), factor del complemento H (CFH), ficolina 1 (FCN1), y proteína 2 similar a fibrinógeno (FGL2).

Tabla 1: Resultados

Nombre del gen	Símbolo del gen	valor p	cambio múltiplo (matriz)
Versican	VCAN	0,0005	2,40
Neuropilina 1	NRP1	0,0109	2,16
ligando de quimiocina (motivo C-C) 2	CCL2	0,0141	2,19
ligando de quimiocina (motivo C-C) 19	CCL19	0,0275	3,23
colágeno, tipo III, alfa 1	COL3A1	0,0175	2,20
granzima M	GZMM	0,0150	2,18
apolipoproteína B	APOB	0,0457	3,59
factor de complemento H	CFH	0,0118	2,15
ficolina 1	FCN1	0,0041	2,43
proteína 2 similar a fibrinógeno	FGL2	0,0313	2,00

Ejemplo 6: Validación por PCR en tiempo real

La regulación en ascenso de seis biomarcadores pudo ser validada en experimentos rtPCR, a saber, VCAN, NRP1, CCL2, CCL19, COL3A1 y GZMM.

Tabla 2: Resultados

Nombre del gen	Símbolo del gen	valor p	cambio múltiplo (matriz)	cambio múltiplo (rtPCR a ACTB)
Versican	VCAN	0,0005	2,40	2,85
Neuropilina 1	NRP1	0,0109	2,16	1,8
ligando de quimiocina (motivo C-C) 2	CCL2	0,0141	2,19	1,26
ligando de quimiocina (motivo C-C) 19	CCL19	0,0275	3,23	2,55
colágeno, tipo III, alfa 1	COL3A1	0,0175	2,20	1,28
granzima M	GZMM	0,0150	2,18	1,86
apolipoproteína B	APOB	0,0457	3,59	-1,36
factor de complemento H	CFH	0,0118	2,15	-1,75
ficolina 1	FCN1	0,0041	2,43	-1,07
proteína 2 similar a fibrinógeno	FGL2	0,0313	2,00	-2,06

Ejemplo 7: Resultados de rtPCR en células tubulares proximales y distales

- Se prepararon suspensiones de células renales de partes no afectadas de nefrectomías tumorales. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los pacientes incluidos en el estudio. Se diseccionó el tejido cortical (aproximadamente 0,5 cm³) retirando la médula interna y la cápsula fibrosa externa, seguido de homogeneización mecánica usando un escalpelo limpio. Después, la muestra triturada fue prensada a través de un tamiz de disociación celular (SIGMA ALDRICH) y se transfirió a un medio M199 (Invitrogen, Carlsbad, California) suplementado con suero de ternero fetal al 10% (Invitrogen, Carlsbad, California), usando el émbolo de una jeringuilla más grande. Después, la suspensión obtenida se hizo pasar a través de un filtro celular de 40 µm (BD-Biosciences) a fin de obtener una suspensión celular suelta casi homogénea de células tubulares renales. Después, la suspensión de células sueltas fue marcada con un anticuerpo CD13 conjugado con PE (BD Biosciences, San José, California) y un anticuerpo Tamm Horse Fall conjugado con FITC (Cedarlanes), específicos para túbulos proximales o distales, respectivamente. Las células se lavaron dos veces con tampón MACS (Miltenyi-Biotec) y se sometieron a clasificación celular activada por fluorescencia en un clasificador celular FACSaria (BD Biosciences). Típicamente, las células tubulares proximales y distales oscilaron entre 1-5% en la suspensión de células inicial. Los rendimientos celulares después de la clasificación celular fueron aproximadamente 500.000 células en purezas de >95%, tanto para células tubulares proximales como distales. El RNA total fue aislado y purificado usando trizol (Invitrogen, Carlsbad, California) y cloroformo (Chornczynski P et al. Anal Biochem 1987 162:156-9).
- Los perfiles de expresión de los seis KRFs (CCL2, CCL19, VCAN, COL3A1, GZMM, NRP1) así como de dos genes altamente expresados en células tubulares proximales y distales, SLC34A1 y UMOD respectivamente, fueron analizados por PCR en tiempo real. Se usó el RNA total para la síntesis de cDNA con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Parte No. 4368814). La PCR en tiempo real se realizó usando TaqMan Gene Expression Master Mix (Parte No. 4369016) y ensayos con TaqMan Gene Expression (CCL2 - Hs00234140_m1, CCL19 - Hs00171149_m1, VCAN - Hs00171642_m1, COL3A1 - Hs00164103_m1, GZMM - Hs00193417_m1, NRP1 - Hs00826128_m1, SLC34A1 - Hs00161828_m1, UMOD - Hs00358451_m1) en un Sistema de Detección de Secuencias ABI 7300. Los valores de expresión de genes relativos fueron evaluados con el método 2- $\Delta\Delta C_t$ usando ACTB (Hs99999903_m1, beta actina) como genes constitutivos y RNA de referencia humano universal Stratagene (Stratagene, La Jolla, California) como referencia. Todos los instrumentos y reactivos de PCR en tiempo real se adquirieron en Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.). Los valores de expresión relativa log2 de la muestra al RNA de referencia humano universal Stratagene se representan en la tabla a continuación. La expresión de todos los KRFs en células tubulares distales fue más alta en comparación con el RNA de referencia humano universal Stratagene. El CCL19, COL3A1 y NRP1 también mostraron niveles de expresión más altos en células tubulares proximales en comparación con RNA de referencia humano universal Stratagene.
- Tabla 3: Se dan los valores de expresión relativa log2 de muestra a RNA de referencia estándar de los seis KDFs junto con dos proteínas altamente abundantes en el tejido de los túbulos.

KDFs	Expresión en células tubulares distales	Expresión en células tubulares proximales
CCL2	2,93	-0,16
CCL19	10,93	3,56
VCAN	1,28	-2,22
COL3A1	1,75	0,43
GZMM	1,23	-3,28
NRP1	1,86	2,02
SLC34A1	10,18	14,42
UMOD	14,61	8,21

Ejemplo 8: valores p para combinaciones específicas

En base a datos de expresión de genes de los seis KRFs bajo estudio, los autores de la invención establecieron reglas de predicción a fin de discriminar entre el resultado binario daño tubular agudo o ningún daño tubular agudo. Los autores de la invención evaluaron la capacidad de la regla de predicción calculando el área bajo la curva ROC (AUC) usando el estadístico D de Sommer. La relación entre el área bajo la ROC y el D de Sommer es $AUC = (1+D \text{ de Sommer})/2$. Valores de AUC de 1,0 indican discriminación completa de los dos grupos en base a los valores de los marcadores, mientras que valores de 0,5 indican asignación aleatoria.

En este estudio, el mejor pronosticador único de progresión, con un valor AUC de 0,886, es VCAN, seguido de COL3A1 (AUC = 0,804) y GZMM (AUC = 0,794). Las combinaciones de marcadores preferidas que alcanzan valores AUC mayores que 0,9 son, ilustrativamente, VCAN, CCL2 y COL3A1, así como VCAN y NRP1. Se da en la tabla a continuación un listado completo de valores AUC de los marcadores respectivos y combinaciones de marcadores en base a datos de expresión de genes.

Tabla 4: Resultados

Número	Modelo	AUC
1	VCAN	0,886
2	CCL2	0,777
3	COL3A1	0,804
4	GZMM	0,794
5	CCL19	0,759
6	NRP1	0,777
7	VCAN CCL2	0,892
8	VCAN COL3A1	0,922
9	VCAN GZMM	0,843
10	VCAN CCL19	0,902
11	VCAN NRP1	1,000
12	CCL2 COL3A1	0,916
13	CCL2 GZMM	0,833
14	CCL2 CCL19	0,879
15	CCL2 NRP1	0,866
16	COL3A1 GZMM	0,931

Número	Modelo	AUC
17	COL3A1 CCL19	0,819
18	COL3A1 NRP1	0,822
19	GZMM CCL19	0,847
20	GZMM NRP1	0,800
21	CCL19 NRP1	0,796
22	VCAN CCL2 COL3A1	0,940
23	VCAN CCL2 GZMM	0,872
24	VCAN CCL2 CCL19	0,909
25	VCAN CCL2 NRP1	1,000
26	VCAN COL3A1 GZMM	0,941
27	VCAN COL3A1 CCL19	0,924
28	VCAN COL3A1 NRP1	1,000
29	VCAN GZMM CCL19	0,894
30	VCAN GZMM NRP1	1,000
31	VCAN CCL19 NRP1	1,000
32	CCL2 COL3A1 GZMM	0,901
33	CCL2 COL3A1 CCL19	0,924
34	CCL2 COL3A1 NRP1	0,900
35	CCL2 GZMM CCL19	0,835
36	CCL2 GZMM NRP1	0,800
37	CCL2 CCL19 NRP1	0,906
38	COL3A1 GZMM CCL19	0,941
39	COL3A1 GZMM NRP1	0,816
40	COL3A1 CCL19 NRP1	0,843
41	GZMM CCL19 NRP1	0,933
42	VCAN CCL2 COL3A1 GZMM	0,921
43	VCAN CCL2 COL3A1 CCL19	0,939
44	VCAN CCL2 COL3A1 NRP1	1,000
45	VCAN CCL2 GZMM CCL19	0,905
46	VCAN CCL2 GZMM NRP1	1,000
47	VCAN CCL2 CCL19 NRP1	1,000
48	VCAN COL3A1 GZMM CCL19	0,952
49	VCAN COL3A1 GZMM NRP1	1,000
50	VCAN COL3A1 CCL19 NRP1	1,000
51	VCAN GZMM CCL19 NRP1	1,000

Número	Modelo	AUC
52	CCL2 COL3A1 GZMM CCL19	0,941
53	CCL2 COL3A1 GZMM NRP1	0,850
54	CCL2 COL3A1 CCL19 NRP1	0,937
55	CCL2 GZMM CCL19 NRP1	0,933
56	COL3A1 GZMM CCL19 NRP1	1,000
57	VCAN CCL2 COL3A1 GZMM CCL19	0,952
58	VCAN CCL2 COL3A1 GZMM NRP1	1,000
59	VCAN CCL2 COL3A1 CCL19 NRP1	1,000
60	VCAN CCL2 GZMM CCL19 NRP1	1,000
61	VCAN COL3A1 GZMM CCL19 NRP1	1,000
62	CCL2 COL3A1 GZMM CCL19 NRP1	1,000
63	VCAN CCL2 COL3A1 GZMM CCL19	1,000

Ejemplo 9: Correlación clínica

5 Sustancias nefrotóxicas como antibióticos, fármacos antiinflamatorios o medios de contraste usados en pruebas de rayos X específicas pueden conducir a lesión renal aguda. Una de estas sustancias es el medio de contraste yodado en angiografía coronaria. Se inició una recogida de muestras de suero de pacientes que sufrieron angiografía coronaria. Se recogió una muestra antes de la angiografía coronaria, y se recogió una segunda muestra 24 horas después de la angiografía coronaria. Se determinaron los valores de creatinina, así como la tasa de filtración glomerular estimada según la fórmula desarrollada en la Clínica Mayo en Rochester (Ann Intern Med. 2004; 141; 929-937). Según la Sociedad Europea de Radiología Urogenital, la AKI inducida por contraste se define como un

10 daño en la función renal indicado por un aumento de la creatinina en suero en $>0,5$ mg/dl o $>25\%$ a los 3 días después de la administración del medio de contraste. La determinación de KRF(s) en muestras de suero tomadas antes de la administración del medio de contraste permite determinar la correlación con el cambio en los niveles de creatinina en suero, evaluando así el potencial para predecir AKI.

15 La concentración de proteína(s) de KRF(s) en muestras de suero se mide por tecnología ELISA usando medios bien conocidos en la técnica. En breve, para una configuración ELISA de tipo sandwich, un anticuerpo monoclonal dirigido contra un KRF específico es adsorbido en pocillos de una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, seguido de incubación con muestras de ensayo de suero humano y patrones a diversas diluciones. Después de una etapa de lavado para excluir las sustancias no unidas, se añade un segundo anticuerpo de detección biotinilado a cada pocillo, seguido de la adición de estreptavidina marcada con HRP (peroxidasa de rábano picante, por sus siglas en

20 inglés). Finalmente, se introduce ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenciazolina-6-sulfónico)) y se registra la absorción. La intensidad de absorción es proporcional a la cantidad de KRF en la muestra. Los datos se evalúan por comparación con un patrón, dando así como resultado valores de concentración cuantitativos para el KRF específico en las muestras de suero humano bajo investigación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar el riesgo de enfermedad por lesión renal aguda en un paciente determinando los niveles de al menos dos factores de riesgo para el riñón (KRF) en una muestra de dicho paciente, en donde un KRF es CCL2 y al menos un KRF se selecciona de VCAN, NRP1, CCL19, COL3A1 o GZMM, y comparando los niveles determinados con un control, en donde un aumento del nivel de dicho KRF de al menos 1,2 veces comparado con el control indica que el paciente está en riesgo de AKI.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la combinación de dichos KRFs alcanza un área bajo la curva (AUC) de al menos 0,9 usando el estadístico D de Sommer.
- 10 3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde se determina la expresión de al menos dos KRFs en dicha muestra.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se determina un nivel de polipéptido o polinucleótido de dichos al menos dos KRFs.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en muestra de tejido, sangre, suero, plasma u orina.
- 15 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho paciente padece una enfermedad crónica, opcionalmente diabetes, hipertensión y enfermedad cardíaca.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho paciente se analiza antes de recibir medicación nefrotóxica.
- 20 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos al menos dos KRFs se determinan por hibridación en micromatriz con sondas específicas o por PCR.
9. Uso de un panel de marcadores que consiste en al menos dos marcadores seleccionados del grupo que consiste en VCAN, NRP1, CCL2, CCL19, COL3A1 y GZMM en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la combinación de CCL2 con al menos un KRF seleccionado de VCAN, NRP1, CCL19, COL3A1 o GZMM alcanza un valor AUC de al menos 0,9.
- 25 10. Uso de un panel de marcadores según la reivindicación 9 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el panel contiene al menos seis marcadores seleccionados de VCAN, NRP1, CCL2, CCL19, COL3A1 y GZMM.
- 30 11. Uso de un juego de reactivos en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un juego de al menos dos restos específicos de marcadores diferentes, cada uno específico para un KRF para determinar los al menos dos KRFs, en donde un KRF es CCL2 y al menos un KRF se selecciona de VCAN, NRP1, CCL19, COL3A1 o GZMM.
12. Uso de un juego según la reivindicación 11 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichos reactivos son ligandos que se unen específicamente a dichos marcadores.
- 35 13. Uso de un juego según la reivindicación 12 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichos ligandos son oligonucleótidos específicos a secuencias de nucleótidos.
14. Uso de un juego según la reivindicación 12 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichos ligandos son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
15. Uso de un juego de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichos reactivos están marcados.

Figura 1:

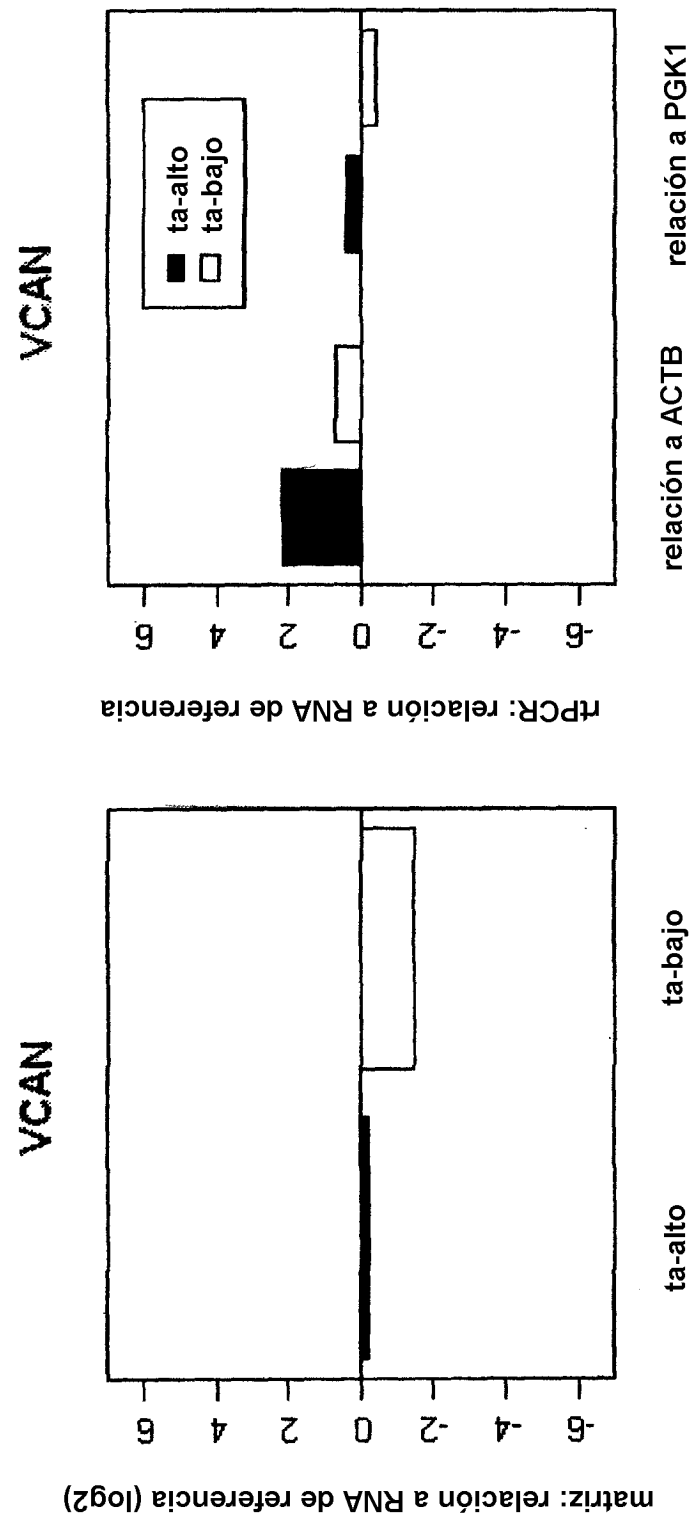


Figura 2:

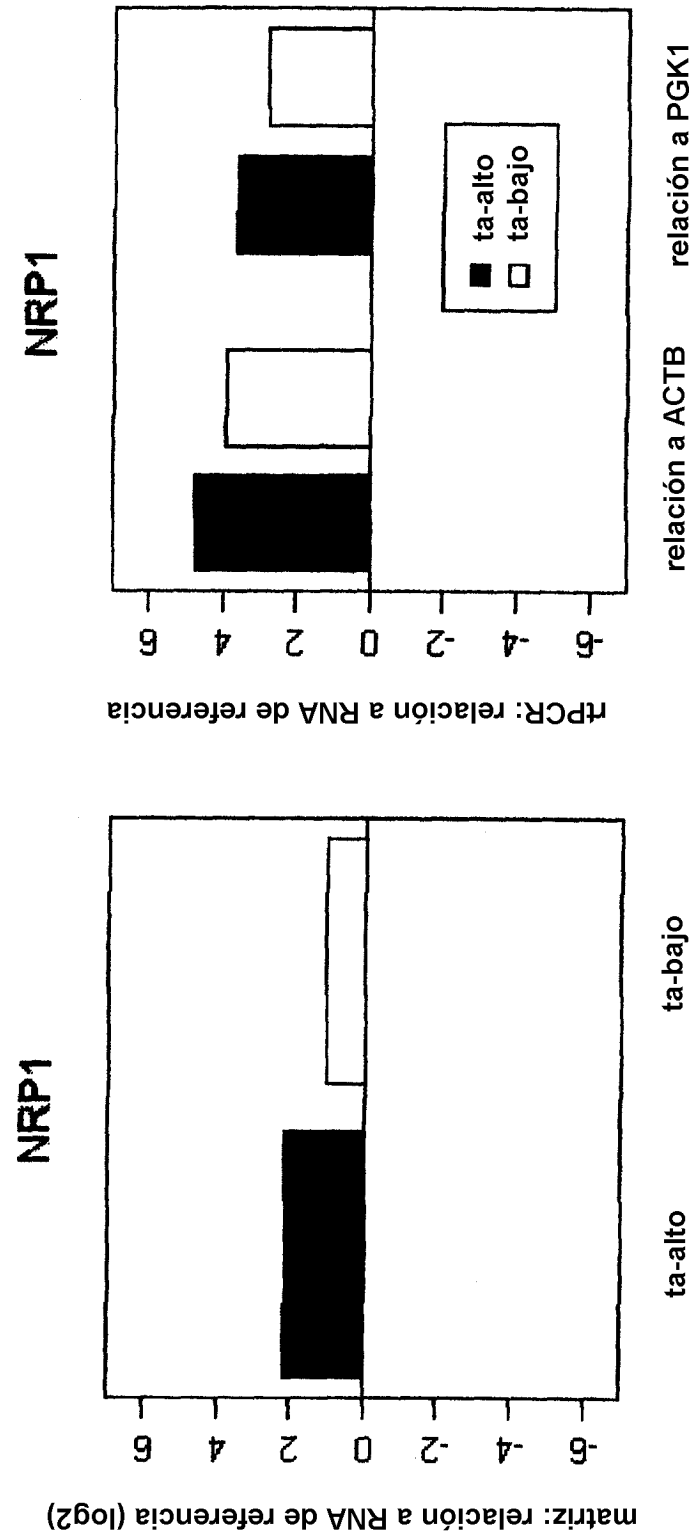


Figura 3:

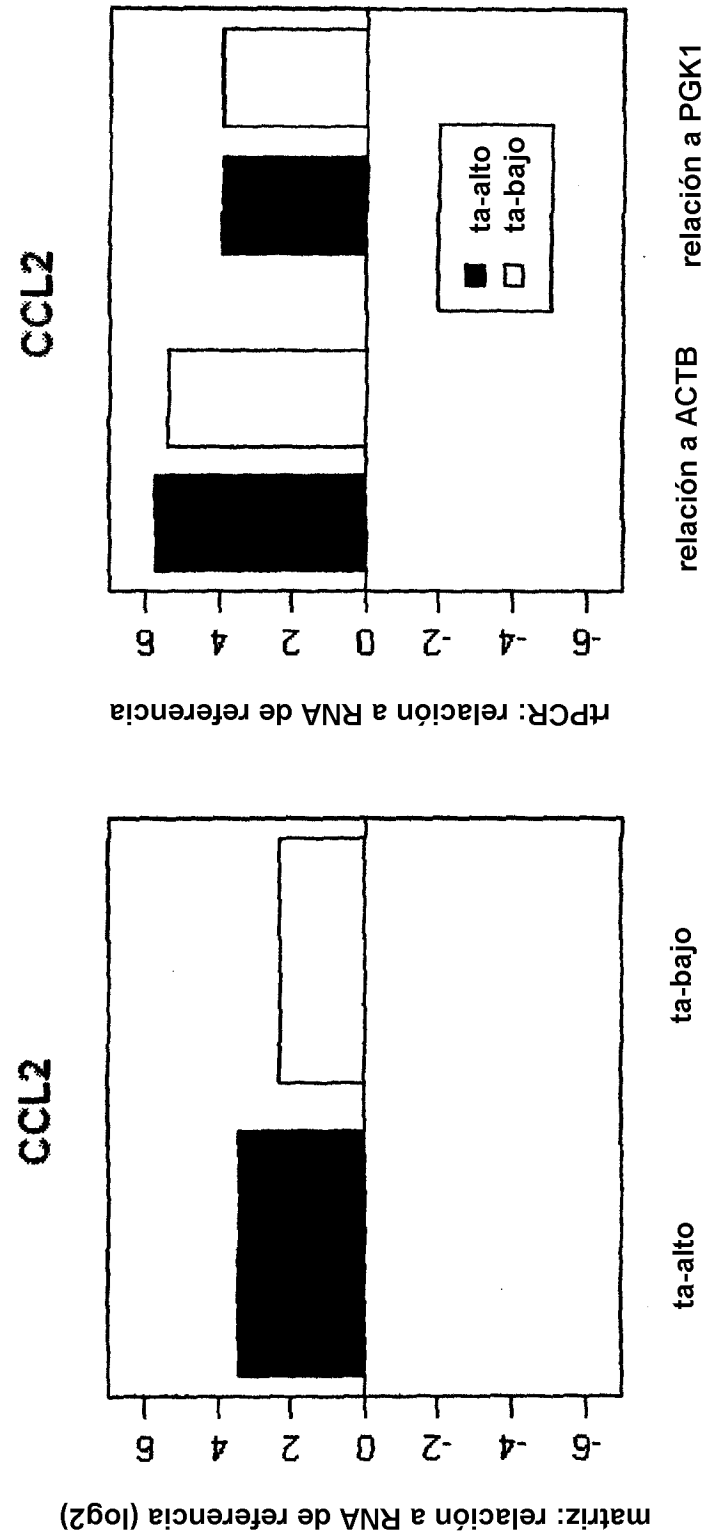


Figura 4:

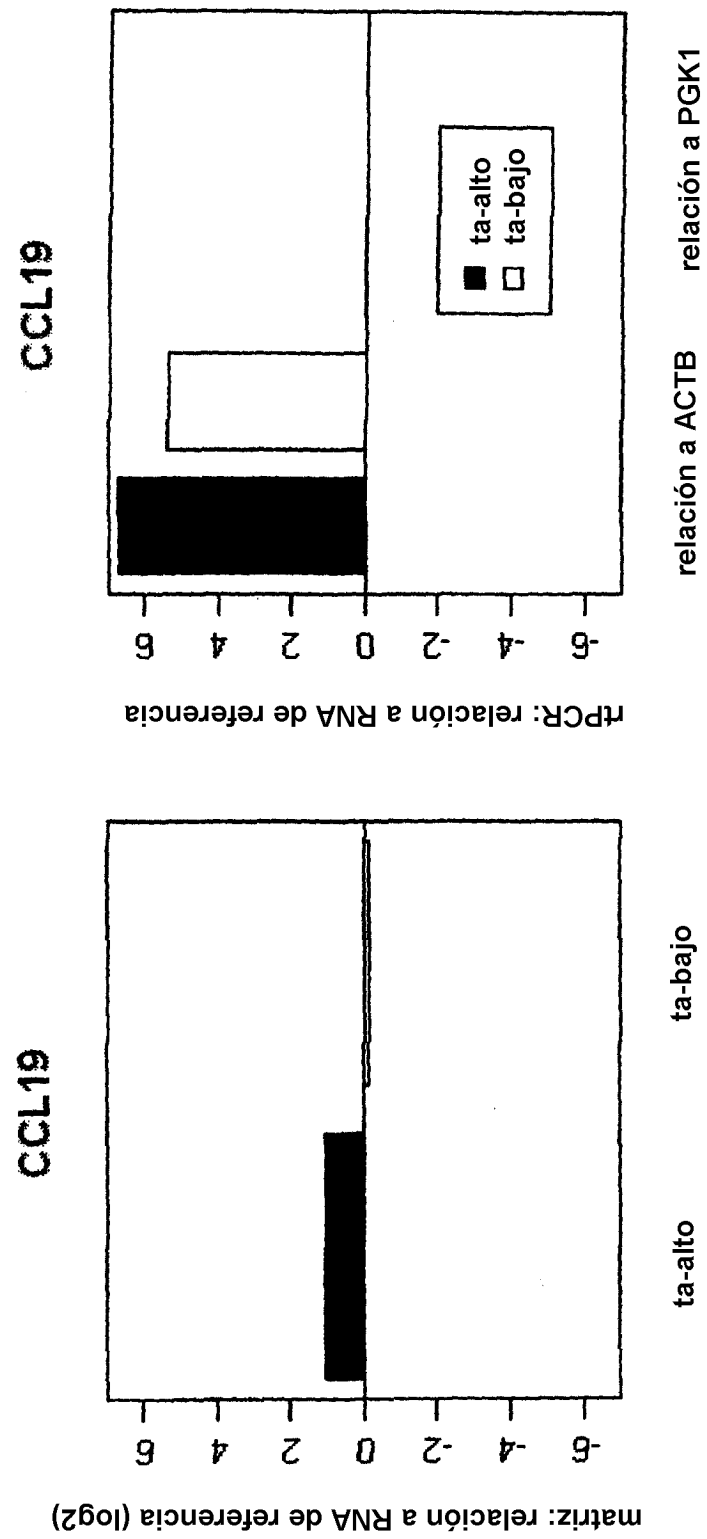


Figura 5:

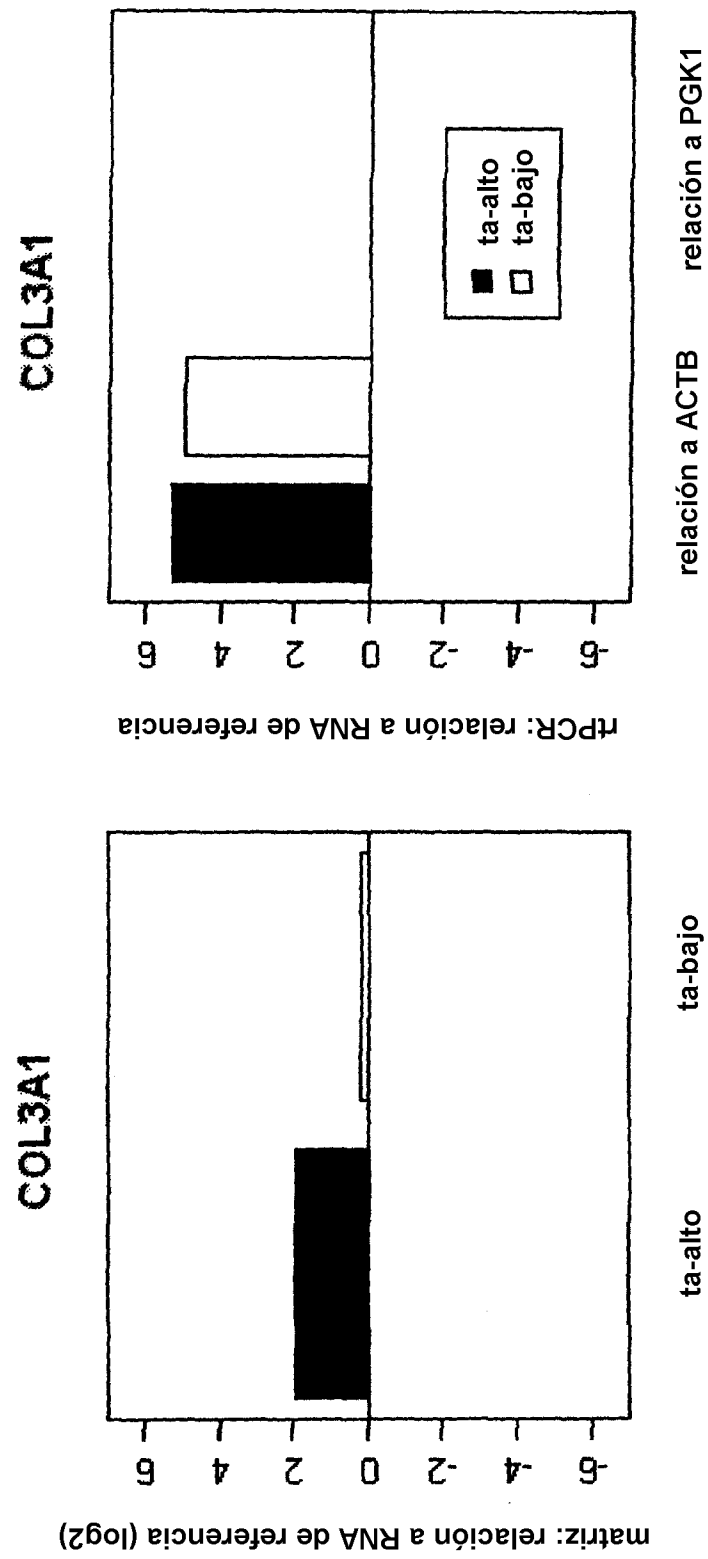


Figura 6:

