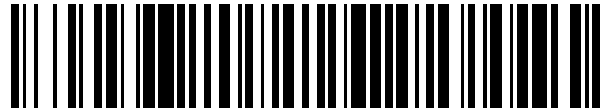


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 513 015**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2012 E 12152245 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2505667**

54 Título: **Dispositivo y método para el análisis de fallo renal**

30 Prioridad:

03.02.2011 EP 11153273

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2014

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(100.0%)
Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

THUM, THOMAS, PROF. DR. DR.;
LORENZEN, JOHAN, DR. y
KIELSTEIN, JAN, PD DR.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 513 015 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

Dispositivo y método para el análisis de fallo renal

5 La presente invención se refiere a un método analítico, y a un kit de partes, que está adaptado al método analítico, para analizar la muestra de un paciente para determinar las posibilidades de un paciente de desarrollar lesión renal aguda (AKI), y para determinar las posibilidades de pacientes que padecen AKI para supervivencia a largo plazo, por ejemplo, durante 28 días a partir del diagnóstico de AKI. La invención proporciona un analito, y el uso del analito, que respecto a AKI es esencialmente independiente de una sepsis o shock diagnosticado. La concentración del analito de la invención, preferiblemente en combinación con la concentración de uno o ambos de dos analitos adicionales en una muestra de fluido corporal humano, por ejemplo, en suero sanguíneo obtenido de pacientes, especialmente de pacientes que padecen AKI, es un marcador de la propensión de desarrollar AKI, y de supervivencia, por ejemplo, de 28 días de supervivencia, incluyendo recuperación renal.

15 Estado de la técnica

Juan et al. en Urology 835-841 (2010) describen la identificación de microARN que son característicos de cáncer renal en comparación con microARN de riñón normal.

20 Mitchell et al., PNAS 10513-10518 (2008) describen microARN en circulación como marcadores para cáncer, especialmente de miR-141 como característico de cáncer de próstata.

Ali et al., J. Am. Soc. Nephrol. 1292-1298 (2007) describen el análisis de valores de creatinina relacionados con lesión renal aguda y fallo renal crónico en fase aguda.

25 Bagger et al., Pediatr. Nephrol. 1655-1658 (2007) describen niveles de creatinina en suero y producción de orina como medidas que reflejan la función renal.

30 El documento US 2010/0173288 A1 describe que generalmente las patologías pueden analizarse por medición de todos los microARN detectables en suero sanguíneo de un paciente, y describe un kit y biochip, respectivamente, que contienen esencialmente todos los microARN maduros conocidos para suero humano.

35 El documento WO 2010/145035 A1 se refiere a marcadores para enfermedades renales y menciona miR-210 como marcador para cáncer renal.

El documento US 2011/0003704 A1 describe el análisis de microvesículas para el diagnóstico de enfermedades y menciona una cantidad muy grande de microARN, sin correlacionar específicamente un microARN específico a fallo renal agudo.

40 Li et al., Nephrology 599 - 608 (2010) describen que se ha observado en relación a carcinoma renal que miR210 está regulado por hipoxia y puede tener implicaciones para patogénesis tumoral.

45 El documento EP 2474622 A1, que es relevante según el artículo 54 (3) EPC solamente, describe el análisis de niveles aumentados de miR-127, miR-126, miR-210 y miR-101 en comparación con valores de control, siendo el aumento indicativo de muestras de daño renal agudo obtenidas de pacientes después de trasplante de riñón y en pacientes después de cirugía cardíaca.

Objeto de la invención

50 Un objetivo de la invención es proporcionar un método analítico, y un kit de partes adecuado para realizar el método, cada uno adecuado para evaluar el riesgo de pacientes de desarrollar AKI, y adecuado para evaluar el riesgo de mortalidad, y las posibilidades de supervivencia a largo plazo y recuperación renal, respectivamente, en pacientes con AKI.

55 Descripción general de la invención

La invención consigue el objetivo mencionado anteriormente proporcionando un método de acuerdo con la reivindicación 1 para el análisis del estado de la función renal en una muestra de fluido corporal obtenida de un paciente que no se ha diagnosticado con lesión renal aguda (AKI, también mencionado como fallo renal agudo) o en una muestra de fluido corporal obtenida de un paciente que se ha diagnosticado con AKI, siendo dicho análisis adecuado para y estando adaptado para evaluar las posibilidades para supervivencia a largo plazo, por ejemplo, durante 28 días desde el diagnóstico de AKI, y/o para la recuperación renal en un paciente con AKI, comprendiendo dicho método para el análisis determinar la concentración del microARN-210 (miR-210) que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico SEC ID N° 1: CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA, preferiblemente en combinación con determinar la concentración de uno o ambos de miR-320 que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico SEC ID N° 2: AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA y miR-16 que comprende o consiste

en la secuencia de ácido nucleico SEC ID Nº 3: UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG en una muestra, preferiblemente en una muestra de suero obtenida del paciente, pudiendo diagnosticarse dicho paciente que padece AKI, por ejemplo, por análisis de los niveles de creatinina.

5 La invención se basa en el hallazgo de que la concentración del miR-210 analito, preferiblemente en combinación con uno o ambos de miR-320 y miR-16, está significativamente correlacionada con la propensión de un paciente a desarrollar inicialmente AKI, y con las posibilidades de supervivencia, por ejemplo, durante 28 días, y para recuperación renal de pacientes con AKI. En mayor detalle, se ha descubierto que una concentración en suero de miR-210 que está elevada en comparación con los niveles medios en suero es indicativa de una propensión de una
10 persona a desarrollar AKI, y de una posibilidad reducida de supervivencia a largo plazo de pacientes con AKI, pero es generalmente indicativa de una mortalidad aumentada. El nivel medio en suero puede, por ejemplo, ser la concentración del microARN respectivo encontrado en personas sanas, especialmente de miR-210.

15 Las concentraciones de miR-320 que están disminuidas por debajo de las concentraciones medias en suero de personas sanas también son indicativas de una propensión aumentada a desarrollar inicialmente AKI, indicativas de una mortalidad aumentada, e indicativas de una probabilidad reducida de supervivencia a largo plazo en pacientes con AKI, y concentraciones de miR-16 disminuidas por debajo de una concentración media en personas sanas también son indicativas de una mortalidad aumentada.

20 En una primera realización, el método analítico para determinar la concentración de miR-210, opcionalmente en combinación con determinar la concentración de miR-320 y/o miR-16, permite la evaluación del riesgo de un paciente de desarrollar AKI, y/o de la propensión de un paciente a padecer o desarrollar AKI, ya que la concentración de los analitos de la invención es un indicador predictivo para AKI, siendo dicho indicador independiente de otros indicadores conocidos para AKI, por ejemplo, a partir del diagnóstico de sepsis o shock, y
25 esencialmente independiente del diagnóstico de los niveles de creatinina y/o de la producción de orina.

Generalmente, el método para el análisis puede realizarse detectando la concentración de los microARN que se usan como analito, es decir, miR-210, preferiblemente también miR-320 y/o miR-16 en una muestra de fluido corporal para determinar la concentración del miARN analito. La etapa de determinar la concentración del analito en
30 una primera realización generalmente comprende la etapa de poner en contacto una muestra de fluido corporal con una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una sección que es complementaria inversa al microARN (miR) analito, y detectar la concentración o varios híbridos formados por la sección de ácido nucleico complementaria inversa con los componentes de la muestra. Para detectar la concentración o varios híbridos específicos de analito, se prefiere que la secuencia de ácido nucleico comprenda o consista en una sección de ácido
35 nucleico que es complementaria inversa al miR analito, se inmovilice en un sustrato, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede estar contenida en un panel de secuencias de ácido nucleico que se inmovilizan y se espacian en un sustrato portador, tal como paneles o series de ácido nucleico en forma de un chip.

40 En una realización adicional, la etapa de determinar la concentración del uno o más miR analito puede realizarse por transcripción inversa y PCR (RT-PCR) usando un cebador oligonucleotídico que es específico para el miR analito, seguido por transcripción inversa y amplificación de al menos una sección del miR analito por PCR. Para la detección, pueden usarse sondas de hibridación que se marcan con un cromóforo y un inactivador separado, teniendo la sonda una secuencia de ácido nucleico específica de analito, por ejemplo, como se conoce para la PCR TaqMan.
45

Generalmente, el método analítico se realiza usando un control interno para las reacciones de determinación de la concentración del miR analito añadiendo un miR conocido como control a la muestra y analizando la concentración del miR de control añadido por detección paralela con especificidad por el miR de control. El miR que se añade a la muestra como control interno para el método analítico puede ser una concentración o número de copias conocido
50 del miR analito, por ejemplo, un número de copias conocido de miR-210, miR-320 y/o miR-16, y/o un miR de origen humano o no humano, por ejemplo, un microARN sintético o bacteriano. Preferiblemente, el miR de control interno añadido se produce por transcripción bacteriana a partir de una secuencia de ADN que codifica el miR, o se produce por síntesis enzimática, por ejemplo, por PCR, o por síntesis química.

55 La amplificación específica del miARN de control interno añadido se usa preferiblemente para la normalización de la concentración en suero o número de copias inicial u original determinada del miARN analito, por ejemplo, miR-210, miR-320 y/o miR-16. La concentración en suero inicial del miARN analito se determinó aplicando una curva patrón para la relación de la amplificación medida del miARN analito añadido de concentración conocida a la cantidad medida de productos de amplificación obtenidos por RT-PCR para el miARN analito. En detalle, se genera una curva patrón añadiendo una cantidad de copias conocida (concentración) de miARN analito, por ejemplo, de miR-16, miR-210 y miR-320, por ejemplo, obtenible de Ambicon Co. a 0,2 fmol/μl de miARN analito, realizando RT-PCR con cebadores específicos por el miARN analito, y midiendo la cantidad de copias de productos de amplificación específicos. Además de añadir miARN analito de concentración conocida, se añadieron miARN de control interno, por ejemplo, miR-54 de *C. elegans* de número de copias conocido y cebadores específicos para el miARN de control
60 interno. La concentración en suero original de miARN analito puede calcularse aplicando la relación de la cantidad de copias de productos de amplificación específicos de analito a la concentración original de miARN analito,
65

determinándose dicha relación en la curva patrón. La normalización pudo obtenerse dividiendo la concentración determinada de concentración original de miARN analito por la concentración de miARN de control interno añadido.

5 Por consiguiente, el método para el análisis preferiblemente comprende el cálculo de la concentración del miARN analito mediante una curva patrón que contiene la correlación predeterminada entre la concentración de productos de amplificación específicos de miARN analito detectados obtenidos en RT-PCR a una concentración original (inicialmente conocida) de miARN analito en suero.

10 Para justificar la variabilidad de aislamiento de ARN de suero, el método preferiblemente contiene la etapa de añadir una concentración conocida de un miARN de control interno conocido al suero, aislar ARN del suero, realizar RT-PCR sobre el ARN con pares de cebadores específicos añadidos par el miARN analito y para el miARN de control, respectivamente, y además calcular la concentración original de miARN analito mediante la curva patrón, contiendo también el método la etapa de calcular la concentración original de miARN de control añadido mediante una curva patrón predeterminada que contiene la correlación predeterminada de la concentración detectada de productos de amplificación del miARN de control a la concentración original de miARN de control, y realizar el cociente de la concentración original calculada de miARN analito y la concentración calculada de miARN de control. Por consiguiente, generalmente se prefiere determinar la concentración de miARN analito en la muestra de suero como un cociente a un miARN de control. Por ejemplo, si se añadía el miR-54 de *C. elegans* de control a 5 fmol/ μ l de suero, para miR-210 como miARN analito, el cociente de (concentración inicial calculada de miR-210) / (concentración calculada de miR-54 de control (*C. elegans*)) por encima de $4,00098 \times 10^{-5}$ en pacientes con AKI se encontró que era indicativo de un peor pronóstico para supervivencia que un cociente inferior. El miARN de control es un miARN añadido, preferiblemente de una secuencia de nucleótidos no humana, o un miARN que se determina o se sabe que está presente a concentraciones constantes en suero humano.

25 Preferiblemente, el método de análisis, así como la determinación de la curva patrón para el miARN analito y el ARN de control, por ejemplo, ARN no codificante, preferiblemente un miARN, respectivamente, se realizan usando al menos dos diluciones diferentes del ARN aislado, por ejemplo, diluciones 2 a 6 ó 3 a 4, cada una, por ejemplo, diluida por un factor de 5 a un factor de 10.

30 Además de la normalización del miARN analito a un ARN de control añadido, por ejemplo, un miARN de control, miR-210 puede normalizarse a un ARN constitutivo intrínseco, por ejemplo, a un ARN pequeño constitutivo, que preferiblemente es un miARN o un ARNnop, por ejemplo, el equivalente humano al ARNnop202 murino (SEC ID N° 5). En estas realizaciones, las concentraciones del miARN analito miR-210 se calculan en relación a la concentración del ARN constitutivo, que es, por ejemplo, un ARNnop.

35 En una realización adicional, la invención se refiere al uso de secuencias de ácido nucleico que contienen o consisten en una sección que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de al menos uno de los microARN analito, y/o al uso de secuencias de ácido nucleico que contienen o consisten en una sección que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria inversa a al menos uno de los microARN analito, por ejemplo, a secuencias de ácido nucleico que contienen o consisten en una secuencia de nucleótidos de miR-210, y/o a secuencias de ácido nucleico que contienen o consisten en una secuencia de nucleótidos que es complementaria inversa a miR-210, opcionalmente también a secuencias de ácido nucleico que contienen o consisten en miR-320, y/o miR-16 y/o secuencias de ácido nucleico que contienen o consisten en una sección que es complementaria inversa a miR-320, y/o miR-16, como una sustancia indicadora que es específica para la función renal, especialmente para su uso como sustancia indicadora que es específica para la propensión a padecer o a desarrollar AKI, y/o como una sustancia indicadora, cuya concentración en una muestra de fluido corporal es indicativa de la propensión a una mortalidad aumentada para pacientes con AKI.

50 Opcionalmente, el método incluye la etapa de determinar la concentración promedio de miR-210, opcionalmente también de miR-320 y/o de miR-16, en relación a la concentración de un microARN constitutivo. La concentración de un microARN constitutivo puede determinarse por los métodos descritos para la concentración de miR-210.

Descripción detallada de la invención

55 La invención se describe ahora en mayor detalle mediante ejemplos con referencia a las figuras, donde

- la Figura 1 muestra la concentración de miR-16 en pacientes con lesión renal aguda (AKI), y en individuos de control sanos,
- la Figura 2 muestra los niveles de miR-320 en pacientes con AKI y en individuos de control sanos (CTL),
- 60 - la Figura 3 muestra la concentración de miR-210 en pacientes con AKI y en individuos sanos (CTL),
- la Figura 4 muestra la concentración de miR-16 en pacientes con AKI agrupados por supervivientes y no supervivientes,
- la Figura 5 muestra la concentración de miR-320 agrupado por supervivientes y no supervivientes,
- la Figura 6 muestra la concentración de miR-210 en pacientes con AKI, agrupados por supervivientes y no supervivientes,
- 65 - la Figura 7 muestra la fracción de pacientes supervivientes agrupados para concentraciones de miR-210 por

debajo de una concentración media, y concentraciones por encima de una concentración media, respectivamente, sobre la escala de tiempo, y

- la Figura 8 muestra la concentración relativa de miR-210 en un experimento animal de lesión renal aguda.

5 En el análisis de 77 pacientes con AKI y de 30 individuos sanos de edad coincidente que sirvieron como control (CTL), se midieron de forma cuantitativa los microARN por RT-PCR de muestras séricas. Se descubrió que en pacientes con AKI, las concentraciones de miR-210 eran superiores ($p < 0,0001$) mientras que las concentraciones de miR-16 ($p < 0,0001$) y de miR-320 ($p < 0,0001$) eran inferiores en comparación con individuos sanos. Este resultado muestra que una concentración de miR-210 superior que la concentración media en un individuo sano es indicativa de AKI o de una propensión significativa a padecer o desarrollar AKI, mientras que concentraciones de miR-16 y/o de miR-320 por debajo de la concentración media de individuos sanos también es indicativa de AKI, o de una propensión significativa a padecer o desarrollar AKI.

15 Los análisis de regresión Cox de múltiples variables y de curva de Kaplan-Meier revelaron que la concentración de miR-210 pudo usarse como analito independiente indicativo de la propensión a padecer o desarrollar AKI, o de la presencia de AKI, ya que una concentración aumentada de miR-210 por encima de la concentración media de este analito en individuos sanos es un indicador independiente que está correlacionado con una supervivencia reducida de 28 días ($p = 0,05$ y $p = 0,03$, respectivamente). Las características demográficas, clínicas y de laboratorio detalladas de un total de 77 pacientes se muestran en la Tabla 1, donde

20 APACHE II = evaluación de salud fisiológica aguda y crónica II, BMI = índice de masa corporal, CRP = proteína C-reactiva, eGFR = tasa de filtración glomerular estimada; UCI = unidad de cuidados intensivos; MAP = presión sanguínea arterial media; n = número de pacientes; RRT = terapia de reemplazo renal; SOFA = evaluación de fallo orgánico secuencial:

25 **Tabla 1: Características demográficas, clínicas y de laboratorio de pacientes**

	Total	supervivientes	no supervivientes	valor-p
Número de pacientes	77	49	28	0,7
Hombres (n; %)	40 (52)	26	14	
Mujeres (n; %)	37 (48)	23	14	
Disciplina de admisión en UCI				0,9
Medicina (n; %)	29 (38)	19 (40)	10 (36)	
Cirugía general (n; %)	20 (26)	13 (27)	7 (25)	
Cirugía cardíaca (n; %)	28 (36)	17 (35)	11 (39)	
Edad (años)	49 (39-60)	49 (40-61)	50 (38-60)	0,8
BMI (kg/m ²)	25 (22-28)	25 (22-28)	25 (22-28)	0,6
Indicación para RRT				
Pérdida de eGFR >30 %	68	44	24	0,4
Oliguria/anuria	48	30	18	0,9
Acidosis metabólica	7	1	6	0,005*
Hipercalemia	6	2	4	0,1
Valor SOFA	13 (11-16)	12 (10-15)	14 (13-18)	0,05*
Clase RIFLE				0,2
Riesgo (n; %)	5 (6)	2 (4)	3 (11)	
Lesión (n; %)	21 (27)	16 (33)	5 (18)	
Fallo (n; %)	50 (65)	30 (63)	20 (71)	
Valor APACHE II	29 (25-34)	28 (23-34)	34 (29-38)	0,4
CRP (mg/L)	128 (47-202)	96 (48-205)	141 (56-198)	0,5
MAP (mmHg)	82 (71-94)	84 (70-97)	78 (73-86)	0,3
Ritmo cardíaco (bpm)	99 (88-109)	92 (83-104)	100 (96-117)	0,6
miR-16	$1,9 \times 10^{-4}$ ($9,7 \times 10^{-5}$ - $4,9 \times 10^{-4}$)	$1,9 \times 10^{-4}$ ($9,4 \times 10^{-5}$ - 4×10^{-4})	$2,2 \times 10^{-4}$ ($1,2 \times 10^{-4}$ - $1,2 \times 10^{-3}$)	0,9
miR-210	4×10^{-5} ($1,4 \times 10^{-5}$ - 1×10^{-4})	3×10^{-5} (1×10^{-5} - $7,6 \times 10^{-5}$)	7×10^{-5} ($2,8 \times 10^{-5}$ - $1,2 \times 10^{-4}$)	0,02*
miR-320	1×10^{-4} (5×10^{-5} - $3,4 \times 10^{-4}$)	1×10^{-4} (4×10^{-5} - $2,8 \times 10^{-4}$)	$1,7 \times 10^{-4}$ ($8,3 \times 10^{-5}$ - $4,1 \times 10^{-4}$)	0,03*

65 Estos datos muestran que no pudo encontrarse asociación entre los microARN analizados y el valor APACHE II o el valor SOFA. Además, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los microARN indicados en pacientes con o sin sepsis (miR-16: $p=0,3$; miR-210: $p=0,4$; miR-320: $p=0,6$), cirugía (miR-16: $p=0,4$; miR-210: $p=0,7$; miR-320: $p=0,8$), o shock (miR-16: $p=0,5$; miR-210: $p=0,5$; miR-320: $p=0,4$). Así mismo, las concentraciones de los microARN analizados no difirieron entre pacientes de las diferentes unidades de cuidados intensivos evaluados por ANOVA (miR-16: $p=0,4$; miR-210: $p=0,3$; miR-320: $p=0,08$). Las concentraciones de los microARN

analizados no se correlacionaron con niveles de creatinina en suero al inicio de la terapia de reemplazo renal (RRT) (miR-16: $r=-0,14$ $p=0,2$; miR-210: $r=-0,3$ $p=0,8$; miR-320: $r=-0,4$, $p=0,8$).

Los resultados analíticos para los pacientes con AKI y controles sanos (CTL) de la concentración determinada de miR-16 en suero se muestran en la Figura 1, para miR-320 en la Figura 2, y para miR-210 en la Figura 3. Para el análisis, se hicieron adiciones de muestras séricas con miR-54 recombinante de *Caenorhabditis elegans* a 5 fmol/ μ l como miR de control interno, que se detectó en paralelo por la RT-PCR cuantitativa usando el método TaqMan cebador de transcripción inverso específico, y oligonucleótido de detección, para normalizar las posibles diferencias en la eficacia del método analítico, incluyendo la eficacia en el aislamiento de ARN del suero. El suero con adiciones se usó para el aislamiento de ARN con el kit de purificación de ARN MasterPure™ obtenible en Epicenter Biotechnologies.

La normalización de los resultados de medición para los microARN analito usando la concentración detectada del miR-54 (SEC ID N° 4: UACCCGUAUUCUUAUAAUCCGAG) se hizo de acuerdo con Fichtlscherer et al ("Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease", *Circ. Res.* 677 - 684 (2010)). En resumen, la concentración de miR analito, por ejemplo, de miR-210, miR-320 y de miR-16 se calculó a partir de la cantidad de productos de amplificación específica por volumen de reacción para obtener un número de copias inicial calculado de cada miR analito por volumen de muestra inicial, dicho número de copias inicial de miR analito por volumen de muestra inicial se dividió por la concentración de número de copias inicial de miR de control añadido, por ejemplo, dividido por la concentración calculada de miR de control que se obtuvo de una concentración añadida de 5 fmol/ μ l de suero, justificando de este modo las pérdidas durante el aislamiento del ARN.

Usando esta normalización de miR-54 de control de *C. elegans* añadido a 5 fmol/ μ l de volumen de muestra inicial, el aislamiento del ARN total, la RT-PCR usando pares de cebadores específicos para el miR analito, por ejemplo, para miR-210 y un par de cebadores específico para el miR-54 de control, se determinó el valor medio de la concentración de miR-210 normalizado por división de la concentración inicial calculada de miR-210 en la muestra por la concentración de miR de control añadido, añadido a una concentración de suero de 5 fmol/ μ l de suero, a un valor de $4,00098 \times 10^{-5}$. Concentraciones en suero de miR-210 por encima de una proporción de $4,00098 \times 10^{-5}$ (concentración inicial de miR-210 calculada a partir de productos de RT-PCR) / (concentración inicial calculada para miR-54 de control) en pacientes que padecen AKI indican un pronóstico peor para un periodo de 28 días, que fue el periodo de observación.

Se predeterminaron curvas patrón de la correlación de la concentración de productos de amplificación por RT-PCR específicos a la concentración original del microARN respectivo en el ARN con al menos 4 diluciones de ARN total aislado que contenía el microARN a una concentración conocida, difiriendo cada dilución en un factor de 10. Preferiblemente, el microARN conocido se añadió a una concentración conocida en el suero, y se aisló el ARN total del suero, diluido a al menos 2 etapas de dilución, y sometido a RT-PCR usando un par de cebadores específico para el micro-ARN que se añadió originalmente al suero.

En líneas generales, el método analítico puede incluir la etapa de medir la concentración de un microARN constitutivo conocido presente en suero, y dividir la concentración del microARN analito por la concentración del microARN constitutivo para la normalización.

Los resultados mostrados en las Figuras 1 a 3 demuestran que en todos los pacientes con AKI e individuos de control, podía confirmarse que se encontraron concentraciones inferiores a la media de miR-16 y de miR-320 (ambos $p < 0,001$), y concentraciones mayores a la media de miR-210 en pacientes con AKI en comparación con controles sanos.

La única asociación significativa que se encontró fue las concentraciones iniciales de miR-16 ($r=0,3$, $p=0,02$), miR-210 ($r=0,4$, $pp<0,001$), y de miR-320 ($r=0,4$, $pp<0,001$) que se correlacionan con los niveles de lactato, y las concentraciones iniciales de miR-210 adicionalmente se correlacionaron con el ritmo cardíaco ($r=0,04$, $p<0,0001$) las concentraciones iniciales de miR-320 se correlacionaron con el ritmo cardíaco ($r=0,4$, $p<0,0001$), y la dosis de noradrenalina ($r=0,3$, $p=0,04$).

Después del análisis inicial, los pacientes con AKI experimentaron terapia de reemplazo renal, y los pacientes se agruparon 4 semanas después de la terapia en supervivientes y no supervivientes. Se descubrió que generalmente estos dos grupos de pacientes eran comparables con respecto a la demográfica inicial y a la proporción de las categorías RIFLE mostradas en la Tabla 1. Se descubrió que el grupo de supervivientes y el grupo de no supervivientes solamente diferían con respecto a la proporción de pacientes con acidosis metabólica ($p=0,005$), y el valor SOFA ($p=0,05$). Se descubrió que pacientes que padecen sepsis tienen valores SOFA superiores y APACHE II superiores, que se consideraron resultado de alteración cardiovascular y respiratoria más severa en comparación con los pacientes no sépticos.

Los resultados analíticos para los pacientes con AKI para supervivientes y no supervivientes se muestran en la Figura 4 para la concentración de miR-16, en la Figura 5 para miR-320, y en la Figura 6 para la concentración de miR-210. Se descubrió que la concentración de miR-210 ($p=0,02$) y de miR-320 ($p= 0,03$) eran significativamente

superiores en no supervivientes, mientras que miR-16 no mostraba una diferencia entre no supervivientes y supervivientes.

Se hizo un análisis inicial por el análisis de riesgos proporcionales Cox de una variable para determinar una posible relación entre las concentraciones en circulación de microARN al inicio de RRT y mortalidad. Se descubrió que en los pacientes con AKI inicial, las concentraciones de miR-16, la edad, el género y el índice de masa corporal no estaban significativamente asociados con la supervivencia, como se muestra en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2: Análisis de regresión Cox de una variable y múltiples variables para la supervivencia

Variables	Una variable			Múltiples variables		
	HR	CI 95 %	valor-p	HR	CI 95 %	valor-p
miR-210 (log10)	1,868	1,079 a 3,232	0,03*	1,719	0,999 a 2,959	0,05*
miR-320 (log10)	2,119	1,074 a 4,181	0,03*	n.s.		
miR-16 (log10)	1,299	0,753 a 2,242	0,3			
Edad (años)	0,994	0,969 a 1,020	0,7			
Índice de masa corporal (kg/m ²)	0,972	0,897 a 1,054	0,5			
Genero (h/m)	0,909	0,433 a 1,907	0,8			
Sepsis (si/no)	2,257	1,071 a 4,753	0,03*	n.s.		
Cirugía (si/no)	2,024	0,947 a 4,324	0,07	n.s.		
Valor SOFA	1,203	1,066 a 1,357	0,003*	1,194	1,054 a 1,352	0,005*
Valor APACHE II	1,055	1,007 a 1,106	0,03*	n.s.		

CI = intervalo de confianza, HR = proporción de riesgos, n.s. = no significativo, * = p<0,1

A partir de los datos de la Tabla 2, se descubrió que las variables cirugía mayor, sepsis, valor APACHE II, y valor SOFA así como las concentraciones de miR-210, y miR-320 desempeñan una significancia pronóstica a un nivel del 10 %. En análisis de múltiples variables, se descubrió que solamente el valor SOFA (p= 0,005), y miR-210 (p= 0,05) son predictores independientes de supervivencia. En análisis de curva ROC miR-210 produjo un área bajo la curva ROC de 0,74 (error típico de la media: 0,06; intervalo de confianza al 95 %: 0,53 a 0,78; p=0,03), mientras que la concentración de miR-320 mostró un nivel similar de significancia (área bajo la curva ROC 0,7; error típico de la media: 0,07; intervalo de confianza al 95 %: 0,53 a 0,78; p=0,03). Las concentraciones de miR-16 no alcanzaron significancia estadística (área bajo la curva ROC 0,55, error típico de la media: 0,07, intervalo de confianza al 95 %: 0,41 a 0,69, p=0,4). Por motivos de comparación, el área bajo la curva del valor SOFA dio un valor de 0,7 (error típico de la media: 0,06, intervalo de confianza al 95 %: 0,57 a 0,82, p=0,005).

La Figura 7 muestra la curva de Kaplan-Meier de la supervivencia a las 4 semanas después del inicio de RRT, estratificado para la concentración de miR-210 por encima y por debajo del valor de concentración media. El ensayo de rango Log confirmó la significancia estadística para miR-210 (p=0,03), mientras que miR-320 (p=0,08) y miR-16 (p=0,4) no mostraron significancia estadística en este ensayo.

Ejemplo: Modelo animal de lesión renal aguda

Como modelo animal, se indujo isquemia renal/lesión por reperfusión (IRI) en ratones C57B 1/6 por pinzamiento bilateral de ambos pedículos renales. Los animales se anestesiaron con isoflurano y se manipularon generalmente de acuerdo con las directrices de experimentos en animales. Después de laparotomía media, los pedículos renales se diseccionaron de forma roma y se aplicó un pinzamiento vascular no traumático durante 27 minutos. A las 4 semanas después de la inducción de IRI bilateral los animales se sacrificaron y se aisló el ARN de los riñones completos. Se usaron animales de simulación como controles. Para el análisis de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) in vivo, se extrajo el ARN del tejido renal con reactivo Trizol (Invitrogen). Después de la transcripción inversa del ARN total, se realizó qRT-PCR con el ensayo TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems, ABI) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para detectar el nivel de miR-210. Se normalizó miR-210 al ARN pequeño constitutivo ARNnop202 (SEC ID N° 5). Para la comparación con animales de control, se calcularon las concentraciones de miR-210 en relación a la concentración del ARNnop202 constitutivo.

El resultado se muestra en la Figura 8, que demuestra que también en el experimento animal, la concentración de miR-210 estaba elevada en lesión renal aguda inducida. Además, los datos muestran que el elevado nivel de miR-210 es indicativo de tejido renal. Por consiguiente, en la actualidad se concluye que los niveles en suero de miR-210 que se han descubierto que son indicativos de lesión renal aguda en seres humanos podrían originarse directamente del tejido renal.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Medizinische Hochschule Hannover
- <120> Dispositivo y método para el análisis de fallo renal
- <130> M1038-N-EP

ES 2 513 015 T3

<150> EPEP11153273
 <151> 03-02-2011

5 <160> 5

<170> BiSSAP 1.0

10 <210> 1
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /tipo de molécula = "ARN" /organismo = "*Homo sapiens*"

20 <220>
 <221> ARNnc
 <222> 1..22
 <223> /clase de ARNnc = "miARN"

25 <400> 1
 cugugcgugu gacagcggcu ga 22

30 <210> 2
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /tipo de molécula = "ARN" /organismo = "*Homo sapiens*"

40 <220>
 <221> ARNnc
 <222> 1..22
 <223> /clase de ARNnc = "miARN"

45 <400> 2
 aaaagcuggg uugagagggc ga 22

50 <210> 3
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..22
 <223> /tipo de molécula = "ARN" /organismo = "*Homo sapiens*"

60 <220>
 <221> ARNnc
 <222> 1..22
 <223> /clase de ARNnc = "miARN"

65 <400> 3
 uagcagcacg uaaauauugg cg 22

<210> 4
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> *Caenorhabditis elegans*

ES 2 513 015 T3

5 <220>
<221> fuente
<222> 1..24
<223> /tipo de molécula = "ARN" /organismo = "*Caenorhabditis elegans*"

10 <220>
<221> ARNnc
<222> 1..24
<223> /clase de ARNnc = "miARN"

15 <400> 4
uaccguaau cuucauaauc cgag 24

20 <210> 5
<211> 48
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..48
<223> /tipo de molécula = "ADN" /organismo = "*Mus musculus*"

30 <220>
<221> ARNnc
<222> 1..48
<223> /clase de ARNnc_ = "ARNnop"

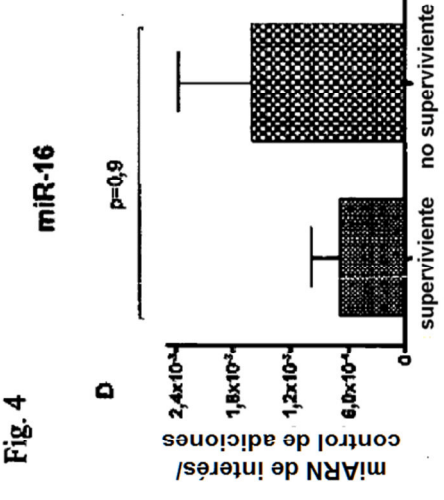
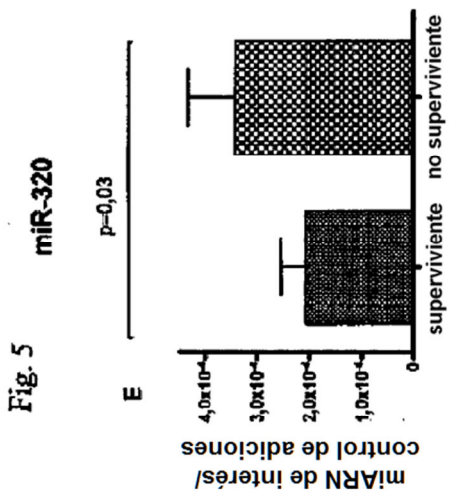
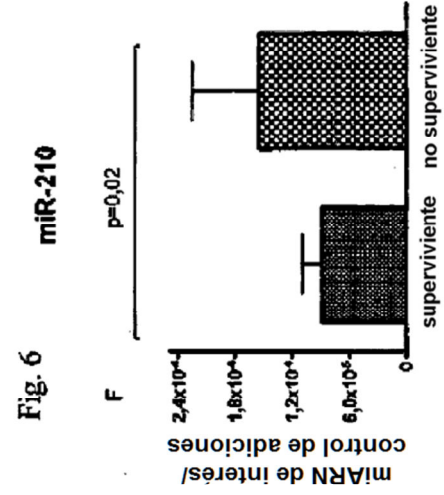
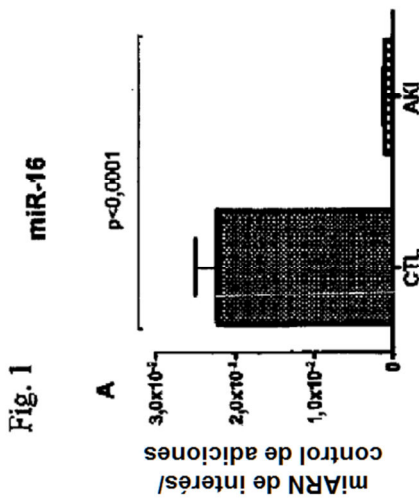
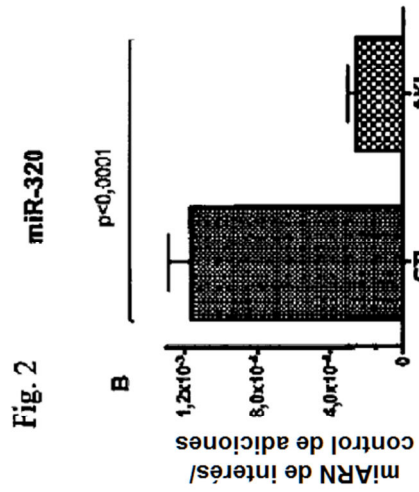
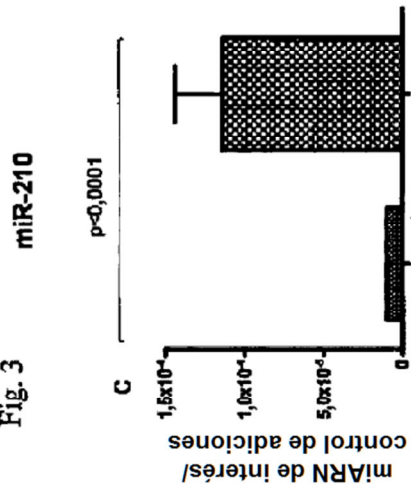
<400> 5
gctgtactga cttgatgaaa gtacttttga acccttttcc atctgatg 48

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el análisis del estado renal en una muestra de fluido corporal determinando la concentración de un analito, **caracterizado por que** el estado renal es lesión renal aguda y el analito es miR-210 y que comprende añadir un microARN conocido como control a la muestra y analizar la concentración del microARN de control añadido por detección paralela con especificidad por el microARN de control.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** la determinación adicional de la concentración de al menos uno de los analitos del grupo que contiene miR-16 y miR-320.
- 15 3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el microARN de control es una concentración conocida de miR-210, miR-320 y/o de miR-16 y/o de un microARN de origen no humano.
- 20 4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la etapa de determinación de la concentración del analito comprende la etapa de poner en contacto la muestra de fluido corporal con una secuencia de ácido nucleico que comprende una sección que es complementaria inversa al analito y detectar la concentración de híbridos de ácido nucleico formados de la secuencia de ácido nucleico que comprende la sección de ácido nucleico complementaria inversa.
- 25 5. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la secuencia de ácido nucleico que contiene la sección de ácido nucleico que es complementaria inversa al analito se inmoviliza en un sustrato de vehículo.
- 30 6. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la secuencia de ácido nucleico que contiene la sección de ácido nucleico que es complementaria inversa al analito se marca por medio de un cromóforo detectable o se marca por medio de una combinación de un cromóforo detectable y un inactivador separado del cromóforo.
- 35 7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la etapa de determinación de la concentración del analito comprende una reacción de transcripción inversa usando un oligonucleótido como cebador que es específico para el analito y una reacción de PCR usando dos oligonucleótidos como cebadores que son específicos para el analito.
- 40 8. Método de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** el producto de amplificación de la reacción de PCR se detecta específicamente por hibridación con un oligonucleótido marcado que contiene la secuencia de ácido nucleico del analito o que contiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria inversa al analito.
- 45 9. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el método comprende la etapa de
- añadir a la muestra un miARN de control conocido a una concentración conocida,
 - aislar al ARN total de la muestra,
 - realizar RT-PCR sobre el ARN con pares de cebadores específicos añadidos para cada uno del analito y para el miARN de control, respectivamente,
 - 45 - calcular la concentración original de analito mediante la curva patrón, que contiene la correlación predeterminada de la concentración detectada de productos de amplificación del analito a la concentración original de miARN,
 - calcular la concentración original de miARN de control mediante una curva patrón predeterminada que contiene la correlación predeterminada de la concentración detectada de productos de amplificación del miARN de control a la concentración original de miARN de control, y
 - 50 - formar el cociente de la concentración original calculada de analito y la concentración calculada de miARN de control.
- 55 10. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el método comprende la etapa de
- aislar el ARN total de la muestra,
 - realizar RT-PCR sobre el ARN con pares de cebadores específicos añadidos para cada uno del analito y para un ARN constitutivo, respectivamente,
 - 60 - calcular la concentración original de analito mediante la curva patrón, que contiene la correlación predeterminada de la concentración detectada de productos de amplificación del analito a la concentración original de miARN analito,
 - calcular la concentración original de ARN constitutivo mediante una curva patrón predeterminada que contiene la correlación predeterminada de la concentración detectada de productos de amplificación del ARN constitutivo a la concentración original de ARN constitutivo, y
 - 65 - formar el cociente de la concentración original calculada de analito y la concentración calculada de ARN

constitutivo.

- 5
11. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la muestra se origina de un paciente que no se ha diagnosticado con lesión renal aguda.
12. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado por que** la muestra se origina de un paciente que se ha diagnosticado con lesión renal aguda.
- 10
13. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** la comparación de la concentración detectada del analito con la concentración del analito en personas sanas.
- 15
14. Uso de un dispositivo como sustancia indicadora que es específica para lesión renal aguda en un método de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, conteniendo el dispositivo una secuencia de ácido nucleico que contiene la secuencia de miR-210 y/o una sección de ácido nucleico que es complementaria inversa a miR-210.
- 20
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 como sustancia indicadora que es específica para el estado renal, **caracterizado por que** el dispositivo contiene adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que contiene una sección que es idéntica a miR-16 y/o a miR-210, y/o una sección de nucleótidos que es complementaria inversa a miR-16 y/o complementaria inversa a miR-210.
16. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 15, **caracterizado por que** la secuencia de ácido nucleico se inmoviliza en un sustrato de vehículo.



miR-210 en circulación

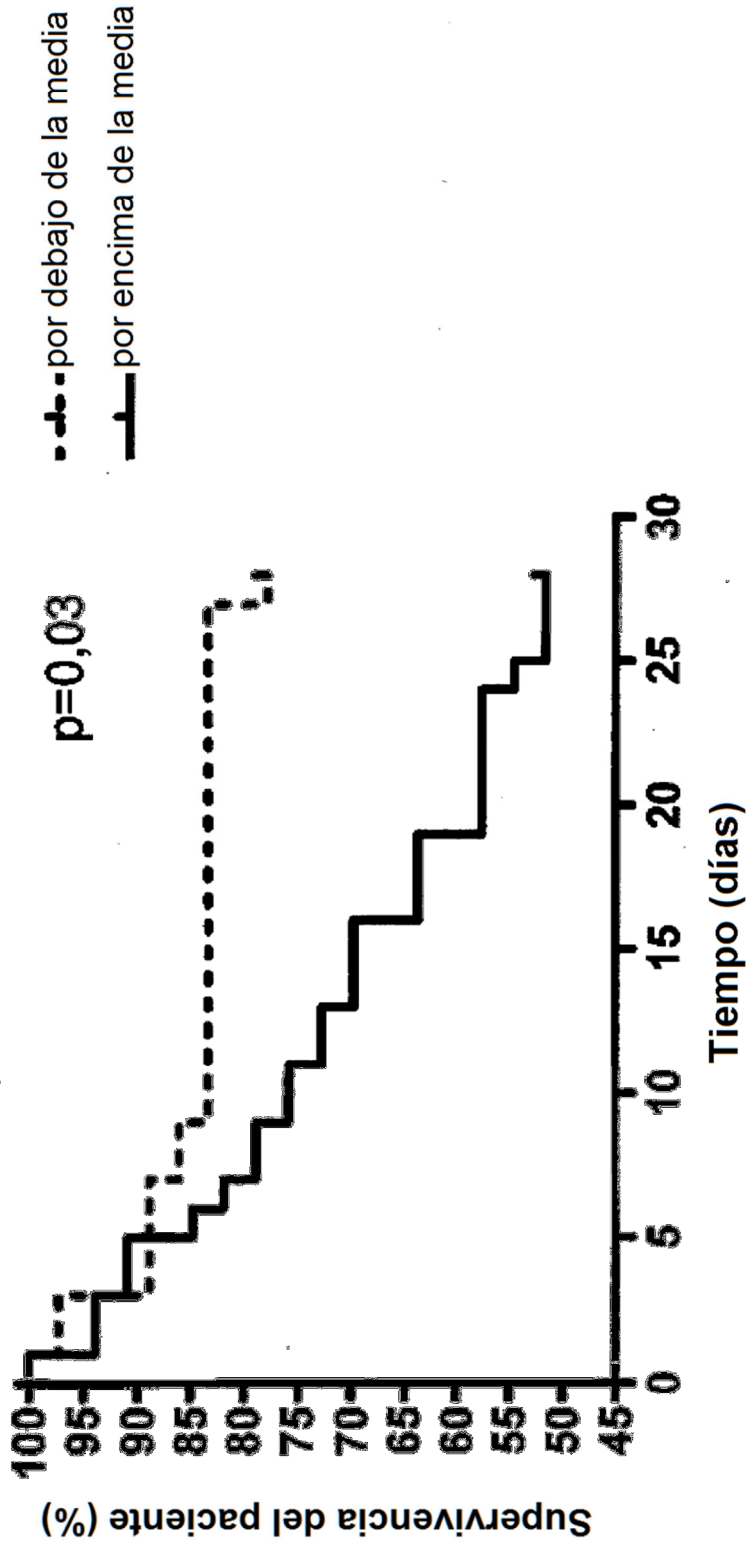


Fig. 7

Fig. 8

