

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 717**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2009 E 09779547 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2435826**

54 Título: **Proteína activadora de GM2 en orina como marcador de fallo renal agudo o de riesgo de desarrollar fallo renal agudo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, no. 1
37008 Salamanca, ES**

72 Inventor/es:

**QUIROS LUIS, YAREMI;
FERREIRA REDONDO, LAURA;
SANCHO MARTÍNEZ, SANDRA MARÍA;
GONZÁLEZ DE BUITRAGO ARRIERO, JOSÉ
MANUEL;
LÓPEZ HERNÁNDEZ, FRANCISCO JOSÉ y
LÓPEZ NOVOA, JOSÉ MIGUEL**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 516 717 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

Proteína activadora de GM2 en orina como marcador de fallo renal agudo o de riesgo de desarrollar fallo renal agudo

5 La invención hace referencia a un método para determinar el riesgo de desarrollar fallo renal agudo (FRA) en un individuo o para determinar un FRA, y un método para predecir la progresión de un FRA, mediante la detección y/o cuantificación de la proteína activadora de gangliósido GM2 (GM2AP). La insuficiencia puede deberse a la administración de, al menos, un agente nefrotóxico, en donde el agente nefrotóxico puede ser un antibiótico aminoglucósido, tal como por ejemplo gentamicina.

Arte previo

10 El fallo renal agudo (FRA) es una condición extremadamente seria que ocurre como resultado de una pérdida brusca de la función excretora del riñón, lo suficiente para impedir la eliminación de la sangre de sustancias de desecho y agua, y el equilibrio electrolítico (Bellomo R, Kellum JA y Ronco C. 2007, Intensive Care Med. 33: 409-13). El FRA puede ser inducido por una amplia variedad de daños que incluyen daños por fármacos, toxinas químicas, hipoxia, obstrucción de las vías urinarias, infecciones, y otros (Binswanger U. 1997, Kidney Blood Press Res., 20: 163). El FRA constituye una enorme carga humana y socio-económica derivada de su alta incidencia y tasa de mortalidad. Se calcula que casi un 1% de las admisiones hospitalarias están asociadas al FRA, y alrededor de un 2-7% de los pacientes hospitalizados con el tiempo desarrollan FRA (Kellum JA y Hoste EA. 2008, Scand J Clin Lab Invest Suppl., 241:6-11).

20 Un factor determinante para un manejo clínico del FRA de mayor éxito es un diagnóstico muy precoz, cuando el daño sea aún tan leve como fuera posible, lo que mejora la eficacia de la recuperación de la lesión (siempre que sea posible), la intervención terapéutica y los resultados del paciente. Como tal, la identificación de biomarcadores más sensibles y más precoces es un objetivo obvio. En la práctica clínica, el FRA es aún diagnosticado cuando la disfunción renal causa síntomas mensurables. Esto se basa habitualmente en la determinación de los niveles de creatinina y urea en sangre. Su concentración en suero aumenta más comúnmente a medida que la GFR (Tasa de filtración glomerular, GFR por sus siglas en inglés) disminuye. Sin embargo, en este estadio, el FRA se vuelve difícil de manejar. Así, las tendencias diagnósticas actuales dirigen sus esfuerzos a detectar eventos patofisiológicos incipientes que tienen lugar en fases tempranas, cuando el daño es menos extenso (Vaidya VS, Ferguson MA y Bonventre JV. 2008, Rev Pharmacol Toxicol., 48:463-93). Entre ellos, la medición de ciertas enzimas celulares presentes en la orina como consecuencia de la ruptura de células tubulares, es actualmente el método más preciso para una detección precoz de FRA que cursa con daño tubular. Estas enzimas incluyen N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG), pero además otras tales como lactatodeshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP) o Gamma glutamil transpeptidasa (GGT). La mayoría de estas enzimas presentan un valor moderado como marcadores urinarios precoces y sensibles para el FRA, en gran parte debido a problemas de estabilidad e inhibición por parte de otros componentes en la orina (Vaidya VS, Ferguson MA y Bonventre JV., 2008, Rev Pharmacol Toxicol., 48:463-93). Con diferencia, la NGA es la mejor caracterizada como un marcador traza de daño renal, aunque aún rara vez se utiliza como un parámetro de análisis rutinario. Nuevos marcadores de la orina se encuentran actualmente en un grado avanzado de validación para el diagnóstico y el pronóstico muy precoz del FRA. Éstos incluyen la molécula de daño renal 1 (KIM-1), la lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (NGAL), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), cistatina C, interleucina 18, proteína de unión al retinol (RBP) y otros.

Otro aspecto importante relacionado con el FRA es la acción de ciertos fármacos potencialmente nefrotóxicos, en dosis sub-tóxicas, para predisponer o sensibilizar a los individuos a sufrir un FRA más fácilmente en respuesta a otras nefrotoxinas. Existe una situación clínica habitual en la que un paciente tratado con un fármaco (por ejemplo, gentamicina), que no muestra signos de enfermedad renal, es sometido o expuesto concomitante o posteriormente a otro agente nefrotóxico, tal como otro fármaco, un contraste diagnóstico, un metal pesado, etc., también dentro de un régimen teóricamente sub-tóxico. Si esto es así, los tratamientos sub-tóxicos con nefrotoxinas constituirían situaciones clínicas relevantes de especial importancia debido a su naturaleza oculta, que debería abordarse desde las perspectivas diagnósticas y terapéuticas. Actualmente, la insuficiencia renal se diagnostica utilizando diferentes parámetros. Por ejemplo, existe un criterio de consenso para el diagnóstico del fallo renal agudo (FRA) que establece diferentes grados de la enfermedad. Este criterio de consenso, denominado con el acrónimo RIFLE (Ricci Z, Cruz D y Ronco C. 2008, Kidney Int., 73: 538-46), se basa en el incremento de creatinina en suero, la disminución de la tasa de filtración glomerular y la disminución del flujo de orina. Para establecer este criterio, es muy importante realizar una gran cantidad de pruebas. El nivel de creatinina en plasma se utiliza como marcador de daño renal. Los riñones saludables extraen la creatinina de la sangre y la colocan en la orina para salir del cuerpo. Cuando los riñones no trabajan bien, la creatinina se acumula en la sangre, pero los valores de creatinina son también variables y pueden estar afectados por la dieta. Otros marcadores para el diagnóstico de insuficiencia renal son el nitrógeno ureico en sangre o la proteinuria.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido ampliamente utilizado en todo el mundo contra las infecciones Gram-negativas. Su eficacia terapéutica y su utilización se encuentran seriamente restringidos por su toxicidad, que tiene lugar principalmente a nivel renal y auditivo (Martínez-Salgado C, López-Hernández FJ y López-Novoa JM. 2007, Toxicol Appl Pharmacol., 223: 86-98). La nefrotoxicidad inducida por gentamicina aparece en el 10-25% de los procesos terapéuticos (Leehey DJ et al., 1993, J. Am. Soc. Nephrol., 4: 81-90). Se caracteriza principalmente por daño tubular (Nakakuki M et al., 1996, Can J Physiol Pharmacol., 74: 104-11), pero alteraciones glomerulares (Martínez-Salgado C, López-Hernández FJ and López-Novoa JM. 2007, Toxicol Appl Pharmacol., 223:86-98) y vasculares (Goto T et al., 2004, Virchows Arch., 444: 362-74; SeÇilmiŞ MA, et al., 2005, Nephron Physiol., 100: 13-20) también podrían aparecer de manera dependiente de la dosis (Hishida A et al., 1994, Ren Fail., 16: 109-16).

10 La proteína activadora de gangliósido GM2 (GM2AP) es una pequeña proteína transportadora de glicolípidos que actúa como un co-factor específico de sustrato para la enzima lisosómica β -hexosaminidasa A. Esta enzima junto con la GM2AP, cataliza la degradación del gangliósido GM2 (un ácido siálico que contiene glicosfingolípidos), y otras moléculas que contienen N-acetil hexosaminas terminales. La GM2AP ha sido relacionada con enfermedades hepáticas, utilizándola como un marcador para el pronóstico de la hepatotoxicidad de algunas hepatotoxinas (US 7469185), pero no con enfermedades renales o con el fallo renal agudo.

El uso de cualquier biomarcador que se exprese de forma precoz en el fallo renal agudo o en el daño renal, puede ser una herramienta de utilidad para determinar el riesgo de cualquier paciente de sufrir este daño. Esta herramienta podría además ser utilizada, entre otras muchas posibles aplicaciones, para modificar la administración de cualquier fármaco a cualquier individuo para prevenir el empeoramiento de la salud de dicho individuo.

20 Resumen de la invención

La invención hace referencia a un método para determinar el riesgo de desarrollar fallo renal agudo (FRA) en un individuo, o para determinar un FRA, y un método para predecir la progresión de un FRA, mediante la detección y/o cuantificación de la proteína activadora de gangliósido GM2 (GM2AP). La insuficiencia puede deberse a la administración de, al menos, un agente nefrotóxico, en donde el agente nefrotóxico puede ser un antibiótico aminoglucósido, como por ejemplo gentamicina.

La presente invención proporciona evidencia de que la predisposición al FRA inducido por gentamicina se correlaciona con un aumento en la excreción de la proteína GM2AP. Los ejemplos enfatizan más aún la utilidad de la GM2AP como un marcador urinario potencial de la predisposición al FRA inducido por gentamicina.

30 Por lo tanto, la presente invención proporciona herramientas para mejorar la detección de un FRA y, además, la posibilidad de determinar el riesgo de desarrollar FRA. Una consecuencia de estas posibilidades es la predicción de la progresión de un FRA, es decir, la monitorización de la progresión del FRA cuando el individuo es tratado con, por ejemplo, pero sin limitarse a, sustancias terapéuticas, o cuando el individuo es expuesto a cualquier condición o agente que tenga o no un claro efecto nefrotóxico.

35 La mejora citada anteriormente en la detección de un FRA mediante la detección y/o cuantificación de la GM2AP es clara a partir de los métodos citados en el arte previo, como por ejemplo, determinar la concentración de creatinina en plasma, nitrógeno ureico en sangre (BUN, por sus siglas en inglés), excreción urinaria de proteínas tales por ejemplo N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG). Esta evidencia se muestra en los ejemplos.

Además, la presente invención enfatiza diversos efectos inesperados o sorprendentes:

40 - Por un lado, la detección de la GM2AP en las muestras de orina supone una ventaja adicional para el paciente ya que la evacuación de este fluido es un hecho fisiológico necesario que ocurre habitualmente. Esto supone una toma de muestras no agresiva en el individuo.

45 - Por otro lado, la administración de un régimen sub-tóxico de un antibiótico aminoglucósido (gentamicina) a ratas, predispone a los individuos tratados con un segundo agente nefrotóxico, por ejemplo nitrato de uranilo, a un FRA y esta predisposición puede ser detectada mediante la presencia de GM2AP en la orina. Este hecho fue demostrado verificando concentraciones más elevadas de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN), en la sangre o la excreción urinaria de proteínas de las ratas expuestas a estas toxinas con respecto a las ratas tratadas con un placebo. En la presente invención se demuestra además que el co-tratamiento con ambos compuestos produjeron un aumento en la concentración de creatinina en plasma, tanto como cuando se administran gentamicina y nitrato de uranilo de forma secuencial, y ambas administraciones se separaron por un periodo de descanso.

50 - Además, la proteína GM2AP puede ser detectada en una muestra de orina de un individuo desde el primer día de tratamiento con un régimen tóxico de gentamicina (en la presente invención en las ratas la dosis empleada es de 150 mg/kg/día), mientras que los otros marcadores de insuficiencia renal: creatinina, NAG, proteinuria, KIM-1 o PAI-1, son detectados en el cuarto día en la misma muestra de orina.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención hace referencia a un método para proporcionar datos para la determinación del riesgo de desarrollar FRA, o para la determinación del FRA, en un individuo que comprende la detección y/o cuantificación de una proteína al menos un 70% o 100% idéntica a la SEQ ID NO:1, en una muestra biológica aislada de un individuo (sujeto).

- 5 El término “% idéntica” tal como se entiende en la presente invención, hace referencia al % de identidad entre dos secuencias de aminoácidos. El % de identidad es un conteo del número de posiciones a lo largo del alineamiento de dos secuencias en las que todos los aminoácidos en esa posición son idénticos.

La proteína detectada y/o cuantificada puede ser al menos un 70, 75, 80, 85, 90 o 95% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

- 10 En un modo de realización preferido, la proteína detectada y/o cuantificada puede ser al menos un 70% idéntica a la SEQ ID NO: 1. En una realización de mayor preferencia, la proteína citada es la SEQ ID NO: 1.

- 15 El término FRA tal como se entiende en la presente invención, hace referencia a un fallo renal agudo en cualquier etapa (o gravedad) de una disfunción renal, o el término FRA también hace referencia a un daño renal agudo. El FRA puede ser ocasionado por un daño en el riñón o por cualquier daño o enfermedad cuyo origen pueda ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, genético, inmune, isquémico o el tratamiento con cualquier fármaco. El daño del riñón o cualquier daño o enfermedad mencionada anteriormente, puede ser también producido por un procedimiento quirúrgico, por ejemplo, pero sin limitarse a, en el riñón, próstata, vejiga, uréter o uretra.

El método proporciona datos para determinar el riesgo de desarrollar fallo renal agudo (FRA), o para determinar el FRA, en un individuo. La última etapa del riesgo de desarrollar un FRA es el FRA, y por lo tanto, el método es útil para ambas condiciones de un FRA en un individuo.

- 20 La secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteína GM2AP en *Homo sapiens* (humanos), número de acceso CAA43994.

- 25 Las proteínas (secuencias de aminoácidos) con al menos un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, son isoformas o secuencias de aminoácidos que son homólogas a la SEQ ID NO: 1 en diversos animales. El método de la presente invención puede ser aplicado para usos veterinarios. Los usos veterinarios pueden ser aplicados a organismos vertebrados como por ejemplo, pero sin limitarse a, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Felis catus* o *Canis lupus familiaris*. El organismo vertebrado puede además ser una especie de pez debido a su interés en piscicultura. Este porcentaje de identidad ha sido elegido de acuerdo con un Blastp del Centro Nacional para la información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ver la tabla 1).

- 30 Tabla 1. Porcentaje de identidad de diversas secuencias homólogas de la SEQ ID NO: 1 de diferentes organismos con respecto a dicha secuencia SEQ ID NO: 1 (*Homo sapiens*). Los números de acceso de las secuencias citadas utilizadas en esta tabla son:

- 35 *Homo sapiens* (CAA43994), *Ratus norvegicus* (BAC24018), *Mus musculus* (NP_034429), *Equus caballus* (NP_001075381), *Bos taurus* (XP_580665), *Felis catus* (AAS64350), *Canis lupus familiaris* (XP_536462), *Salmo salar* (ACN11254), *Tribolium castaneum* (XP_973964), *Hydra magnipapillata* (XP_002157755).

Especie 1	Especie 2	% Identidad
<i>Homo sapiens</i>	<i>Ratus norvegicus</i>	72
	<i>Mus musculus</i>	72
	<i>Equus caballus</i>	71
	<i>Bos taurus</i>	65
	<i>Felis catus</i>	68
	<i>Canis lupus familiaris</i>	57
	<i>Salmo salar</i>	54
	<i>Tribolium castaneum (gorgojo)</i>	32
	<i>Hydra magnipapillata</i>	30

El término "proteína/s de la presente invención" o "proteína/s de la invención" se utilizarán de aquí en adelante para hacer referencia a cualquiera de las proteínas con al menos un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o con la SEQ ID NO: 1 o cualquier fragmento de la misma.

- 5 Para detectar y/o cuantificar la proteína de la presente invención es suficiente detectar uno o más fragmentos de dicha proteína, ya que el fragmento es un constituyente de la secuencia de aminoácidos y estructura de la proteína.

El método hace referencia a la detección y cuantificación de la proteína de la presente invención o a su detección o a su cuantificación.

- 10 La proteína de la presente invención es el producto de la expresión de una secuencia de nucleótidos. Esta secuencia de nucleótidos puede ser cualquier ARN como por ejemplo, pero sin limitarse a, ARN mensajero (ARNm), o un fragmento del mismo. Esta secuencia de nucleótidos puede además ser ADN complementario (ADNc) o un fragmento del mismo. El ADNc es ADN complementario a un ARNm o es además la secuencia de nucleótidos que comprende exones de una secuencia genómica, pero no intrones, es decir, la secuencia de codificación. La transcripción tanto de la secuencia genómica de un gen como de su ADNc codifican para el mismo ARNm y, por lo tanto, codifican para la misma proteína. En la presente invención es además posible detectar cualquier ARN o cualquier ADN, o un fragmento del mismo, en lugar de la proteína o al mismo tiempo que ésta.

- 20 Otro modo de realización preferido hace referencia al método previo que comprende, además, una etapa para comparar los datos obtenidos con valores estándar, para hallar cualquier desviación significativa. El término "valores estándar" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a, por ejemplo, pero sin limitarse a, datos sobre la detección y/o cuantificación de la proteína de la presente invención, o un fragmento de la misma, en una muestra biológica obtenida de un individuo que no desarrolla un FRA.

- 25 El término "desviación significativa" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a la presencia de la proteína en la muestra aislada, o a una concentración más elevada de la proteína de la invención en la muestra aislada con respecto a una muestra de un individuo sano, es decir, un control negativo para enfermedad renal. El individuo sano se determina mediante la medición del nivel de uno o más marcadores de enfermedad renal. El marcador común es, pero no se limita a, creatinina, nitrógeno ureico en sangre o proteinuria.

- 30 En otro modo de realización preferido de la presente invención, el método comprende, además, la atribución de la desviación significativa al riesgo de desarrollar FRA, o al desarrollo de un FRA, en el individuo. Por lo tanto, esta realización preferida es un método para diagnosticar un FRA o para determinar el riesgo de desarrollar fallo renal agudo (FRA).

La muestra biológica es una muestra aislada a partir de un organismo tal como un organismo humano o animal, que puede proceder de un fluido fisiológico y/o cualquier tejido celular de un organismo.

- 35 El término "riesgo de desarrollar FRA" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a la predisposición de un individuo de sufrir o desarrollar un FRA. Por tanto, el método hace referencia a proporcionar datos de utilidad para determinar si un individuo está desarrollando o puede desarrollar un FRA. Con los ejemplos se demuestra que la proteína GM2AP (SEQ ID NO: 1) puede ser detectada en una etapa muy temprana de un FRA, y esto puede permitir la detección de un FRA en fase temprana como un riesgo de desarrollar FRA.

- 40 En un modo de realización preferido adicional de la presente invención, la proteína de la presente invención, puede ser detectada y/o cuantificada mediante métodos tales como, pero sin limitarse a, electroforesis, inmunoensayo, cromatografía y/o tecnologías de microarray (micromatriz). La detección y/o cuantificación de la proteína de la invención puede ser realizada mediante la combinación de cualquiera de las técnicas anteriores o cualquier combinación de las mismas. La proteína puede ser detectada evaluando su presencia o ausencia. La detección puede llevarse a cabo mediante el reconocimiento específico de cualquier fragmento de la misma mediante cualquier sonda y/o anticuerpo. Además, la proteína detectada de la invención puede ser cuantificada de manera que sirva de referencia para comparar estos datos con valore estándar para hallar cualquier desviación significativa. Esta desviación puede ser interpretada como un riesgo de desarrollar fallo renal agudo o como la presencia de un FRA. En un modo de realización preferido, la proteína de la invención puede ser detectada y/o cuantificada mediante electroforesis y/o inmunoensayo.

- 50 La electroforesis es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macro-moléculas disueltas en un medio (tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte sólido como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética, y esta movilidad depende de la carga, tamaño y forma. Existen numerosas variaciones de esta técnica basadas en el equipo utilizado, soportes y condiciones físico-químicas para realizar la separación. La electroforesis se selecciona

de la lista que comprende electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque (electrofocalización), o electroforesis bidimensional.

Un inmunoensayo es una prueba bioquímica que mide la concentración de una sustancia en un líquido biológico que utiliza la reacción de un anticuerpo o anticuerpos a su antígeno. El ensayo aprovecha la unión específica de un anticuerpo a su antígeno. Detectar la cantidad de anticuerpo o antígeno puede lograrse mediante una variedad de métodos. Uno de los más comunes es marcar el antígeno o bien el anticuerpo. El marcador puede comprender, pero no se limita a, una enzima, radioisótopos (radioinmunoensayo), marcadores magnéticos (inmunoensayo magnético) o fluorescencia, y además otras técnicas que incluyen aglutinación, nefelometría, turbidimetría o análisis de inmunotransferencia o Western Blot. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. El inmunoensayo puede ser competitivo: la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra, o puede ser no competitivo (también denominado como "ensayo tipo sándwich"): los resultados son directamente proporcionales a la concentración del antígeno. Una técnica de inmunoensayo que puede ser utilizada en la presente invención es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés).

Mediante técnicas de cromatografía, las moléculas pueden ser separadas en base a sus cargas, tamaños o masa molecular, a través de su polaridad o su potencial redox, entre otros. La técnica cromatográfica puede ser, pero no se limita a, cromatografía de líquidos (cromatografía de partición, cromatografía de adsorción, cromatografía de exclusión o cromatografía de intercambio iónico), cromatografía de gases o cromatografía de fluidos supercríticos.

Las tecnologías de microarray de la presente invención se basan, por ejemplo, en la fijación en un soporte sólido de una molécula que reconozca la proteína de la presente invención. El microarray de anticuerpos es el microarray de proteínas más habitual. En este caso, los anticuerpos se colocan y se fijan en el chip de proteínas (soporte sólido) y se utilizan como moléculas de captura para detectar proteínas a partir de, pero sin limitarse a, muestras biológicas, lisados de células, suero u orina. El término "soporte sólido" tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una gran variedad de materiales, por ejemplo, resina de intercambio iónico o adsorción, vidrio, plástico, látex, nailon, gel, ésteres de celulosa, esferas paramagnéticas o la combinación de algunas de ellas, pero sin limitarse a dichos materiales previamente mencionados.

En otro modo de realización preferido, la muestra biológica de cualquiera de los métodos de la presente invención es un fluido corporal. El fluido corporal puede incluir fluidos que son excretados o secretados del cuerpo de un animal, además de fluidos que no lo son habitualmente. El fluido corporal puede ser, pero no se limita a, el fluido amniótico que rodea a un feto, humor acuoso, sangre, plasma sanguíneo, líquido intersticial, linfa, leche materna, moco (incluyendo drenaje nasal y flema), saliva, sebo (aceite de la piel), suero, sudor, lágrimas u orina. La proteína de la presente invención puede estar presente, en cualquier compartimento biológico, en el mencionado fluido corporal como por ejemplo, pero sin limitarse a, una célula o vesícula. En un modo de realización de mayor preferencia, el fluido corporal es orina.

Un modo de realización preferido adicional de la presente invención hace referencia al método en el cual el riesgo de desarrollar FRA, o el FRA, se debe a la administración de o exposición a, al menos, un agente nefrotóxico. Este agente nefrotóxico puede causar una o más patologías renales debido al nivel de administración o exposición que puede ser durante un largo periodo de tiempo o estar limitado a un único evento, y puede deberse a un único o a múltiples compuestos. Las circunstancias de la exposición pueden ser involuntarias, accidentales, sobredosis intencional o necesidad terapéutica (administración). El riñón es el principal órgano de excreción y debido a que mantiene la homeostasis para las moléculas solubles en agua, puede concentrar ciertas sustancias de forma activa. En general, los túbulos y el urotelio pueden ser reparados, pero los glomérulos y la médula pueden presentar una facilidad de reparación significativamente inferior.

El agente nefrotóxico, cuando se administra, puede ser una composición farmacéutica (sustancia terapéutica) o, pero sin limitarse a, un anestésico halogenado o un compuesto que esté incluido en una comida funcional, o en un complemento vitamínico, o en un complemento nutricional. El agente nefrotóxico, cuando el individuo es expuesto, puede ser además una sustancia química tal como, pero sin limitarse a, un metal pesado, pesticida o antimicrobiano. El pesticida puede ser, pero sin limitarse a, un fungicida, un herbicida, un insecticida, un algicida, un molusquicida, acaricida o rodenticida. El insecticida puede ser, pero sin limitarse a, un germicida, un antibiótico, un antibacteriano, un antiviral, un antimicótico, un antiprotazoario o un agente antiparasitario.

En un modo de realización preferido adicional de cualquiera de los métodos de la presente invención, el agente nefrotóxico es un antibiótico aminoglucósido. Los aminoglucósidos trabajan, por ejemplo, uniéndose a las subunidades ribosómicas bacterianas 30S o 50S, inhibiendo la translocación de peptidil-ARNt y además causando una lectura errónea del ARNm, lo que deja a la bacteria incapaz de sintetizar proteínas vitales para su crecimiento. El antibiótico aminoglucósido puede ser, pero sin limitarse a, amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodostreptomocina, estreptomocina, tobramicina, apramicina, espectinomocina, higromicina B, verdamicina, astromicina o puromicina. En una realización de mayor preferencia, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina.

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro comúnmente utilizado para tratar infecciones de bacterias aeróbicas Gram negativas. Los aminoglucósidos se absorben mal con una administración por vía oral, pero son excretados rápidamente por los riñones. Por otra parte, los aminoglucósidos se difunden en las células bacterianas a través de canales de porinas en la membrana externa y son a continuación transportados a través del citoplasma. Como resultado, la gentamicina actúa interfiriendo con la síntesis de proteínas bacterianas pero la gentamicina puede causar daño renal en el túbulo convoluto proximal, particularmente en los segmentos S1 o S2, lo que puede convertirse en un FRA.

Tal como se demuestra en la presente invención, un FRA puede deberse, además, a la administración de manera simultánea o secuencial de un segundo agente nefrotóxico. Este segundo compuesto puede ser nitrato de uranilo. Tal como se ha citado en los ejemplos, un régimen sub-tóxico con gentamicina predispone a un individuo al desarrollo de un FRA, ya que cuando se administra un segundo agente nefrotóxico (como por ejemplo nitrato de uranilo) en una dosis sub-tóxica, tiene lugar un efecto tóxico renal. Este efecto tóxico renal se demuestra tan solo añadiendo una única dosis de nitrato de uranilo, en comparación con una única dosis de una solución salina, inmediatamente después de una única dosis de gentamicina. Este efecto nefrotóxico se demuestra midiendo la concentración de creatinina en plasma, el nitrógeno ureico en sangre (BUN), la excreción urinaria de las proteínas totales o proteína específica (N-acetil-glucosaminidasa: NAG), o el aclaramiento de creatinina.

El término "dosis sub-tóxica" tal como se entiende en la presente invención, hace referencia a una o más dosis administradas en cualquier régimen en un individuo, de tal manera que el nivel de uno o más marcadores comunes de enfermedad renal no muestren una desviación significativa con respecto a los niveles de un control negativo para enfermedad renal. El marcador común puede ser, pero sin limitarse a, creatinina, nitrógeno ureico en sangre o proteinuria.

En la presente invención se demuestra además que el co-tratamiento de los individuos simultáneamente con ambos compuestos (gentamicina y nitrato de uranilo) causa un aumento de la concentración en la creatinina en plasma, además de cuando ambos compuestos se administran secuencialmente, ambas administraciones separadas por un periodo de descanso, por ejemplo, una semana.

La proteína de la presente invención también es detectada en la orina cuando los individuos son tratados con otros fármacos nefrotóxicos tales como un agente anti-tumoral, por ejemplo, pero sin limitarse a, cisplatino. La proteína de la invención se detecta además cuando los individuos son tratados únicamente con nitrato de uranilo.

El cisplatino es un agente antitumoral de amplio espectro que se utiliza comúnmente para tratar tumores de los testículos, ovarios, vejiga, piel, cabeza y cuello, y pulmones. El cisplatino se difunde en las células y funciona mediante entrecruzamiento intrahebra e interhebra del ADN que es letal para las células. El nitrato de uranilo es un agente altamente nefrotóxico que causa insuficiencia renal grave y necrosis tubular aguda. Otros órganos diana incluyen el hígado, los pulmones o el cerebro.

En otro modo de realización preferido del método de la presente invención, la proteína de la invención se detecta después de 12 horas desde el comienzo de la administración o exposición al agente nefrotóxico. Por lo tanto, la proteína de la presente invención puede ser utilizada como un marcador precoz del fallo renal agudo, principalmente, pero sin limitarse a, cuando el FRA se debe a la administración de, al menos, el antibiótico aminoglucósido gentamicina. En este caso, tal como se demuestra en los ejemplos, cuando se administró gentamicina a ratas durante 7 días con 150 mg/kg/día, la evolución de la concentración de creatinina en plasma, el aclaramiento de creatinina, excreción de NAG, proteinuria y los niveles urinarios de la molécula de daño renal 1 (KIM-1) y el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), se vieron incrementados de manera significativa desde el cuarto día, mientras que la proteína SEQ ID NO: 1 se detectó al menos tres días antes de la aparición del efecto tóxico. En una muestra de orina de un individuo, la aparición del efecto tóxico se detecta mediante la medición de los parámetros citados anteriormente.

En otro modo de realización preferido, la proteína de la presente invención puede ser detectada a partir de 24 horas desde el comienzo de la administración o exposición al agente nefrotóxico. Tal como se muestra en los ejemplos, tras las primeras 24 horas desde el comienzo de la administración de gentamicina (150 mg/kg/día), la proteína se detecta con un nivel lo suficientemente claro mediante un ensayo Western blot.

Un segundo aspecto de la presente invención hace referencia a un método de predicción de la progresión de un FRA debido a la administración de o exposición a, al menos, un agente nefrotóxico, que comprende (a) determinar una primera concentración de una proteína que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID NO: 1, en un fluido corporal aislado de un individuo expuesto o no al agente nefrotóxico, (b) determinar una segunda concentración de la proteína de la invención en un fluido corporal aislado del individuo de (a) después de determinar la primera concentración de la citada proteína en el individuo expuesto, o después de la iniciación de la administración o exposición al agente nefrotóxico en un individuo no expuesto. Es decir, si la determinación de la primera concentración se lleva a cabo en una muestra de un individuo expuesto al agente nefrotóxico, la segunda se determina después de la determinación de la primera concentración, y si la determinación de la primera

5 concentración se lleva a cabo en una muestra de un individuo sin exposición al agente nefrotóxico, la segunda se determina después de la iniciación de la administración o exposición al agente nefrotóxico en un individuo no expuesto. Entonces, dicha segunda concentración se compara con dicha primera concentración en busca de cualquier desviación significativa. La desviación significativa puede ser en el sentido de valores incrementados o reducidos cuando dicha segunda concentración se compara con dicha primera concentración, o cuando cualquier desviación significativa se compare con una determinación previa de la concentración.

En la presente invención, el término “predicción de la progresión” tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una conclusión de la monitorización de la progresión de un FRA, es decir, la manifestación sobre la progresión de esta patología.

10 Un modo de realización preferida de la presente invención hace referencia al método para predecir la progresión de un FRA debido a la administración de o exposición a, al menos, un agente nefrotóxico, en donde dicha proteína es SEQ ID NO: 1.

15 En otro modo de realización del método para predecir la progresión de un FRA, el agente nefrotóxico es un antibiótico aminoglucósido y, en un modo de realización de mayor preferencia, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina.

Un modo de realización preferido adicional hace referencia a cualquiera de los métodos para predecir la progresión de un FRA, en donde el fluido corporal es orina.

20 Para hacer referencia a cualquiera de los métodos para proporcionar datos útiles para determinar el riesgo de desarrollar fallo renal agudo (FRA), o para determinar un FRA, o a cualquiera de los métodos para predecir la progresión de un FRA, se utilizará el término “método/s de la presente invención” o “método/s de la invención”.

Según una realización adicional preferida, el individuo del método de la presente invención es un humano. A pesar de lo mencionado anteriormente, el individuo del método de la invención puede ser un animal ya que el citado método puede ser de utilidad para usos veterinarios.

25 La población celular que sufre el daño o lesión, expuesta o no a un compuesto, puede ser sometida a ensayo *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la población celular de células renales recién aisladas, en particular células renales de rata. En otro formato de ensayo, la exposición *in vivo* puede lograrse mediante la administración del agente nefrotóxico a un animal vivo, por ejemplo una rata de laboratorio.

30 Un tercer aspecto de la presente invención hace referencia al uso de una proteína al menos un 70% idéntica a SEQ ID NO: 1, como biomarcador para determinar el riesgo de desarrollar un FRA, o para determinar un FRA, o para predecir la progresión de un FRA.

35 Este biomarcador indica un cambio en la expresión o el estado de una proteína que se correlaciona con el riesgo o progresión de un FRA, o con la susceptibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado, o se correlaciona también con la presencia de un FRA en un individuo. Una vez que un biomarcador propuesto ha sido validado, puede ser utilizado para diagnosticar el riesgo de enfermedad, la presencia de una enfermedad en un individuo, o para diseñar tratamientos para la enfermedad en un individuo, por ejemplo, elecciones de tratamiento farmacológico o regímenes de administración. Si un tratamiento modifica la presencia o cantidad detectada del biomarcador, lo que tiene una conexión directa con el riesgo de sufrir un FRA, el biomarcador sirve como un informador para modificar cualquier tratamiento o exposición a cualquier agente nefrotóxico.

Un modo de realización preferido hace referencia al uso, en donde dicha proteína es SEQ ID NO: 1.

40 Un modo de realización preferido hace referencia al uso de la proteína de la presente invención, en donde el riesgo de desarrollar FRA, o el FRA, o la progresión de un FRA se debe a la administración de, al menos, un agente nefrotóxico. En una realización adicional preferida, el agente nefrotóxico es un antibiótico aminoglucósido, por ejemplo, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina.

45 Un aspecto aún adicional de la presente invención es un kit para proporcionar datos útiles para determinar el riesgo de desarrollar FRA en un individuo, o para determinar FRA (diagnosticar un FRA), o para predecir la progresión de un FRA en el individuo, que comprende reactivos para llevar a cabo cualquier método de la presente invención. Los reactivos permitirían la detección de la proteína de la invención y/o su cuantificación. Este kit además puede comprender soluciones de detección.

50 Un modo de realización preferido de la presente invención es un kit tal como se describe anteriormente, en donde el reactivo es, al menos, una o más sondas para reconocer una proteína al menos un 70% idéntica a la SEQ ID NO: 1. Una sonda es una sustancia habitualmente marcada (pero no necesariamente) y utilizada para detectar, identificar

y/o cuantificar la proteína de la presente invención o cualquier fragmento de la misma. La sonda puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo.

Un modo de realización preferido hace referencia al kit, en donde la proteína es SEQ ID NO: 1.

5 Un modo de realización preferido hace referencia a un kit, en donde las sondas están unidas a un soporte sólido. Este soporte sólido es preferiblemente un gel, por ejemplo, un gel de agarosa o poliacrilamida.

En un modo de realización de mayor preferencia, las sondas son anticuerpos utilizados para reconocer la proteína de la presente invención o un fragmento de la misma. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. En aún una realización de mayor preferencia, el fragmento de la proteína que es reconocido por los anticuerpos es SEQ ID NO: 2.

10 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que se entiende habitualmente por un experto habitual en el arte al que pertenece la presente invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención. En toda la descripción y en las reivindicaciones la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán obvios para los expertos en el arte al examinar la descripción, o pueden ser aprendidos mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos, figuras y listado de secuencias se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

20 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, y de acuerdo con algunos ejemplos de realización preferidos, se incluyen unas figuras donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Muestra la tasa de supervivencia (A) y la evolución del peso corporal (B) de ratas tratadas durante 7 días con suero fisiológico (0,9% de NaCl, n=19) o gentamicina (50 o 150 mg/kg/día, n=42 y n=15 respectivamente). Los datos representan el error estándar medio \pm .

Figura 2. Muestra la caracterización de la función renal.

30 (A) concentración de creatinina en plasma, (B) nitrógeno ureico en sangre (BUN), (C) diariamente, excreción de proteínas en orina, y (D) diariamente, excreción urinaria de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG), de ratas tratadas durante 7 días con suero fisiológico (0,9% NaCl, C) o gentamicina (50 o 150 mg/kg/día, respectivamente G-50 y G-150). Los datos representan el error estándar medio \pm . *Control*: $n_{crea}=46$, $n_{BUN}=38$, $n_{prot}=25$, $n_{NAG}=12$; *50 mg/kg/día gentamicina*: $n_{crea}=57$, $n_{BUN}=49$, $n_{prot}=25$, $n_{NAG}=11$; y *150 mg/kg/día gentamicina*: $n_{crea}=18$, $n_{BUN}=4$, $n_{prot}=7$, $n_{NAG}=7$. ● $p<0,05$ versus grupo de control; ● $p<0,05$ versus grupo G-50.

Figura 3. Muestra las imágenes representativas (100x) de cortes histológicos con tinción con hematoxilina y eosina de los riñones de las ratas tras 7 días de tratamiento con suero salino fisiológico (Control), gentamicina 50 mg/kg/día (G-50) y 150 mg/kg/día (G-150).

Figura 4. Muestra la expresión renal de los marcadores relacionados con daño y reparación tisular. Imágenes de Western blot representativas de los niveles renales del inhibidor activador de plasminógeno-1 (PAI-1), molécula de daño renal-1 (KIM-1) y vimentina, en homogenizados de tejido renal de ratas tratadas durante 7 días con suero salino (0,9% NaCl, C) o gentamicina (50 o 150 mg/kg/día, respectivamente G-50 y G-150). Los experimentos se realizaron con muestras procedentes de tres animales (1-3) de cada grupo, seleccionados aleatoriamente.

Figura 5. Muestra la evolución de la concentración de creatinina en plasma (panel superior) y la concentración de nitrógeno ureico en sangre (BUN) (panel inferior) en ratas tratadas con suero salino (0,9% NaCl) o gentamicina (50 mg/kg/día) durante 7 días, inmediatamente después de lo cual recibieron una única, dosis sub-tóxica de nitrato de uranilo (NU, 0,5 mg/kg), o suero salino (ver la parte inferior de la figura). La creatinina en plasma y el BUN fueron monitorizados a lo largo del experimento, hasta seis días después de la administración de UN. Los datos representan el error estándar medio \pm de las muestras procedentes de 6 animales por grupo. ● $p<0,05$ versus grupo de control; ○ $p<0,05$ versus el grupo de NU; ■ $p<0,05$ versus el grupo de G-50.

Figura 6. Muestra la evolución de la excreción urinaria de proteínas (panel superior izquierda) en ratas tratadas durante 7 días con suero salino (0,9% NaCl) o gentamicina (50 mg/kg/día) durante 7 días, inmediatamente después de lo cual recibieron una única, dosis sub-tóxica de nitrato de uranilo (NU, 0,5 mg/kg, ver panel inferior izquierdo).

Los paneles centrales y de la derecha muestran, respectivamente, la excreción urinaria de N-acetil-glucosaminidasa (NAG) y el aclaramiento de creatinina en el día 11 (6 días después de la administración de NU) de los mismos animales. Los datos representan el error estándar medio \pm de las muestras procedentes de 3-9 animales por condición. ● $p < 0,05$ versus grupo de UN; UA: unidades arbitrarias.

5 Figura 7. Muestra la evolución de la concentración de creatinina en plasma de (i) ratas tratadas con gentamicina (50 mg/kg/día) más una única dosis de nitrato de uranilo (0,5 mg/kg) administrados junto con la primera dosis de gentamicina (círculos en negro), y (ii) ratas tratadas con gentamicina (50/kg/día) durante 7 días. Después del séptimo día, el tratamiento se suspendió durante otros siete días, tras lo cual se administró una única dosis de nitrato de uranilo (0,5 mg/kg) (círculos huecos, ver el panel inferior para la representación del protocolo). Los datos
10 representan el error estándar medio \pm de las muestras de 6 animales por grupo.

Figura 8. Muestra una electroforesis 2D representativa de proteínas de la orina de ratas tratadas durante 7 días con suero salino (0,9% NaCl, Control) o gentamicina (50 mg/kg/día). Los experimentos se realizaron con muestras de orina procedentes de 4 animales de cada grupo (cada muestra por duplicado).

15 Figura 9. Muestra el nivel de proteína activadora de GM2 en la orina procedente de 4 ratas seleccionadas de manera aleatoria tratadas durante 7 días con suero salino (0,9% NaCl, Control) y cuatro ratas seleccionadas aleatoriamente tratadas durante el mismo periodo de tiempo con 50 mg/kg/día de gentamicina. Como control de insuficiencia renal manifiesta, se muestra también una muestra procedente de una rata tratada durante 7 días con 150 mg/kg/día de gentamicina.

20 Figura 10. Muestra una imagen de un análisis de Western blot con el nivel de la proteína activadora de GM2 en la orina de 4 ratas tratadas con una única dosis nefrotóxica de nitrato de uranilo (5 mg/kg, NU), de 4 ratas tratadas con dos dosis de cisplatino (10 mg/kg) en los días primero y tercero, o de 4 ratas tratadas con suero salino (0,9% NaCl, Control). Las orinas se recogieron 4 días después del comienzo del tratamiento. Además, se muestran los valores individuales de concentración de creatinina en plasma (Cr_{pl} , mg/dL).

25 Figura 11. Muestra la evolución de marcadores del efecto nefrotóxico de la nefrotoxicidad: concentración de creatinina en plasma, aclaramiento de creatinina, excreción de N-acetil-glucosaminidasa (NAG), proteinuria, y niveles urinarios de la molécula de daño renal- 1 (KIM-1), inhibidor del activador de plasminógeno- 1 (PAI-1) y proteína activadora de GM2 (GM2AP), en ratas tratadas durante 7 días con gentamicina (150 mg/kg/día). Los datos son el error estándar medio \pm de las muestras procedentes de 6 animales. Las imágenes son representativas de experimentos realizados con las muestras de 3 animales diferentes.

30 Figura 12. Muestra el nivel de la proteína activadora de GM2 (GM2AP) en la orina de 8 humanos no tratados y 8 tratados con gentamicina.

Su género, edad, peso corporal, concentración de creatinina en plasma, concentración de urea en plasma, y las estimaciones MDRD (mL/min) y Cockcroft-Gault (mL/min) del aclaramiento de creatinina también se muestran (cuando se conocen).

35 Ejemplos

Los siguientes ejemplos proporcionan una descripción, de carácter ilustrativo y no limitativo, de algunos de los ensayos y condiciones operativas reivindicadas en la lista que se aporta más adelante que hace referencia a la detección de la GM2AP y su uso como un biomarcador para detectar FRA y el riesgo de un fallo renal agudo.

Ejemplo 1. Métodos y reactivos.

40 1.1. Animales y protocolo experimental.

Ratas Wistar hembra, de crianza propia que pesan 190-230 g se dividieron en los siguientes grupos experimentales (figura 1): Control: ratas tratadas por vía intraperitoneal (i.p.) durante 7-13 días con suero salino (0,9% NaCl), una vez al día. (ii) G-50: ratas tratadas con 50 mg/kg/día de gentamicina durante 6 días. (iii) G-50-UN: ratas tratadas con 50 mg/kg/día de gentamicina durante 6 días, y en el séptimo día tratadas con una única dosis i.p. de 0,5 mg/kg de nitrato de uranilo. (iv) UN: ratas tratadas i.p. con suero salino (0.9% NaCl) una vez al día durante 6 días, y en el séptimo día tratadas con una única dosis i.p. de 0,5 de nitrato de uranilo. (v) G50+UN: ratas tratadas con 50 mg/kg/día de gentamicina durante 6 días, y en el primer día tratadas con una única dosis i.p. de 0,5 mg/kg de nitrato de uranilo. (vi) G-50-r-NU: ratas tratadas con 50 mg/kg/día de gentamicina durante 6 días, que se dejan sin tratamiento durante una semana, y se tratan entonces con una única dosis i.p. de 0,5 mg/kg de nitrato de uranilo.
50 (vii) G-150: ratas tratadas con 150 mg/kg/día de gentamicina durante 6 días.

Durante todo el experimento, las ratas se colocaron individualmente en jaulas metabólicas bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. Se dejó que los animales comieran la comida habitual y bebieran agua de forma libre. En diferentes momentos, se obtuvieron muestras de sangre y orina de 24 horas. La orina se recogió en vasos graduados complementados con 100 μ L de 0,1% de azida de sodio y 1 ml de aceite para evitar la contaminación y la evaporación, respectivamente. Posteriormente, la orina se depuró mediante centrifugación a 1.175 x g, se alícuota y almacena a -80 °C. La sangre se extrajo a partir de una pequeña incisión en la cola y se recogió en tubos capilares heparinizados. Estos fueron inmediatamente centrifugados a 12.000 x g y se almacenó el plasma a -80 °C. Al final del experimento, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (10 mg/kg). El riñón derecho y una mitad del izquierdo se congelaron rápidamente mediante inmersión en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C. Finalmente, se utilizaron para estudios mediante Western Blot. Para tal propósito, los tejidos congelados fueron homogeneizados bajo condiciones de congelación mediante trituradora de martillo, hasta que se obtuvo un polvo fino. El polvo también se mantuvo a -80 °C. La segunda mitad del riñón izquierdo se sumergió en 3,7% de paraformaldehído a 4 °C durante 14-16 horas. Después de ello, las muestras de tejido fueron procesadas para sus estudios histoquímicos.

15 1.3 Perfusión *in vivo* de gentamicina.

La gentamicina fue amablemente suministrada por Schering-Plough. El nitrato de uranilo se obtuvo de Sigma. Cuando no se indique lo contrario, todos los demás reactivos fueron adquiridos de Sigma.

Ratas Wistar hembras, de crianza propia con un peso de 190-230 g fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (10 mg/kg). Se introdujo un catéter en la vena yugular derecha y en la vejiga urinaria. Una única dosis de un bolo de 1,5 mL de gentamicina (150 mg/kg) o suero salino ((0,9% NaCl, como control) fueron perfundidos a través de la vena yugular en 1,5 mL durante 30 minutos. Después de esto, la orina se recogió en diferentes puntos de tiempo. La orina se depuró mediante centrifugación (como anteriormente) y se mantuvo a -80 °C para su posterior uso.

20 1.3. Caracterización de la función renal.

La concentración de creatinina en plasma y orina y de nitrógeno ureico en sangre (BUN) se determinó mediante un sistema de análisis automatizado (Reflotron®, Roche Diagnostics, Barcelona, España) y tiras reactivas disponibles comercialmente (Roche Diagnostics, Barcelona, España), utilizando 32 μ L de plasma y orina. Este método tiene un límite inferior de detección de 0,5 mg/dL para la creatinina. Las muestras con una lectura de creatinina por debajo de 0,5 mg/dL se volvieron a someter a ensayo confrontándolas mediante el método colorimétrico de Jaffé (Hervey, 1953. Nature, 171: 1125).

El aclaramiento de creatinina (Cl_{Cr} , mL/min) se calculó utilizando la siguiente ecuación: $Cl_{Cr} = UF \times C_u / C_p$, donde UF es el flujo urinario de 24 horas (expresado en mL/min), C_u es la concentración de creatinina en la orina, y C_p es la concentración plasmática de creatinina.

La concentración de proteínas en la orina (mg/mL) se midió mediante el método de Bradford (39). La excreción diaria de proteínas (mg/día) se obtuvo multiplicando la concentración de proteína en la orina por el flujo de orina de 24 horas (mL/día).

La actividad de NAG en la orina (unidades arbitrarias, UA/mL), como una estimación de la concentración de NAG en la orina, se midió mediante un test enzimático disponible comercialmente (Roche Diagnostics, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad de NAG en la orina se convirtió en excreción de NAG diaria (UA/día) multiplicando la actividad de NAG de la orina por el flujo de orina de 24 horas (mL/día).

40 1.4. Preparación de suero policlonal anti proteína activadora de GM2.

Para la preparación de un suero anti-GM2AP, se inyectaron a conejos blancos de Nueva Zelanda hembra un inmunógeno sintético correspondiente a la secuencia parcial de GM2AP humana y de rata SEQ ID NO: 2, más una cisteína en el extremo amino para permitir la conjugación con la proteína inmunogénica portadora blue carrier (Pierce Biotechnology; Rockford, IL) mediante los entrecruzadores sal sódica del ácido 4-(N-Maleimidometil)ciclohexano-1-carboxílico del éster de 3-sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-SMCC) y N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, ambos de Sigma-Aldrich).

45 1.5. Estudios Inmunohistoquímicos.

Los riñones se mantuvieron en p-formaldehído durante la noche a 4 °C. A continuación, se realizaron bloques de parafina y se cortaron y colorearon secciones de tejido de 5 μ m con hematoxilina y eosina. Se tomaron fotografías bajo un microscopio Olympus BX51 conectado a una cámara digital de color Olympus DP70.

50 1.6. Análisis Western Blot.

Se obtuvieron extractos de proteínas a partir de 100 mg de polvo homogenado de tejido, preparado mediante la homogeneización de los riñones con una mezcladora tisular (Ultra-Turrax T8, IKA®-Werwe) a 4 °C en un tampón de homogeneización (140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7,5, 0,5 M de ácido etilendiaminotetraacético –EDTA-, 10% de glicerol, 1% de Igepal CA-630, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL pepstatina A, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo -PMSF-). Los homogenados de tejido fueron centrifugados a 22.000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes. La concentración de proteína se midió con un kit comercial (BioRad) basado en el método de Lowry. Se separaron 50 µg de proteína total de extractos de tejido o 20 µL de orina depurada de cada muestra mediante electroforesis en 10-15% de geles de acrilamida (Mini Protean II system, BioRad). Inmediatamente, las proteínas fueron transferidas eléctricamente a una membrana Immobilon-P (Millipore). Después de bloquear la membrana para evitar la unión no específica, las membranas se hibridaron con anticuerpos contra KIM-1 (R&D Systems), proteína morfogénica ósea-7 (BMP-7, Santa Cruz Biotechnology), inhibidor del activador del plasminógeno- 1 (PAI-1, BD Biosciences), vimentina (Dako Denmark) y proteína activadora de GM2 (GM2AP, ver arriba).

1.7. Análisis proteómico de la orina.

La orina se concentró y se desaló mediante filtración forzada por centrifugación a través de columnas de corte Amicon Ultra 5 K (Millipore). Se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Las proteínas de la orina se precipitaron con el kit Clean-up (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. Se rehidrataron 100 mg de proteínas de cada muestra en 7 M de urea, 2 M de tiourea, 4% (p/v) Chaps, 0,5% de anfólitos pH 4-7 o 4,5-5,5, 50 mM ditiotreitól (DTT) y azul de bromofenol, y se focalizaron isoelectricamente (500-8.000 V) a través de tiras de gradiente de pH inmovilizadas de 18-cm largo (IPG), pH 4-7 o 4,5-5,5 (GE Healthcare, Madrid, España), utilizando un aparato IPGphor (GE Healthcare). Se pre-equilibraron tiras de IPG durante 15 minutos en un tampón de equilibrado [50 mM Tris-HCl pH=8,8, 6 M urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS), 0,01% (p/v) de azul de bromofenol] que contiene 1% (p/v) de DTT, y otros 15 minutos en un tampón de equilibrado que contiene 2,5% (p/v) de yodoacetamida. A continuación, se transfirieron tiras de IPG a 18-cm de largo, a geles de acrilamida al 12% y se separaron mediante electroforesis con un aparato SE 600 Ruby (GE Healthcare). Los geles se fijaron durante la noche en 30% de etanol, 10% de ácido acético y se coloreó con plata con un kit comercial (GE Healthcare). A menos que se indique de otro modo, todos los reactivos eran de Sigma.

Para la visualización y análisis, se escanearon (Image Scanner, GE Healthcare, Madrid, España) y procesaron geles coloreados y se analizaron estadísticamente con el software Master 2D Platinum 6.0 GE Healthcare, Madrid, España). Se realizó discriminación de puntos con los siguientes parámetros: (i) factor de suavizado: 2; (ii) área mínima: 5 píxeles; (iii) prominencia: 100. El análisis se corrigió para la eliminación de artefactos. Para cada punto individual, se sustrajo el fondo y se normalizó el volumen de intensidad individual por el volumen de intensidad total (intensidad de todos los puntos). Para la comparación del mismo punto entre los geles, se estableció un mínimo de una diferencia del doble de intensidad para considerar una expresión diferencial. Las bandas y puntos de interés de separaciones 1D y 2D (respectivamente) se aislaron de los geles. Cada pieza de gel se deshidrató en acetonitrilo y éste se evaporó con una bomba de vacío y fue resuspendido en NH₄HCO₃. También se evaporaron en vacío fracciones 2D-CF y se resuspendieron los residuos en NH₄HCO₃. De aquí en adelante, las muestras de 1D, 2D y 2D-CF se trataron de forma idéntica. Fueron reducidas con 10 mM DTT en 50 mM NH₄HCO₃ a 56 °C, y alquiladas con yodoacetamida en 50 mM NH₄HCO₃. A continuación, las proteínas fueron digeridas en gel en péptidos con tripsina de porcino (Promega) durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, los péptidos se extrajeron con 0,5 (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). La solución se evaporó en vacío y los péptidos se disolvieron en 0,1% (v/v) de ácido fórmico bajo sonicación. Las soluciones que contenían péptidos se inyectaron en un espectrómetro de masas LC-ESI-QUAD-TOF QSTAR XL (Applied Biosystems) con un 1100 micro HPLC (Agilent). Se utilizó una columna Supelco de poro ancho 150x0,32 mm (5 µm) (Discovery BIO), a una tasa de flujo de 7 µL/min. Se obtuvieron espectros MS/MS. La identificación de proteínas se realizó con el software MASCOT contra base de datos de secuencias de proteínas no redundantes (Swiss Prot y NCBI). La tolerancia de la masa se estableció a 50 ppm, la tolerancia de MS/MS fue de 0,5 Da, y el estado taxonómico fue Rattus. Fueron considerados únicamente los resultados significativos, según se identificaron mediante el análisis de probabilidad MASCOT, y se estableció al menos una coincidencia de un péptido con un valor iónico sobre 20 como el umbral de aceptación. En algunos ejemplos donde el método LC-ESI-QUAD-TOF no produjo una identificación de proteínas no ambigua, o en puntos seleccionados aleatoriamente (para su confirmación), las proteínas fueron identificadas con un espectrómetro de masas MALDI-TOF Ultraflex I (Bruker Daltonics) mediante el Servicio de Proteómica del Centro de Investigación del Cancer of the Universidad de Salamanca-CSIC (Salamanca, España).

Se obtuvieron muestras de orina procedentes de individuos hospitalizados sometidos a un régimen con gentamicina ya en curso durante 2 o 3 días del Hospital Universitario de Salamanca. Como controles, se utilizó la orina de individuos de la misma edad y sexo que no estaban recibiendo gentamicina.

Ejemplo 2. Resultados.

El conjunto de resultados presentados en el presente documento tiene la intención de demostrar que: (i) un régimen de 6 dosis diarias de 50 mg/kg de gentamicina no induce, por ningún parámetro estudiado, ninguna lesión o

disfunción renal; (ii) a pesar de esto, este régimen sub-nefrotóxico predispone a las ratas a desarrollar un FRA bajando el umbral de toxicidad de una segunda nefrotoxina; como consecuencia, una dosis sub-nefrotóxica de esta segunda nefrotoxina desencadena un FRA en ratas predispuestas por la gentamicina, pero no en ratas no tratadas; (iii) a través de una aproximación proteómica diferencial en la orina de animales G-50 (en comparación con los controles), se identificó una proteína en orina (es decir, la proteína activadora del gangliósido GM2, GM2AP), que detecta esta condición; (iv) este nuevo marcador urinario puede ser utilizado no solamente para la detección de esta, hasta ahora oculta, condición que genera una predisposición, sino además como un marcador muy precoz de fallo renal agudo inducido por gentamicina.

2.1. Selección de un régimen con gentamicina con efectos no nefrotóxicos.

En estudios piloto, la relación dosis-efecto nefrotóxico de la gentamicina fue titulada en ratas Wistar (datos no mostrados). Como resultado, se concluyó que un régimen de 6 dosis diarias de 50 mg/kg/día (G-50) no producía signos de nefrotoxicidad, mientras que un régimen de 6 dosis diarias de 150 mg/kg/día (G-150) causaba una marcada insuficiencia renal que servía como un control positivo para todas muestras mediciones. Las Figuras 1 a 4 muestran una caracterización detallada del efecto de los regímenes G-50 y G-150 sobre la función renal y morfología, en comparación con las ratas de control (C) que recibían suero salino. Estos experimentos demuestran claramente que el régimen G-50 no ejerce un efecto perjudicial sobre el estado de salud general de los animales, y ningún signo específico de nefrotoxicidad, según se midió mediante (i) parámetros utilizados en la práctica clínica, y (ii) otros estados renales caracterizados en mayor profundidad.

La Figura 1 indica que los animales bajo G-50 muestran una tasa de supervivencia y una evolución del peso corporal similar a los animales de control, lo que sugiere que la toxicidad no era significativa. En contraste, los animales bajo G-150 mostraron una mortalidad de aproximadamente un 50%, y una pérdida de peso corporal indicativa de un deterioro grave de la salud. Después de dejar el tratamiento (día 8 y seguidos), ningún animal de ninguno de los grupos murió.

Los datos en la Figura 2 indican que, en comparación con las ratas de control, en las ratas G-50 los parámetros utilizados clínicamente asociados al estado GFR (es decir, concentraciones de creatinina en plasma y BUN), no fueron modificados, mientras que en el grupo G-150 fueron profundamente modificados (paneles A y B). En el daño renal inducido por gentamicina, se considera que la proteinuria es principalmente de origen tubular (ref.). Por consiguiente, el panel C muestra que los animales G-50 no mostraron proteinuria (en comparación con los controles), mientras que los animales G-150 presentaban una proteinuria manifiesta. Esto es consistente con los datos del panel D, en los que la excreción de NAG urinaria, un marcador muy sensible del daño tubular (ref), no está modificado en G-50 y está muy incrementado en G-150. Estos datos indican que no se observa ninguna alteración de la función renal con el régimen G-50, mientras que ocurre una evidente fallo renal agudo como resultado del tratamiento con G-150. Esto último es consistente con un 50% de tasa de mortalidad y deterioro de la salud que se ha observado en estos animales.

Las imágenes de la Figura 3 indican que el régimen G-150 causa un intenso daño a la parénquima renal, principalmente caracterizada por una necrosis tubular masiva (panel C). Sin embargo, no se detectaron alteraciones en el tejido total en el grupo G-50, en comparación con el grupo de control.

Además, el análisis Western blot de los homogenados del tejido renal (FIG. 4) muestran un claro incremento de los marcadores relacionados con el daño y reparación tisular, tales como PAI-1, KIM-1 y vimentina, en el grupo G-150. Sin embargo, no se observó ningún aumento de estos marcadores en las muestras de G-50, en comparación con las del grupo de control.

Junto con los resultados histológicos representados en la FIG. 3, el análisis de marcadores tisulares refuerza la idea de que el régimen G-50 no causa daño tisular a los riñones.

2.2. Un régimen sub-tóxico con gentamicina predispone al desarrollo de un fallo renal agudo.

El conjunto de resultados en esta sección pretende demostrar que el régimen sub-tóxico G-50 predispone a las ratas al desarrollo de un daño renal agudo cuando se someten a una segunda potencial nefrotoxina (evento con dosis sub-tóxicas para ratas no tratadas). Esta predisposición inducida por gentamicina sub-tóxica tiene lugar durante el tratamiento con gentamicina y continúa al menos durante otra semana después de dejar el tratamiento.

La Figura 5 muestra que cuando las ratas se someten a la nefrotoxina nitrato de uranilo (UN, 0,5 mg/kg), su concentración de creatinina en plasma y BUN aumenta únicamente si han estado previamente sometidas al régimen sub-tóxico con gentamicina (G-50). No se observaron alteraciones en estos parámetros en aquellas ratas que recibían solamente gentamicina (G-50), NUo suero salino (como control).

Más aún, únicamente las ratas previamente predispuestas mediante gentamicina muestran proteinuria (FIG. 6, panel izquierdo), aumento en la excreción de NAG y reducción del aclaramiento de creatinina (FIG. 6, panel derecho). Estos datos refuerzan aún más la información de la FIG. 5, y todas en conjunto soportan la acción de generarse una predisposición mediante la gentamicina.

5 De manera interesante, el efecto de generarse una predisposición mediante la gentamicina es efectivo no solamente inmediatamente después de dejar la gentamicina, sino también una semana después de ello, e incluso durante el tratamiento con gentamicina. Esto es demostrado por los datos en la FIG. 7, donde las ratas fueron sometidas a NU en paralelo a gentamicina (círculo negro), o una semana después de suspender la gentamicina (círculo hueco).

10 2.3. Identificación de marcadores urinarios de predisposición al fallo renal agudo inducido por gentamicina mediante proteómica diferencial.

15 La tecnología clínica del estado del arte no es capaz de detectar o diagnosticar la acción de generarse una predisposición mediante gentamicina, ya que no se altera ningún parámetro bajo estas condiciones. Con el objetivo de hallar nuevos marcadores urinarios asociados a este efecto de la gentamicina que podrían ser utilizados para diagnosticar la condición, establecimos una aproximación proteómica diferencial con orina procedente de animales de control y G-50. Los experimentos (FIG: 8) identificaron la GM2AP como ausente en la orina de control y expresada de manera elevada en las orinas G-50.

2.4. Caracterización y validación de GM2AP como un marcador urinario de la predisposición al fallo renal agudo inducido por gentamicina.

20 Mediante un anticuerpo monoclonal generado contra la GM2AP de ratas y humana, confirmamos adicionalmente el nivel diferencial de esta proteína en la orina de control y en G-50 (FIG. 9). Nuestros resultados demostraron también que esta proteína se encuentra incrementada en la orina de las ratas G-150 con una insuficiencia renal manifiesta (FIG. 9, y ver más adelante FIG. 11 para más detalles).

2.5. GM2AP después de otros fármacos nefrotóxicos (NU y cisplatino).

25 La FIG. 10 demuestra que la GM2AP puede servir también para la detección de un daño renal manifiesto causado por otros agentes nefrotóxicos, tales como NU (panel superior) y cisplatino (panel inferior). Puede observarse que las ratas que sufren un FRA bien por NU o cisplatino, como se demuestra por su concentración de creatinina en plasma, muestran niveles elevados de GM2AP en orina, mientras que las ratas de control muestran cantidades muy pequeñas o indetectables de este marcador.

30 A partir de todos los datos precedentes, podemos concluir que la GM2AP puede servir para diagnosticar: 1. La predisposición al FRA inducido por gentamicina sub-tóxica. Esto constituye un gran avance en el diagnóstico del FRA, ya que podríamos ser capaces de detectar una condición que podría predisponer a pacientes tratados con gentamicina a desarrollar más fácilmente un daño renal agudo mediante la exposición a otros agentes que en condiciones normales no causarían ninguno efecto renal. Además, lo siguiente a estudiar es si este nuevo marcador en FRA es de utilidad también para detectar o diagnosticar el efecto potencial de generar una predisposición que otros fármacos podrían inducir en dosis sub-tóxicas.

2.6. Caracterización y validación de la GM2AP como un marcador muy precoz del fallo renal agudo (o formas específicas de FRA).

40 Para estudiar el grado de anticipación con el que GM2AP detecta el daño renal, se realizaron una serie de experimentos de cursos de tiempo en la evolución de diferentes marcadores ante un tratamiento con el régimen G-150. Como puede ser observado en la FIG. 11, los parámetros clínicos tales como aclaramiento de creatinina, concentración de creatinina en plasma y de BUN, proteinuria, y excreción de NAG estaban incrementadas en el día 4 después del comienzo del tratamiento con gentamicina. Más aún, los niveles urinarios de KIM-1 y PAI-1 también estaban incrementados en el día 5. De manera interesante, los niveles urinarios de GM2AP comenzaron a aumentar tan pronto como en el día 1 después de comenzar con la gentamicina.

45 Esto indica claramente que la GM2AP podría desarrollarse como un marcador muy precoz del fallo renal agudo inducido por gentamicina, y tal vez del fallo renal agudo en general.

2.7. Caracterización de la GM2AP en la orina de humanos tratados con gentamicina.

50 Finalmente, comprobamos si los niveles de GM2AP estaban incrementados en la orina de pacientes tratados con gentamicina. La FIG. 12 muestra datos antropométricos, concentraciones de creatinina en plasma y BUN, y GFR estimado mediante las ecuaciones MDTD o Cockcroft-Gault de pacientes bajo un régimen con gentamicina, y datos antropométricos de controles saludables, no tratados. La función renal de los pacientes tratados con gentamicina

includos se encuentra dentro del estado normal. Sin embargo, el nivel urinario de la GM2AP, según se determinó por Western blot, es claramente más elevado en pacientes tratados con gentamicina, de igual modo que se observa en los animales del experimento. Esto, junto con todos los datos recogidos en ratas sugiere que los niveles urinarios de la GM2AP deberían estar validados como marcadores clínicos de la predisposición al fallo renal agudo en humanos.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Salamanca

<120> Proteína activadora de GM2 en orina como marcador de fallo renal agudo o del riesgo de desarrollar fallo renal agudo

10 <130> PCT1367.35

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 189

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Thr Pro
1 5 10 15

Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp
20 25 30

Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr
35 40 45

Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val
50 55 60

20

ES 2 516 717 T3

Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu
65 70 75 80

Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr
85 90 95

Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp
100 105 110

Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr
115 120 125

Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro
130 135 140

Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr
145 150 155 160

Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg
165 170 175

Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile
180 185

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para proporcionar datos para determinar el riesgo de un individuo de desarrollar fallo renal agudo (FRA), o para determinar FRA, que comprende la detección y/o cuantificación de una proteína al menos un 70% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 1, en una muestra biológica aislada de un individuo (sujeto), preferiblemente el individuo es un humano.
2. Método según la reivindicación 1, en donde además comprende comparar los datos obtenidos con valores estándar para hallar cualquier desviación significativa.
3. Método según la reivindicación 2, en donde además comprende la atribución de la desviación significativa al riesgo de desarrollar FRA, o al desarrollo de un FRA, en un individuo.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra biológica es un fluido corporal, preferiblemente el fluido corporal es orina.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína es detectada y/o cuantificada mediante electroforesis, inmunoensayo, cromatografía y/o tecnologías de microarray.
- 15 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el riesgo de desarrollar FRA, o el FRA, se debe a la administración de o exposición a, al menos, un agente nefrotóxico.
7. Método según la reivindicación 6, en donde el agente nefrotóxico es un antibiótico aminoglucósido, preferiblemente el antibiótico aminoglucósido es gentamicina.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en donde la proteína se detecta a partir de 12 horas o a partir de 24 horas tras el comienzo de la administración del o exposición al agente nefrotóxico.
- 20 9. Método para predecir la progresión de un FRA debido a la administración de o exposición a, al menos, un agente nefrotóxico, que comprende:
- a. determinar una primera concentración de una proteína al menos un 70% o un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 1, en un fluido corporal, preferiblemente el fluido corporal es orina, aislada de un individuo expuesto o no al agente nefrotóxico, preferiblemente el individuo es un humano,
- 25 b. determinar una segunda concentración de la proteína de la etapa (a) en un fluido corporal aislado del individuo después de determinar la primera concentración de la proteína en el individuo expuesto, o después de iniciar la administración o exposición al agente nefrotóxico en un individuo no expuesto, y
- c. comparar dicha segunda concentración con dicha primera concentración, hallando cualquier desviación significativa.
- 30 10. Método según la reivindicación 9, en donde el agente nefrotóxico es un antibiótico aminoglucósido, preferiblemente el antibiótico aminoglucósido es gentamicina.
11. Uso de una proteína al menos un 70% o 100% idéntica a la SEQ ID NO: 1, como biomarcador para determinar el riesgo de desarrollar FRA, o para determinar un FRA, o para predecir la progresión de un FRA.
- 35 12. Uso de la proteína según la reivindicación 11, en donde el riesgo de desarrollar FRA, o el FRA, o la progresión de un FRA se debe a la administración de al menos un agente nefrotóxico.
13. Uso de un kit para proporcionar datos para determinar el riesgo de desarrollar FRA, o para determinar un FRA, o para predecir la progresión de un FRA, en una muestra aislada de un individuo, en donde el kit comprende uno o más anticuerpos específicos para detectar una proteína al menos un 70% o un 100% idéntica a al SEQ ID NO: 1.
14. Uso del kit según la reivindicación 13, en donde los anticuerpos específicos están unidos a un soporte sólido.
- 40 15. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, en donde los anticuerpos específicos se utilizan para detectar la proteína o el fragmento de la proteína con la SEQ ID NO: 2.

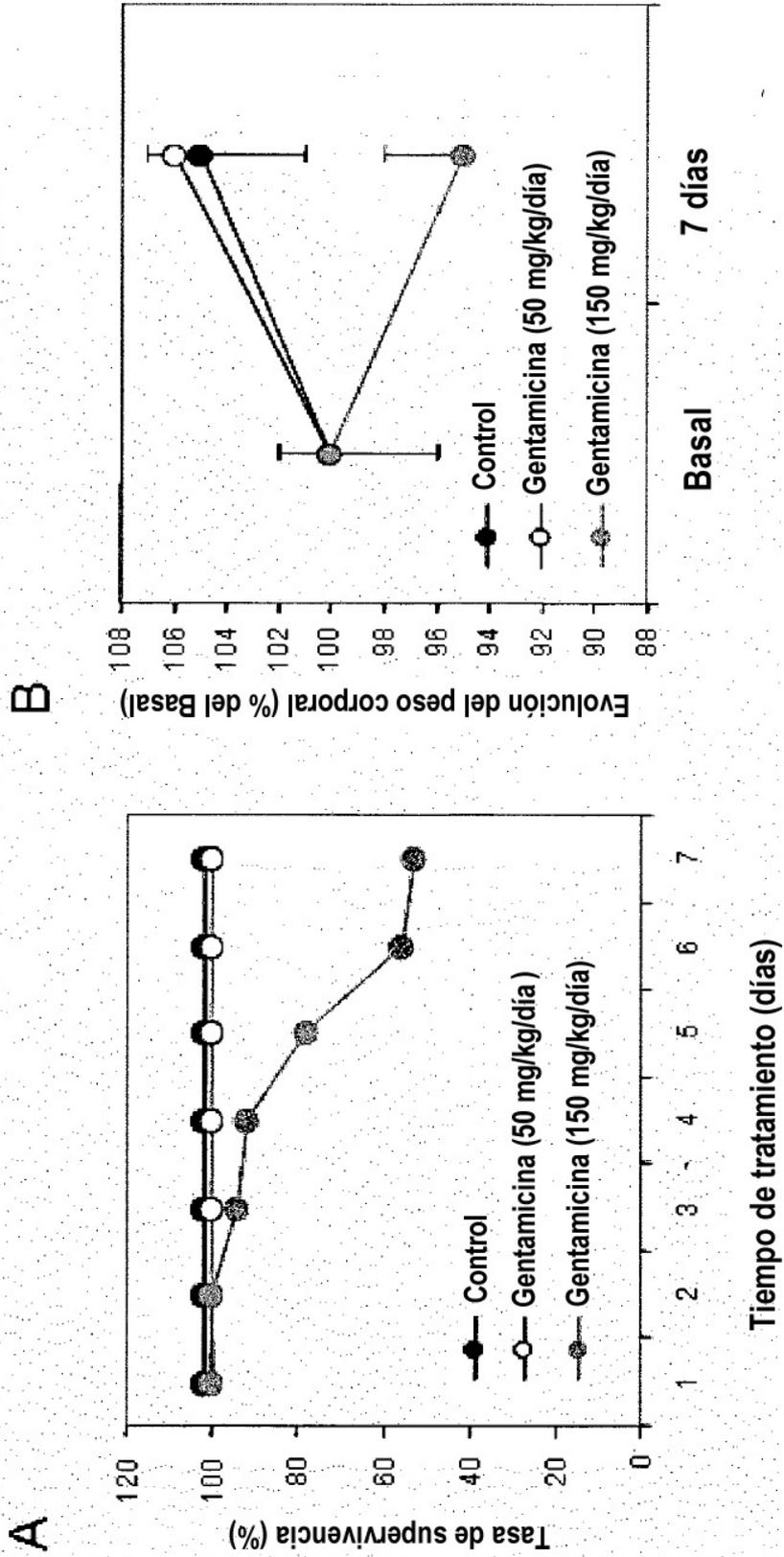


FIG 1

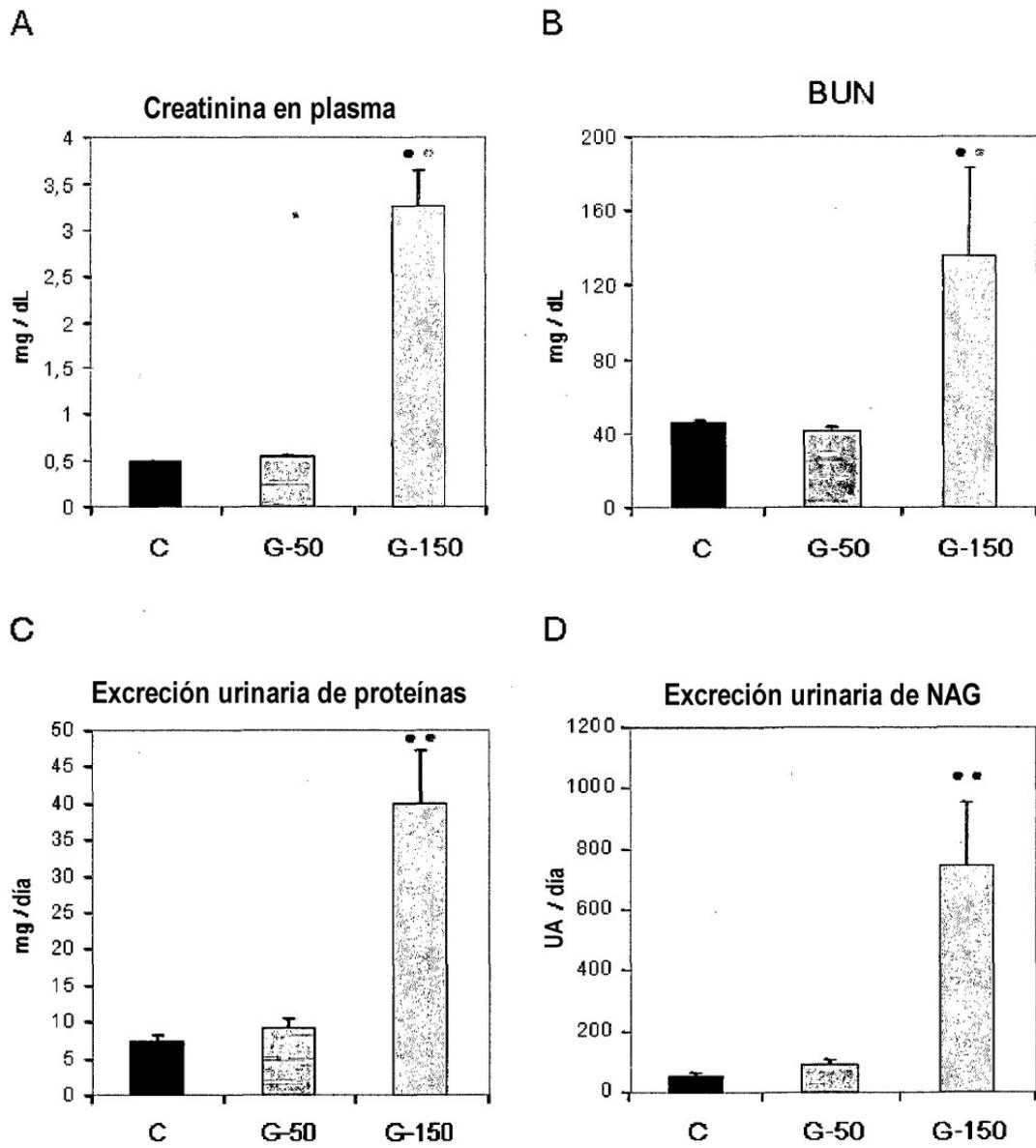


FIG. 2

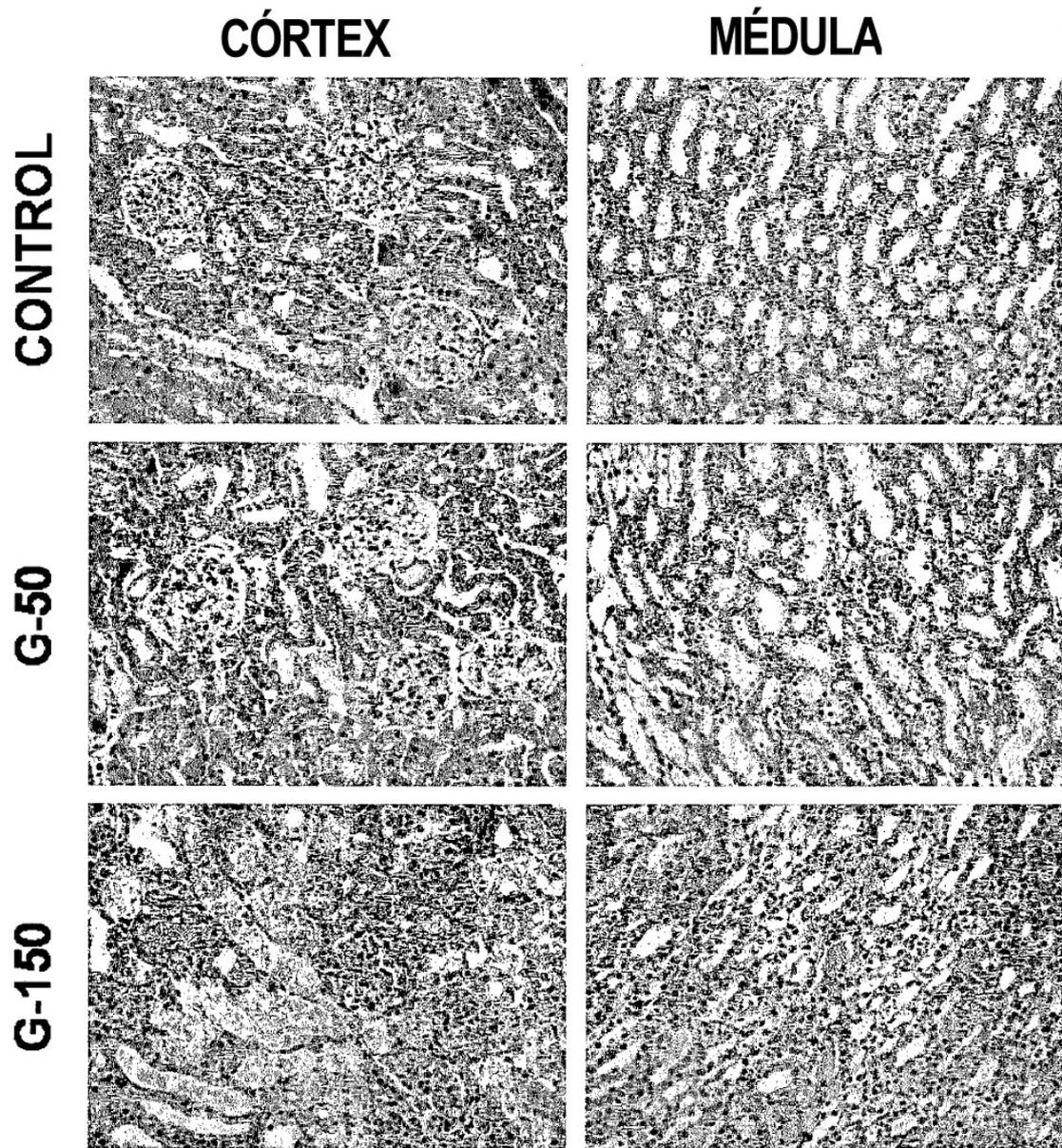


FIG 3

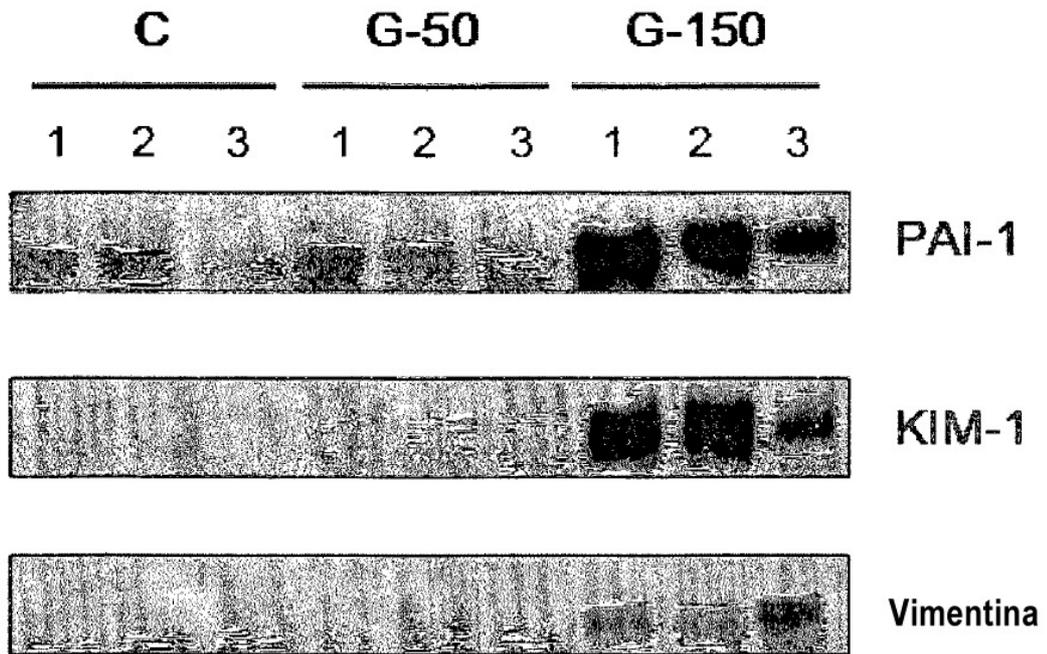


FIG 4

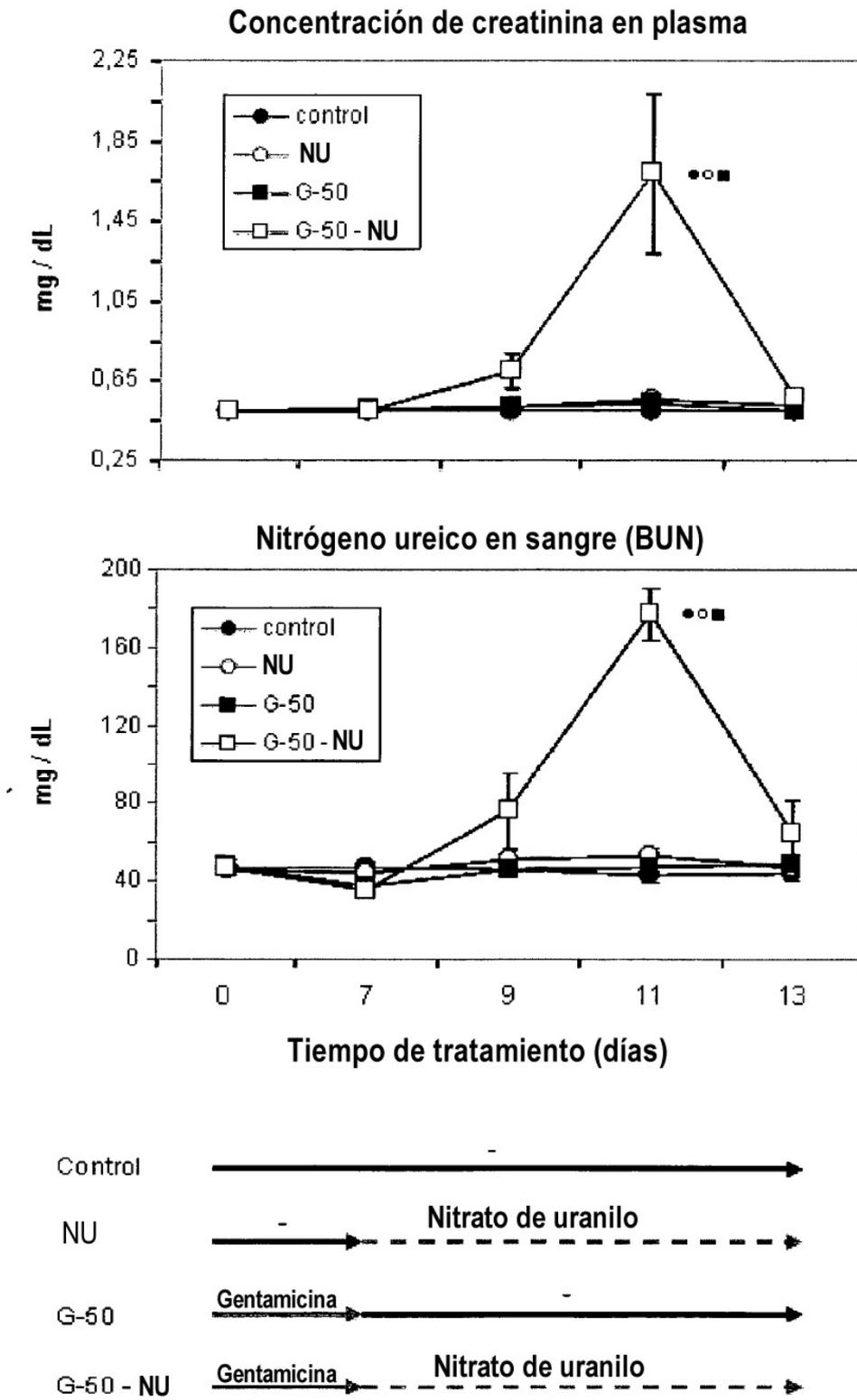


FIG. 5

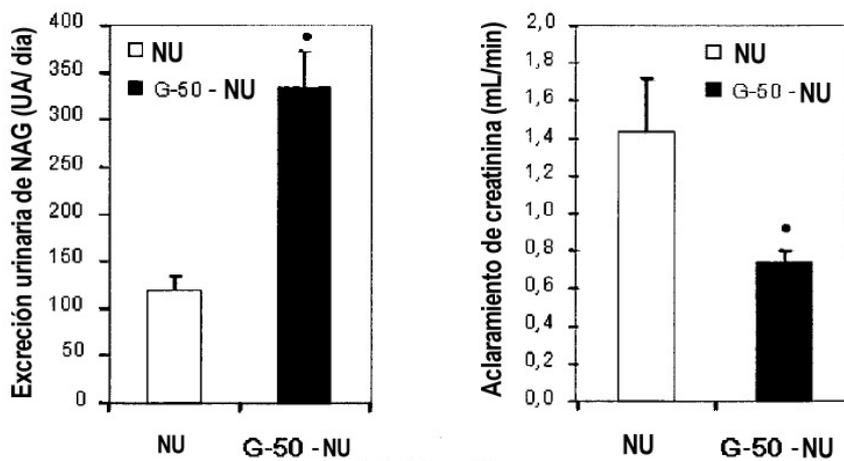
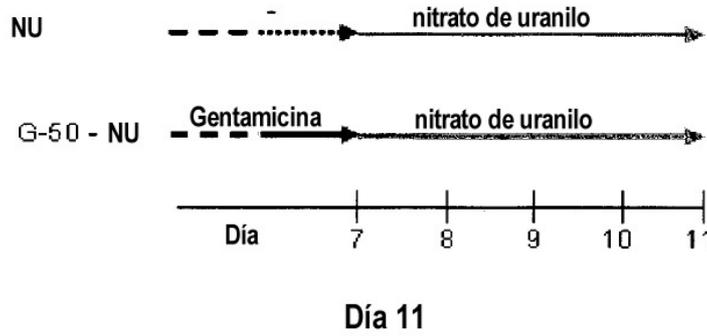
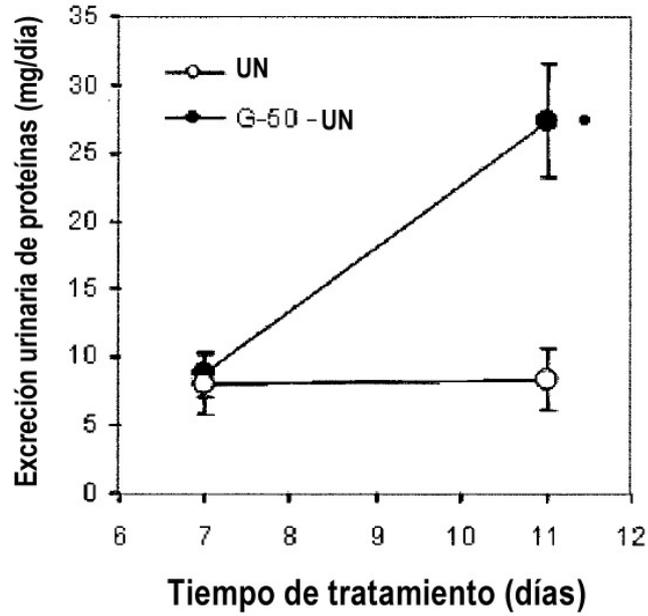


FIG. 6

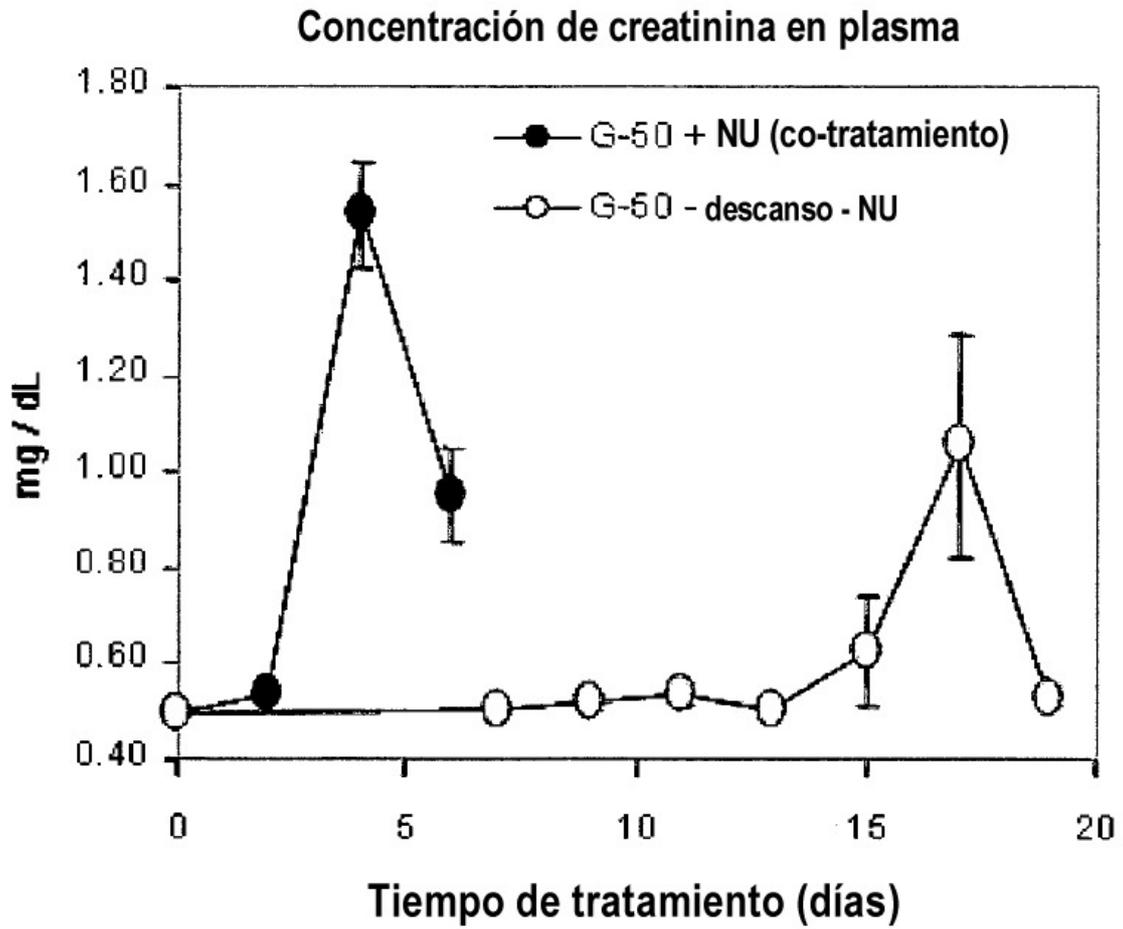


FIG. 7

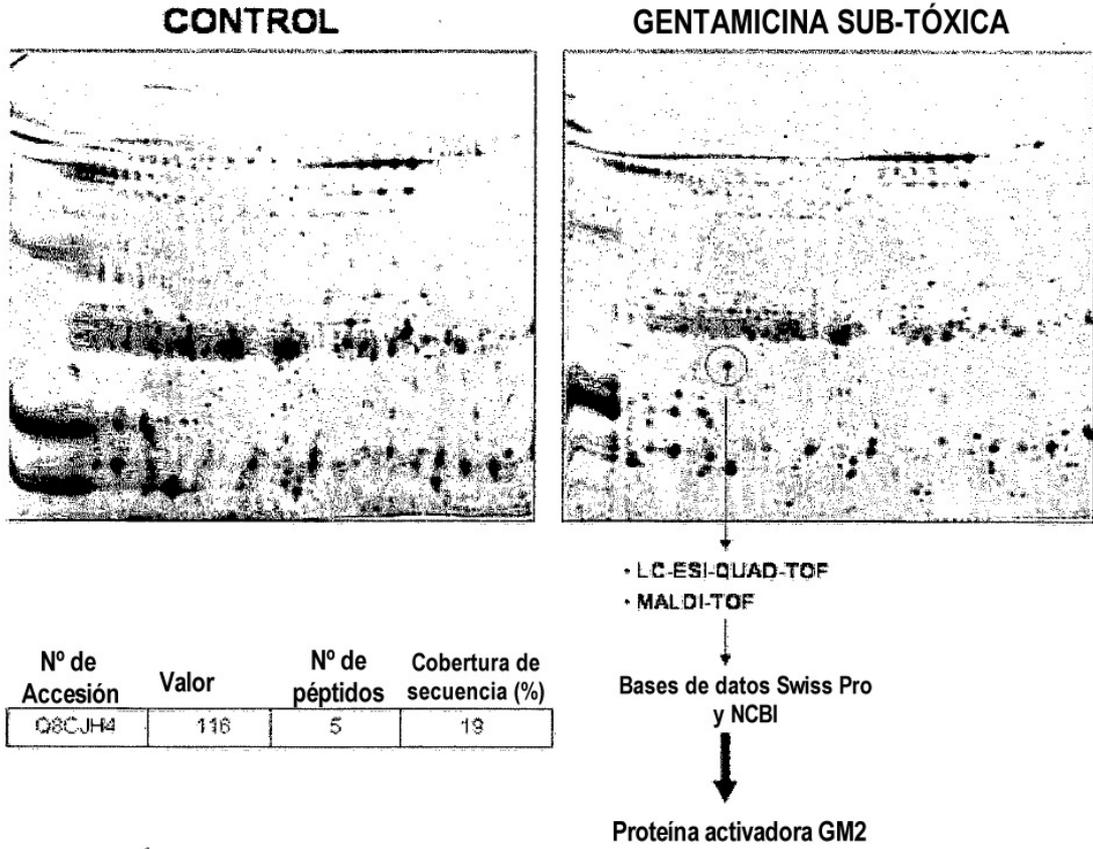


FIG. 8

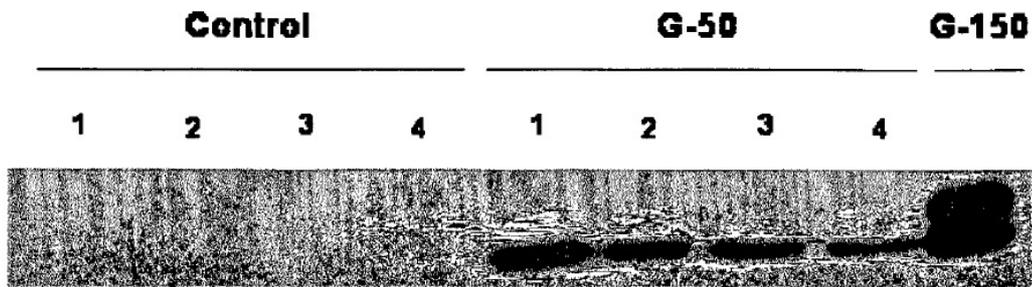


FIG. 9

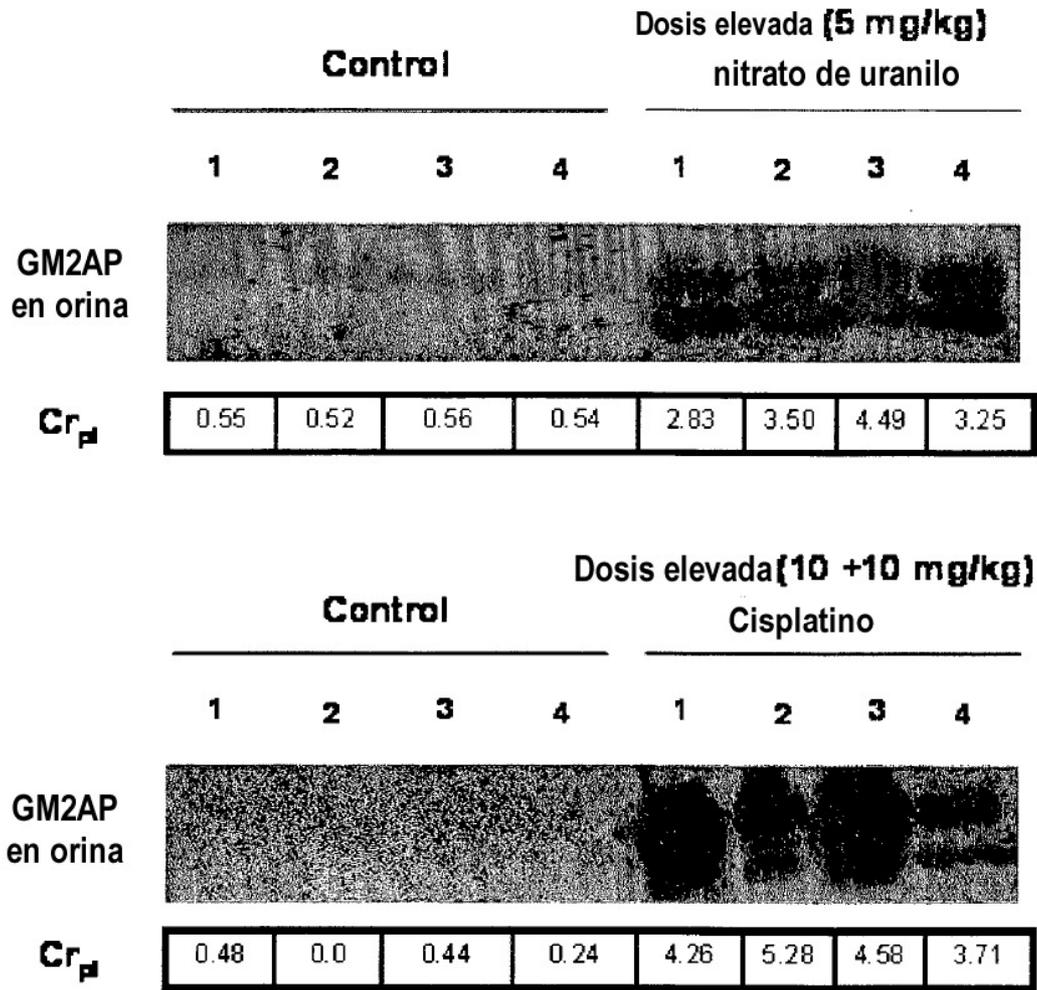


FIG. 10

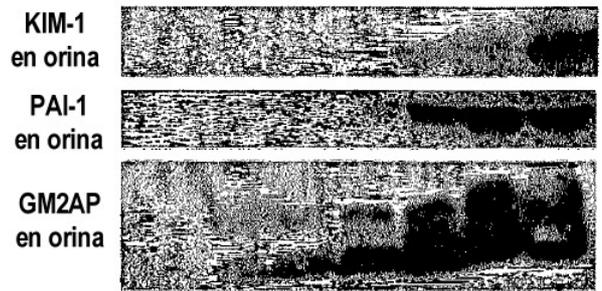
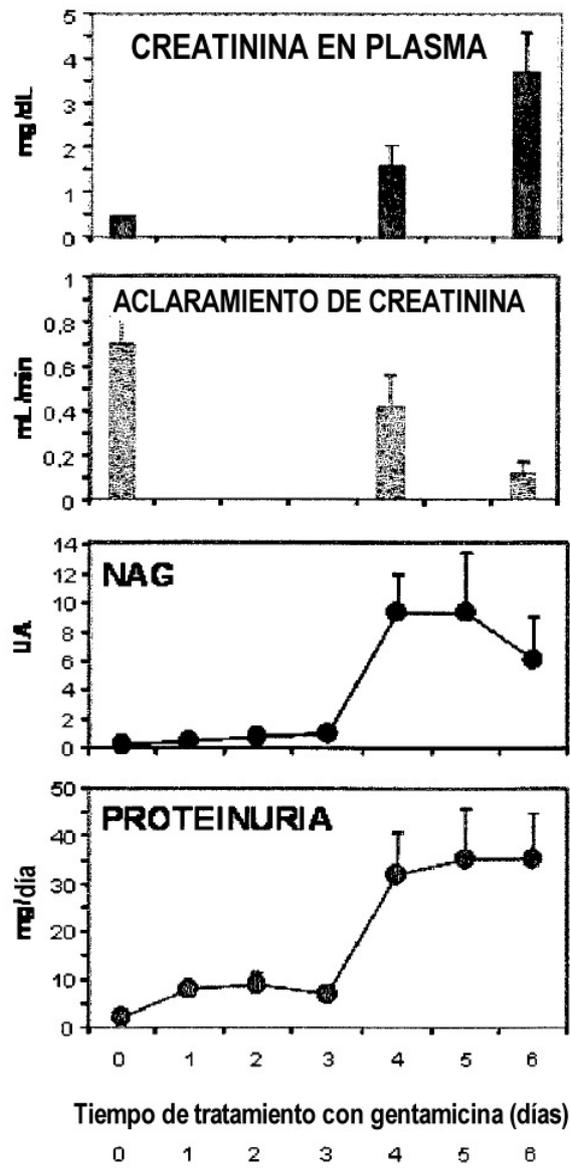


FIG. 11

	Humanos no tratados								Humanos tratados con gentamicina							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Género	M	F	F	F	F	M	M	F	M	F	F	F	F	F	F	M
Edad	23	23	29	33	43	61	64	74	23	24	30	38	45	61	68	74
Peso (kg)	73	70	50	66	53	59	80	50			60		63	65.5	60	61
Crpl (mg/dL)									0,93	0,74	0,71	0,8	0,7	0,69	0,79	0,6
Urea (mg/dL)									30	10	12	23	49	21	34	25
MDRD													91		72	118
C-G									109	117	110		100	89	64	93



FIG. 12