

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 054**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2010 E 10785954 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2442105**

54 Título: **Método de ensayo en enfermedades renales**

30 Prioridad:

10.06.2009 JP 2009139187

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

26.02.2015

73 Titular/es:

**NIIGATA UNIVERSITY (25.0%)
8050 Ikarashi ni-nocho Nishi-ku
Niigata-shi 950-2181, JP;
JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION (25.0%);
DENKA SEIKEN CO., LTD. (25.0%) y
HARA, MASANORI (25.0%)**

72 Inventor/es:

**HARA, MASANORI;
SAITO, AKIHIKO;
TOMINO, YASUHIKO;
ASANUMA, KATSUHIKO;
KUROSAWA, HIROYUKI;
OGASAWARA, SHINYA y
HIRAYAMA, YOSHIAKI**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 530 054 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

Método de ensayo en enfermedades renales.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de ensayo para una enfermedad renal, que incluye el uso de podocalixina urinaria y al menos uno o más marcadores adicionales en combinación.

10 Antecedentes de la técnica

En los últimos años, el número de pacientes con enfermedades renales ha ido aumentando año tras año. Las causas y la progresión de las enfermedades renales no son uniformes entre los pacientes. En algunos casos, los daños renales son causados por lesiones en sitios distintos de los riñones tal como la diabetes, lo que resulta en fallas renales. En otros casos, las enfermedades renales son causadas, por ejemplo, por glomerulonefritis primaria tal como la nefropatía por IgA.

Una prueba para una proteína de la orina o un sedimento de orina a través del denominado análisis de orina ha sido ampliamente llevada a cabo como una pista para diagnosticar las enfermedades renales. Sin embargo, incluso en un sujeto sano, la proteína de la orina puede aumentar transitoriamente, por ejemplo, después de hacer ejercicio excesivo, bajo estrés psicológico, durante la fiebre, cuando se consume una gran cantidad de carne, o antes de la menstruación. Adicionalmente, algunas proteínas de la orina, como la proteinuria ortostática, no se derivan de las enfermedades renales. La prueba para el sedimento de orina incluye pruebas de sangrado del tracto urinario mediante la centrifugación de la orina y la observación de un aumento en los eritrocitos en el sedimento con un microscopio. Sin embargo, la prueba con el sedimento de la orina no puede evaluar necesariamente el sangrado del tracto urinario sin fallar porque los eritrocitos se observan en la orina incluso en un sujeto sano y el sangrado no se deriva de las lesiones renales sino que se deriva de los órganos relacionados con el sistema del tracto urinario en algunos casos. Además, la creatinina sérica (SCr), nitrógeno urea en sangre (BUN), y similares se miden con el propósito de probar la retención en sangre de un componente de la orina, pero esos valores son susceptibles de afectarse, por ejemplo, por una comida para un sujeto que sea examinado (en adelante, a veces referido como "sujeto").

En consecuencia, se reconoce actualmente que el diagnóstico histológico de la biopsia renal es indispensable para el diagnóstico de las enfermedades renales y la evaluación final de la severidad de las mismas. Sin embargo, la biopsia renal implica recoger parte de los tejidos renales y la evaluación de la parte recogida con un microscopio, es una prueba invasiva, y por lo tanto siempre tiene riesgos de complicaciones tales como hemorragia e infección. Además, un paciente que va a someterse a la biopsia renal necesita ser hospitalizado en un centro con especialistas y equipos, y cargas físicas y sociales se imponen en el paciente, que no son despreciables.

La biopsia renal se aplica principalmente en los siguientes casos: 1) un caso donde una proteína en la orina se encuentra en 1.0 g o más por día; 2) un caso donde se encuentra la lesión renal criptogénica pero no se encuentra atrofia renal en una prueba de imagen; 3) un caso donde la hematuria se encuentra continuamente y hay sospecha de nefritis crónica progresiva; o 4) un caso donde se encuentra un rápido deterioro de la función renal. Mientras tanto, un caso donde está contraindicada la biopsia renal se ejemplifica con los casos siguientes: 1) un caso donde ya se ha encontrado atrofia renal debido a una disfunción renal crónica en una prueba de imagen; 2) un caso donde es difícil detener el sangrado debido a una tendencia al sangrado o hipertensión fuera de control; 3) un caso con riñón poliquistico; o 4) un paciente que no puede mantenerse quieto durante la biopsia renal y durante y después de una prueba o un caso donde no se siguen las instrucciones. Hay muchos casos donde la biopsia renal descrita anteriormente no se puede dirigir en campos clínicos actuales, lo cual es problemático.

Se divulga una medida sencilla de prueba para la lesión renal que implica medir podocalixina urinaria como una sustancia que se encuentra en asociación con enfermedades renales (literatura de patente 1). La podocalixina es una proteína de azúcar que está presente en la superficie de los podocitos que estructuran el glomérulo renal y es responsable de una función de filtración. Los podocitos están situados en el lado del espacio de Bowman en la membrana basal glomerular y juegan un papel importante en el mecanismo de filtración glomerular. Así, se sabe que la captación del grado de daño en los podocitos tiene un significado sumamente importante en la comprensión de enfermedades renales (literatura no patente 1).

En las enfermedades renales, la nefropatía por IgA (enfermedad de Berger) es una de las glomerulonefritis crónicas primarias y representa aproximadamente el 40% o más de las enfermedades. Se sabe que la nefropatía por IgA es un pronóstico malo de la enfermedad cuyos síntomas no se mejoran por dosificación en aproximadamente el 30% de los pacientes con la enfermedad y que requiere diálisis por insuficiencia renal en fase terminal en un momento posterior. En la actualidad, cuando el sujeto tiene hallazgos sospechosos de tener nefropatía por IgA a través de una prueba de orina y un análisis de sangre, el sujeto se somete a biopsia renal. Como resultado, se realiza el diagnóstico definitivo de la nefropatía por IgA y se lleva a cabo la clasificación de pronóstico. La nefropatía por IgA se puede clasificar en cuatro grupos, es decir, un grupo de pronóstico bueno, un grupo de pronóstico relativamente bueno, un grupo de pronóstico

relativamente malo, y un grupo de pronóstico malo. La clasificación se basa en el diagnóstico definitivo mediante el uso la biopsia renal. Los cuatro grupos son descritos más abajo.

- 5 1) Grupo de pronóstico bueno: es muy poco probable que se requiera la diálisis; como hallazgos glomerulares, sólo se encuentran proliferación celular mesangial moderada y aumento de la matriz, y no glomeruloesclerosis, se encuentran formación de media luna y adhesión a la cápsula de Bowman; y como hallazgos tubulares renales, intersticiales, y vasculares, no se encuentran cambios notables tubulares renales, intersticiales, y vasculares.
- 10 2) Grupo de pronóstico relativamente bueno: es poco probable que se requiera la diálisis ; como hallazgos glomerulares, se encuentran la proliferación celular mesangial moderada y aumento de la matriz, y glomeruloesclerosis, la formación de media luna, y la adhesión a la cápsula de Bowman se encuentran en menos del 10% de todos los glomérulos sometidos a biopsia; y como hallazgos tubulares renales, intersticiales, y vasculares, no se encuentran cambios notables tubulares renales, intersticiales, y vasculares.
- 15 3) Grupo de pronóstico relativamente malo: la diálisis es probable que se requiera dentro de 5 o más de 20 años o menos; como hallazgos glomerulares, se encuentran la proliferación celular mesangial moderada y aumento de la matriz, y glomeruloesclerosis, la formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman se encuentran en 10 a 30% de todos los glomérulos sometidos a la biopsia; y como hallazgos tubulares renales, intersticiales, y vasculares, atrofia renal tubular es moderada, la infiltración de células es moderada en el intersticio excepto alrededor de algunos glomérulos esclerosos, y un cambio de esclerosis moderada se encuentra en el vaso sanguíneo.
- 20 4) Grupo de pronóstico malo: la diálisis es probable que se requiera dentro de 5 años; como hallazgos glomerulares, se encuentran la proliferación celular mesangial severa y aumento de la matriz, y glomeruloesclerosis, formación de media luna, y la adhesión a la cápsula de Bowman se encuentran en 30% o más de todos los glomérulos sometidos a biopsia; cuando los sitios de esclerosis se suman y se convierten en esclerosis global, la tasa de esclerosis es 50% o más de todos los glomérulos; algunos glomérulos también muestran hipertrofia compensatoria; como hallazgos tubulares renales, intersticiales y vasculares, la atrofia tubular renal e infiltración de células intersticiales son graves, y la fibrosis también es grave; y el engrosamiento o degeneración se encuentra en algunas paredes de las arteriolas intrarrenales.
- 25

30 Para la nefropatía por IgA, la proporción de la enfermedad principal de la enfermedad crónica de riñón (CKD) es la más alta, y la enfermedad se encuentra como hematuria asintomática o proteinuria en análisis de orina en escuelas, análisis en oficinas, o similares en muchos casos. En los seres humanos adultos, la nefropatía por IgA es una causa importante de insuficiencia renal crónica. Con respecto al diagnóstico de la nefropatía por IgA, se propone, por ejemplo, un método que implica detectar inmunológicamente inmunoglobulina A (IgA) en el suero de un sujeto (literaturas de patentes 2 y 3). Además, la podocalixina del sedimento urinario se ha sugerido como marcador de laboratorio seguro y útil para la estimación de la severidad de una lesión glomerular aguda y un índice urinario de cambios extracapilares agudos en niños con nefropatía por IgA y nefritis púrpura de Henoch Schoenlein (literatura no patente 2)

35

Lista de Citas

40 Literatura de Patente

[PTL 1] WO 2002/037099 A1
 [PTL 2] JP 2592121 B2
 [PTL 3] JP 2000-241431 A

45 Literatura no Patente

[NPL 1] Hara y otros, Nephron 69: 397-403 (1995)
 [NPL 2] Hara y otros, Nephrology, volumen 7, Issue Suppl S3, Alog (28 junio 2008)

50

Resumen de la invención

Problema Técnico

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de ensayo para una predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA en un sujeto sospechoso de tener una enfermedad renal.

Solución al Problema

60 Con el fin de solucionar el problema anteriormente mencionado, los inventores de la presente invención se han centrado en la importancia clínica de la podocalixina urinaria en la evaluación de la enfermedad renal, y han encontrado que el uso de podocalixina urinaria y al menos un marcador adicional en combinación permite que la enfermedad renal sea efectivamente probada. Por lo tanto, la presente invención se ha completado. La presente invención se define en su sentido más amplio por las reivindicaciones anexas.

65

O sea, la presente invención incluye los siguientes aspectos.

- 5 1. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA, que comprende calcular un valor índice de podocalixina mediante el uso de un valor para la podocalixina urinaria y un valor para el marcador adicional, y usar el valor índice de podocalixina como un indicador, en donde se obtiene el valor índice de podocalixina.
- 10 al dividir la tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre) por la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR)
o
al multiplicar la tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre) por el valor para la tasa de excreción de proteína en la orina (proteína en la orina/Cre).
- 15 2. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además evaluar a un sujeto que sea examinado que tenga necesidad de biopsia renal quien tiene un valor índice de podocalixina mayor que un valor de referencia de podocalixina.
- 20 3. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el valor de referencia de podocalixina comprende un valor obtenido de un grupo de sujetos que sean examinados que incluye un grupo de pronóstico bueno y un grupo de pronóstico relativamente bueno de nefropatía por IgA, en donde se define un sujeto de un grupo de pronóstico bueno
- 25 cuando no se encuentra glomerulosclerosis, formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman y cuando no se encuentran cambios notables tubulares renales, intersticiales, y vasculares; y
- en donde se define un sujeto de un grupo de pronóstico relativamente bueno
- 30 cuando no se encuentra glomerulosclerosis, formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman en menos del 10% de todos los glomérulos sometidos a biopsia y no se encuentran cambios notables tubulares renales, intersticiales, y vasculares.
- 35 4. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la prueba mediante el uso de podocalixina urinaria se realiza en ejemplares, con excepción de los ejemplares que se habían evaluado como pertenecientes a un grupo de pronóstico malo con un marcador adicional de la función renal, en donde un sujeto se define de un grupo pronostico deficiente.
- 40 cuando no se encuentra glomerulosclerosis, formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman en 30% o más de todos los glomérulos sometidos a biopsia y cuando la tasa de esclerosis es 50% o más de todos los glomérulos, cuando los sitios de esclerosis se suman y convierten en esclerosis global.
- 45 5. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la detección de la podocalixina urinaria se lleva a cabo mediante una técnica inmunológica.

Efectos ventajosos de la invención

50 El método de ensayo de la presente invención permite la discriminación de un grupo de pronóstico malo para no sólo casos con resultados evidentes que muestran pronóstico malo en un método de ensayo convencional, sino también para los casos con resultados no evidentes, y por lo tanto permite la evaluación de una enfermedad renal que sea realizada más exactamente. Adicionalmente, en el método de ensayo de la presente invención, además en los casos con resultados evidentes, la evaluación de una enfermedad renal se puede realizar de manera efectiva. Por ejemplo, en virtud del método de ensayo de la presente invención, el diagnóstico definitivo se puede realizar mediante la realización

55 adicional de biopsia renal en un sujeto previsto que pertenece a un grupo de pronóstico relativamente malo o un grupo de pronóstico malo de la nefropatía por IgA. En virtud del método de ensayo de la presente invención, no es necesario realizar la biopsia renal en un paciente con una enfermedad renal leve, lo que permite que se reduzca las cargas físicas y sociales en un sujeto y permite que se decida una estrategia terapéutica o similar rápidamente.

60 Breve descripción de las figuras

[Fig. 1] La Fig. 1 es un gráfico que ilustra, para los pacientes con nefropatía por IgA con una tasa de filtración glomerular estimada eGFR de ≥ 60 y una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" de menos que 0.5 g/g de creatinina, un efecto de selección de pronóstico (curva ROC) usando como un indicador una tasa de excreción de la podocalixina urinaria "PCX/Cre" (Ejemplo 2).

65

[FIG. 2] La Fig. 2 es un gráfico que ilustra, para los pacientes con nefropatía por IgA con una tasa de filtración glomerular estimada eGFR de ≥ 60 y una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" de menos que 0.5 g/g de creatinina, un efecto de selección de pronóstico (curva ROC) usando como un indicador un valor índice "(PCX/Cre) /eGFR" obtenido dividiendo una tasa de excreción de la podocalixina urinaria "PCX/Cre" por eGFR (Ejemplo 2).

[Fig. 3] La Fig. 3 es un gráfico que ilustra, para los pacientes con nefropatía por IgA con una tasa de filtración glomerular estimada eGFR de ≥ 60 y una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" de menos que 0.5 g/g de creatinina, un efecto de selección de pronóstico (curva ROC) usando como un indicador un valor índice "(PCX/Cre) * (proteína en la orina/Cre) " obtenido multiplicando una tasa de excreción de la podocalixina urinaria "PCX/Cre" por una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" (Ejemplo 2).

[Fig. 4] La Fig. 4 es un gráfico que ilustra, para los pacientes con nefropatía por IgA con una tasa de filtración glomerular estimada eGFR de ≥ 60 y una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" de menos que 0.5 g/g de creatinina, una comparación de los valores índice "(PCX/Cre)/eGFR" obtenido cada uno dividiendo una tasa de excreción de la podocalixina urinaria "PCX/Cre" por eGFR de acuerdo con la clasificación pronóstica basado en los hallazgos histológicos de la biopsia renal (Ejemplo 2).

[Fig. 5] La Fig. 5 es un gráfico que ilustra, para los pacientes con nefropatía por IgA con una tasa de filtración glomerular estimada eGFR de ≥ 60 y una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" de menos que 0.5 g/g de creatinina, una comparación de los valores índice "(PCX/Cre)*(proteína en la orina/Cre)" obtenido cada uno multiplicando una tasa de excreción de la podocalixina urinaria "PCX/Cre" por una tasa de excreción de proteína en la orina de acuerdo con la clasificación de pronóstico basada en los hallazgos histológicos de la biopsia renal (Ejemplo 2).

Descripción de las modalidades

La presente invención es un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA, que incluye detectar podocalixina urinaria en un sujeto y usar la podocalixina urinaria y uno o más marcadores adicionales en combinación en un valor índice de podocalixina.

En esta descripción, la orina como una muestra se puede derivar de cualquier sujeto. No se impone ninguna limitación particular sobre un método de recolección para la orina, pero se prefiere usar orina de temprano en la mañana o la orina casual. Adicionalmente, la cantidad de orina necesaria para el método de ensayo de la presente invención es de aproximadamente 10 a 200 μL . El método de ensayo de la presente invención puede llevarse a cabo simultáneamente con, por ejemplo, un análisis de orina general que se realiza convencionalmente en un examen médico o similares. Alternativamente, el método de ensayo se puede realizar mediante el uso de orina recogida por separado de un sujeto que sea considerado que es sospechoso de tener una enfermedad renal en una prueba distinta de la biopsia renal.

Ejemplos de la enfermedad renal incluyen diversas enfermedades como la enfermedad crónica de riñón (CKD) e insuficiencia renal aguda, y además incluyen la nefropatía diabética, nefropatía membranosa, glomeruloesclerosis focal, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía lúpica, y la nefropatía por IgA. Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen la nefropatía por IgA. La nefropatía por IgA es una enfermedad **que se caracteriza en que** la proliferación celular mesangial glomerular, matriz mesangial ampliada (aumentada), y depósitos granulares formados principalmente de IgA en una región mesangial se encuentran en la glomerulonefritis crónica. La nefropatía por IgA se puede diagnosticar en conformidad con las directrices para el diagnóstico con un análisis de orina y un análisis de sangre proporcionadas en 1995 por un "comité conjunto del Grupo de Estudio Especial sobre Enfermedad glomerular progresiva, Ministerio de Salud y Bienestar de Japón y la Sociedad Japonesa de Nefrología." En un análisis de orina, un sujeto con hematuria microscópica continua o proteinuria intermitente o continua se considera que es sospechoso de tener nefropatía por IgA. En el análisis de sangre, un sujeto con un valor de IgA sérica de 315 mg/dL o más se considera que sea sospechoso de tener nefropatía por IgA.

La orina como una muestra puede ser tratada mediante la adición y mezcla de un líquido de tratamiento en la orina recogida. El líquido de tratamiento puede ser cualquiera siempre y cuando el ajuste del pH de la orina, el enmascaramiento de un sedimento de orina, y la solubilización de podocalixina son posibles, pero se ejemplifica preferentemente por una solución obtenida mediante la adición de un agente quelante, tensioactivo, y similares a un tampón. El tampón y el agente quelante puede ser cualquier tampón y agente quelante conocidos, y se prefiere usar un tensoactivo no iónico como el tensoactivo. El líquido de tratamiento se ejemplifica por una solución que incluye EDTA 0.2 M y 2% (Vol./Vol.) de Triton X-100 en TES-NaOH 2 M (pH 7.0). Una solución de la muestra de orina se puede obtener al añadir y mezclar 10 μL de tal líquido de tratamiento en 90 μL de una muestra de orina.

Se pueden emplear varios métodos como un método de detección para la podocalixina en la solución de muestra de orina. Un ejemplo del método de detección para la podocalixina urinaria es una técnica inmunológica. La técnica inmunológica puede realizarse, por ejemplo, por un método de inmunotinción (que incluye un método de anticuerpo fluorescente, un método de anticuerpo enzimático, un método de anticuerpo marcado con metal pesado, y un método de anticuerpo marcado con radioisótopo), una combinación de separación basada en un método de electroforesis y un método de detección con fluorescencia, una enzima, un radioisótopo, o similares (que incluyen un método de transferencia a membrana western y un método de electroforesis bidimensional fluorescente), un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un método de transferencia puntual, un inmunoensayo turbidimétrico de aglutinación en látex (LA), o inmunocromatografía. De ellos, se prefiere emplear un método ELISA o un método LA. Se

5 prefiere emplear un método sándwich en el método ELISA del punto de vista de la propiedad cuantitativa. En el método sándwich, se añade una solución de la muestra de orina a una placa de microtitulación recubierta de anticuerpo anti-podocalixina para provocar una reacción antígeno-anticuerpo, un anticuerpo anti-podocalixina marcado con enzima se añade adicionalmente para provocar una reacción antígeno-anticuerpo, la placa se lava y después se somete a una
 10 reacción con un sustrato de la enzima y el desarrollo del color, se mide la absorbancia para detectar podocalixina urinaria, y el valor medido puede ser usado para calcular una concentración de podocalixina urinaria.

10 El anticuerpo anti-podocalixina anticuerpo para uso en la técnica inmunológica sólo tiene que ser un anticuerpo capaz de detectar podocalixina. El anticuerpo anti-podocalixina para usar en la presente invención no está particularmente limitado, y puede ser un anticuerpo conocido o un anticuerpo a ser desarrollado en el futuro. Los ejemplos de estos incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, un anticuerpo marcado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y fragmentos de unión activos de estos.

15 Un valor para podocalixina urinaria para uso en la presente invención es una concentración de podocalixina urinaria corregida con un valor para un componente urinario que se excreta de manera estable en la orina (valor del componente urinario). El componente urinario es particularmente preferentemente creatinina urinaria. Se considera que la creatinina urinaria es sustancialmente constante independientemente de una enfermedad en un individuo debido a que la producción de creatinina depende de la cantidad de un músculo. En una prueba para una sustancia de excreción urinaria, con el fin de eliminar un error en la cantidad de orina, una técnica que implica la corrección de la cantidad de
 20 una sustancia de excreción urinaria de interés con una cantidad por gramo de creatinina se emplea generalmente. Esto permite la comparación de las sustancias de excreción urinaria por unidad gramo de creatinina. Un valor corregido obtenido mediante la corrección de una concentración de podocalixina urinaria con una concentración de creatinina urinaria se refiere como tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre), y la tasa de excreción de la podocalixina urinaria se puede calcular con la siguiente ecuación.

25 **<Ecuación> PCX/Cre: tasa de excreción de la podocalixina urinaria ($\mu\text{g/g}$) = 100 x concentración de podocalixina urinaria (ng/mL) / concentración de creatinina urinaria (mg/dL)**

30 En la presente invención, diversos marcadores se pueden usar como un marcador adicional diferente de la podocalixina urinaria para ser usado en combinación con la podocalixina urinaria. El marcador adicional es un marcador que representa una función del cuerpo vivo, y puede ser uno que ya ha sido usado clínicamente como un marcador conocido, o puede ser uno recién encontrado. Cualquier marcador puede ser usado siempre que una enfermedad renal puede ser probada con una combinación de esta con la podocalixina urinaria. Adicionalmente, el marcador adicional puede ser corregido con un valor para un componente urinario que se excreta de manera estable en la orina. El
 35 marcador adicional se ejemplifica principalmente por un marcador de la función de renal. Ejemplos del marcador de la función renal adicional incluye, pero no se limita a, una tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) y una proteína de la orina. En el método de ensayo, el uso de podocalixina urinaria y un marcador adicional que no sea la podocalixina urinaria en combinación significa, por ejemplo, obtener un nuevo valor índice de podocalixina (de aquí en adelante, simplemente se refiere como "valor índice") se calcula mediante el uso de un valor para la podocalixina urinaria y un
 40 valor para el marcador adicional y/o preliminarmente realizar la evaluación de una enfermedad renal con el marcador adicional y después realizar la evaluación con podocalixina urinaria.

45 En la presente invención, el valor índice se usa como un indicador. El valor índice se obtiene al multiplicar o dividir una tasa de excreción de la podocalixina urinaria por un valor para los marcadores adicionales de la función renal eGFR o la tasa de excreción de proteína en la orina. Es concebible que tal valor índice refleja el estado de progresión activa de la enfermedad de las lesiones glomerulares en tiempo real.

50 Una tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) como uno de los marcadores adicionales de la función renal es un valor calculado para una tasa de filtración glomerular (GFR) como la proporción de orina que puede ser tratada por minuto en el riñón. La tasa de filtración glomerular estimada se puede calcular, por ejemplo, con una edad, un género, y una concentración de creatinina sérica. Como la ecuación de cálculo para determinar la tasa de filtración glomerular estimada, una ecuación conocida o una nueva ecuación que sea desarrollada en el futuro puede ser usada, y se prefiere seleccionar y usar una ecuación adecuada en dependencia de los atributos de un sujeto (por ejemplo, la raza y similares). Por ejemplo, cuando el sujeto es japonés, la tasa de filtración glomerular estimada se puede calcular con la
 55 siguiente ecuación.

$$\text{GFR (masculino)} = 194 \times \text{Scre (creatinina sérica)}^{-1.094} \times \text{edad}^{-0.287}$$

$$\text{GFR(femenino)} = \text{GRF (masculino)} \times 0.739$$

60 En la presente invención, se prefiere usar la tasa de filtración glomerular estimada (EGFR) como la tasa de filtración glomerular. Una tasa de excreción de la podocalixina urinaria se divide por eGFR para calcular un valor índice "(PCX/Cre) /eGFR." El valor índice "(PCX/Cre) /eGFR" se puede calcular con una computadora mediante el uso de

programas. El valor índice "(PCX/Cre)/eGFR" se puede usar como un indicador para el método de ensayo de la presente invención.

5 Otro ejemplo de marcador adicional de la función renal es una proteína en la orina, y un valor para la proteína en la orina en sí mismo puede ser obtenido por una técnica conocida. Como el valor de la proteína en la orina, se prefiere usar una tasa de excreción de proteína en la orina (proteína en la orina/Cre) preliminarmente corregida con una concentración de creatinina en orina. La tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre) preliminarmente corregida con una concentración de creatinina en orina se multiplica por la tasa de excreción de proteína en la orina (proteína en la orina/Cre) para calcular un valor índice "(PCX/Cre)*(proteína en la orina/Cre)." El valor índice "(PCX/Cre)
10 *(proteína en la orina/Cre)" se puede calcular con una computadora mediante el uso de programa. Tal valor índice "(PCX/Cre)*(proteína en la orina/Cre)" se usa como un indicador en el método de ensayo de la presente invención.

En la presente invención, el valor índice obtenido como se describe anteriormente se compara con un valor de referencia fijado adecuadamente, para realizar de este modo la evaluación de una enfermedad renal, por ejemplo, la
15 evaluación de la necesidad de la biopsia renal y/o predicción de pronóstico. El valor de referencia fijado adecuadamente, y un valor para la podocalixina urinaria, preferentemente un valor índice en un sujeto sano, o un valor para podocalixina urinaria, preferentemente un valor índice en un paciente con una enfermedad renal leve se pueden usar. Por ejemplo, cuando la necesidad de la biopsia renal en un paciente sospechoso de tener nefropatía por IgA se prueba por el método de ensayo de la presente invención, un valor para podocalixina urinaria, preferentemente
20 "(PCX/Cre)/eGFR" o "(PCX/Cre)* (proteína en la orina/Cre)" obtenido a partir de un grupo de sujetos a ensayar incluyendo un grupo de pronóstico bueno y un grupo de pronóstico relativamente bueno de la nefropatía por IgA puede ser usado como un valor de referencia. Con el uso de tal valor de referencia, un sujeto que tiene un valor para podocalixina urinaria, preferentemente un valor índice más alto que el valor de referencia se puede evaluar a ser más probable que pertenece a un grupo de pronóstico relativamente malo o un grupo de pronóstico malo, lo que permite la predicción del pronóstico. Del mismo modo, un sujeto que tiene un valor para podocalixina urinaria, preferentemente un
25 valor índice más alto que el valor de referencia puede ser evaluado que está en necesidad de realizar una biopsia renal para confirmar la patología con mayor precisión.

Adicionalmente, un método que involucra preliminarmente realizar la evaluación de una enfermedad renal con un
30 marcador adicional y después realizar la evaluación con podocalixina urinaria se ejemplifica por un método que implica realizar una prueba mediante el uso de podocalixina urinaria excepto para una muestra evaluada que pertenece a un grupo de pronóstico malo con un marcador adicional de la función renal. Un sujeto que tiene una muestra evaluada que pertenece a un grupo de pronóstico malo con un marcador adicional de la función renal pertenece a un grupo de pronóstico malo con resultados evidentes. La podocalixina urinaria puede detectar además un grupo de pronóstico malo
35 sin hallazgos evidentes con el marcador adicional de la función renal, y por lo tanto tiene una gran importancia clínica. El grupo de pronóstico malo con resultados evidente es preferentemente detectado mediante el uso de un marcador de la función renal tal como eGFR y/o una proteína en la orina. Por ejemplo, cuando un sujeto corresponde a cualquiera o ambos de eGFR de menos que 60 y una tasa de excreción de proteína en la orina "proteína en la orina/Cre" de 0.5 g/g de creatinina o más, el sujeto se puede evaluar que pertenece a un grupo de pronóstico malo.

La presente invención además abarca un reactivo de prueba para una enfermedad renal y un kit de reactivos de prueba para una enfermedad renal para su uso en la realización de una prueba para una enfermedad renal que incluye cada uno un anticuerpo anti-podocalixina para detectar podocalixina urinaria. El anticuerpo anti-podocalixina incluido en el reactivo de prueba o el kit de reactivos de prueba puede estar marcado, por ejemplo, con una enzima o similares.
45 Adicionalmente, el kit de reactivos de prueba puede incluir dos o más tipos de anticuerpos anti-podocalixina y los anticuerpos son preferentemente anticuerpos que reconocen epítomos diferentes el uno del otro. Adicionalmente, el kit puede incluir un reactivo tal como un líquido de tratamiento o un sustrato cromogénico, una instrumento necesario para una prueba, y similares.

50 EJEMPLOS

(Ejemplo 1) Medición de la concentración de podocalixina urinaria

Una concentración de podocalixina se midió mediante el uso de dos tipos de anticuerpos monoclonales anti-podocalixina humana. Esos dos tipos de anticuerpos reconocen dos diferentes epítomos de podocalixina humana, respectivamente, y son un anticuerpo monoclonal anti-podocalixina humana a (de aquí en adelante, denominado simplemente "anticuerpo a") y un anticuerpo monoclonal anti-podocalixina humana b (de aquí en adelante, denominado simplemente "anticuerpo b"), respectivamente. En este ejemplo, una placa de microtitulación revestida con anticuerpo (micro placa tipo discontinuo GF8 alto: Nunc) y un anticuerpo b marcado con peroxidasa de rábano picante (de aquí en adelante, abreviada como "HRP") se usaron.
60

Primero, 90 μ L de orina primitiva obtenida de un sujeto se mezclaron con 10 μ L de una solución de TES-NaOH 2 M, EDTA 0.2 M, y 2% (Vol./Vol.) de Triton X-100, pH 7.0. 100 μ L de una solución de muestra de orina obtenida por la mezcla se añadieron a los pocillos de una placa de microtitulación revestida con anticuerpo. La placa se dejó reposar a
65 37°C durante 1 hora, y la solución de muestra de orina se eliminó entonces por decantación de los pocillos. El lavado se

realizó al añadir Na₂HPO₄ 3.6 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, NaCl 145 mM, y 0.05% (Vol./Vol.) de Tween 20 (de aquí en adelante, abreviado como "PBS-T") a los pocillos de la placa de microtitulación en 200 µL/pocillo y eliminar PBS-T por decantación. La etapa de lavado se realizó un total de tres veces. Después de eso, una solución de anticuerpo b marcado con HRP se añadió en 100 µL/pocillo. La placa se dejó reposar a 37°C durante 1 hora, y la solución de anticuerpo b marcado con HRP se eliminó después por decantación. El lavado se realizó al añadir PBS-T a 200 µL/pocillo y eliminar el PBS-T por decantación. La etapa de lavado se realizó un total de tres veces. Después de eso, se usó un sistema de sustrato de una etapa TMB (Dako) como una solución de sustrato para una reacción enzimática con HRP y se añadió en 100 µL/pocillo, y la placa se dejó reposar bajo una condición de mínimo acceso a la luz a 25°C durante 30 minutos. Después de eso, una solución de H₂SO₄ 313 mM se añadió en 100 µL/pocillo como una solución de terminación de la reacción, y cada uno de los pocillos se midió para sus absorbancias en las longitudes de onda de 450 nm y 630 nm mediante el uso de Multiskan Ascent y Programa Ascent para Multiskan (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.). Después, un valor obtenido al restar la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm se definió como un valor medido. La podocalixina humana nativa extraída del riñón se usó como un estándar para una curva de calibración para derivar una concentración de podocalixina en una muestra. Con el uso de la siguiente ecuación, una concentración de podocalixina urinaria corregida con la creatinina se calculó con la siguiente ecuación.

<Ecuación> tasa de excreción de la podocalixina urinaria (µg/g) = 100 x concentración de podocalixina urinaria (ng/mL) / concentración de creatinina urinaria (mg/dL)

(Ejemplo 2) Importancia clínica de la tasa de excreción de la podocalixina urinaria como selección del pronóstico para nefropatía por IgA

Las muestras de orina obtenidas de 28 pacientes con nefropatía por IgA se calcularon cada uno para su tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre) por el método del Ejemplo 1. Adicionalmente, las mismas muestras de orina se midieron y calcularon cada una por su tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) y la tasa de excreción de proteína en la orina (proteína en la orina/Cre). Esas tasas se combinaron con la tasa de excreción de la podocalixina urinaria para obtener un valor índice, y la importancia del valor índice como un marcador de selección del pronóstico se examinó.

Los 28 pacientes con nefropatía por IgA fueron sometidos a biopsia renal y ampliamente clasificados en dos grupos, es decir, un grupo (Grupo A) que incluye un grupo de pronóstico bueno y un grupo de pronóstico relativamente bueno y un grupo (Grupo B) que incluye un grupo de pronóstico relativamente malo y un grupo de pronóstico malo de acuerdo con la clasificación de pronóstico basada en los hallazgos histológicos en la biopsia renal. Un área bajo la curva ROC se usó como un indicador de un efecto de selección. La curva característica de operación del receptor (curva ROC) es para uso en la evaluación de la exactitud de un ensayo de selección o similar y comparar diferentes métodos de ensayos, y proporciona el intervalo de un punto límite para ser seleccionado. La capacidad de una prueba para discriminar sujetos con y sin una cierta condición se puede mostrar visualmente dependiendo de la selección del punto límite. La curva ROC traza una proporción de verdaderos positivos, es decir, la sensibilidad, en el eje de ordenadas y una proporción de falsos positivos, es decir, (1-especificidad) en el eje de abscisas como medidas. En el caso de la evaluación de la superioridad o inferioridad de diferentes ensayos, un ensayo que tiene la curva situada en el lado superior izquierdo se considera como que es más excelente. Por ejemplo, en comparación con la curva ROC de un método de ensayo, la curva del otro método de ensayo se coloca en la parte superior izquierda, el otro método de ensayo puede ser considerado como que tiene una mayor precisión y que es más excelente. Cuando la selección alcanza la discriminación completa, se exhibe un esquema en una esquina en ángulo recto en el lado superior izquierdo, y el área bajo la curva ROC se evalúa como 1.0. En este ejemplo, con el fin de confirmar un efecto como un marcador de selección de la clasificación del pronóstico, se hizo una evaluación de la precisión en el caso de la selección de los Grupos A y B.

Primero, la Tabla 1 muestra los efectos de selección determinados a partir de las curvas ROC de 28 casos con nefropatía por IgA.

[Tabla 1]

	PCX/Cre	1/eGFR	Proteína en la orina /Cre	(PCX/Cre) /eGFR	(PCX/Cre)* (Proteína en la orina/Cre)
Área bajo la curva ROC	0.644	0.713	0.884	0.763	0.850

Los resultados de la Tabla 1 muestran que "PCX/Cre" solo no exhiben un efecto de selección del pronóstico de la nefropatía por IgA. Por otro lado, los resultados revelan que "(PCX/Cre)/eGFR" o "(PCX/Cre) * (proteína en la orina/Cre)" se espera que exhiba un efecto de selección del pronóstico. Sin embargo, el efecto de selección del pronóstico de tal valor índice difiere poco del efecto del recíproco de eGFR "1/eGFR" o "proteína en la orina/Cre" solo.

5 Como un factor para la supresión del efecto de selección del pronóstico del valor índice, se consideró que un caso con glomeruloesclerosis avanzada o un caso con un exceso de proteína en orina se incluyó en los 28 casos. En el caso de la glomeruloesclerosis avanzada o en el caso de un exceso de proteína en orina, es concebible que la cantidad de expresión de podocalixina expresada en el glomérulo renal disminuye, y la excreción de podocalixina urinaria desaparece debido a una disminución en el espacio hueco en el lado del espacio de Bowman que puede permitir la excreción urinaria. En efecto, en tal caso severo (caso con una tasa de excreción de proteína en orina de 0.5 g/g de creatinina en orina o más y/o eGFR de menos de 60), el eGFR disminuye, y al mismo tiempo la interrupción de una capacidad de reabsorción en el túbulo renal se produce, lo que provoca un aumento de proteína en la orina. Así, el caso corresponde naturalmente a un grupo de pronóstico malo (Tabla 2). En otras palabras, el 70% del grupo de pronóstico malo correspondiente a al menos uno de la tasa de excreción de proteínas en orina de 0.5 g/g de creatinina en orina o más y eGFR de menos de 60 es un grupo de pronóstico malo con resultados evidentes.

[Tabla 2]

15

20

25

30

35

		Grupo A	Grupo B
Total	Número de casos correspondientes	8 casos	20 casos
Tasa de excreción de proteína en la orina de 0.5 g/g de creatinina urinaria o más	Número de casos correspondientes	0 casos	11 casos
	Relación de los casos correspondientes (%)	0%	55%
eGFR de menos que 60	Número de casos correspondiente	0 casos	7 casos
	Relación de los casos correspondientes (%)	0%	35%
Tasa de excreción de proteína en la orina de 0.5 g/g de creatinina urinaria o más y eGFR de menos que 60	Número de casos correspondiente	0 casos	14 casos
	Relación de los casos correspondientes (%)	0%	70%

40

Es importante cómo discriminar a un grupo de pronóstico malo sin resultados evidentes, que representa el 30% restante del grupo de pronóstico malo. Así, un total de 14 casos (8 casos en un grupo de pronóstico bueno y un grupo de pronóstico relativamente bueno y 6 casos en un grupo de pronóstico relativamente malo y un grupo de pronóstico malo) correspondientes a eGFR de 60 o más y una tasa de excreción de proteínas en orina de menos de 0.5 g/g de creatinina fueron sometidos a subanálisis sobre los efectos de selección de pronóstico.

45

La Tabla 3 muestra los resultados.

[Tabla 3]

50

	PCX/Cre	1/eGFR	Proteína en la orina /Cre	(PCX/Cre) /eGFR	(PCX/Cre)* (Proteína en la orina/Cre)
Área bajo la curva ROC	0.813	0.479	0.750	0.833	0.917

55

Los resultados de la Tabla 3 encontraron que "PCX/Cre" en sí, "(PCX/Cre)/eGFR," y "(PCX/Cre)*(proteína en la orina/Cre)" cada uno proporciona un alto efecto de selección de pronóstico de la nefropatía por IgA. En particular, los resultados encontraron que "(PCX/Cre) * (proteína en la orina/Cre)" proporciona un efecto de selección de pronóstico destacado (Figuras. 1, 2, 3, 4, y 5). Por consiguiente, se reveló que la selección de pronóstico para la nefropatía por IgA y la biopsia renal mediante su uso como un indicador se puede realizar efectivamente con un valor índice usando "PCX/Cre."

60

65

Más específicamente, en casos con resultados evidentes (eGFR inferior a 60 o una tasa de excreción de proteína en orina de 0.5 g/g de creatinina o más), la selección efectiva se puede realizar con "1/eGFR" o "proteína en la orina/Cre" en sí (Tabla 1 y Tabla 2), mientras que en los casos sin resultados evidentes, un grupo de pronóstico malo puede ser

5 discriminado con "PCX/Cre" en sí, (PCX/Cre)/eGFR" y "(PCX/Cre) * (de proteínas en orina/Cre)" (Tabla 3 y Fig. 1, la Fig. 2, Fig. 3, la Fig. 4 Y Fig. 5). Adicionalmente, como se muestra en la Tabla 1, también en los casos con resultados evidentes, un efecto de selección se puede obtener con "(PCX/Cre)/eGFR" y "(PCX/Cre)*(proteína en la orina/Cre)." Así, la selección efectiva para un grupo de pronóstico malo se puede realizar con "(PCX/Cre)/eGFR" y "(PCX/Cre) * (proteína en la orina/Cre)" consecuentemente en la selección de pronóstico general para la nefropatía por IgA.

10 En este ejemplo, en los casos con resultados evidentes, "PCX/Cre" solo no refleja necesariamente las lesiones glomerulares debido a complicaciones, es decir, la glomeruloesclerosis y el trastorno tubular renal existen. Sin embargo, el uso de un valor índice mediante el uso de "eGFR" o "proteína en la orina/Cre" en combinación con este permitió que se evaluara el estado de progresión de la enfermedad activa de las lesiones glomerulares en tiempo real. Esto indica que un aumento en podocalixina urinaria refleja la progresión activa de la enfermedad en el glomérulo, que conduce a resultados evidentes.

15 Aplicabilidad industrial

20 Como se describió anteriormente, la patología de una enfermedad renal puede ser captada por el método de ensayo de la presente invención. Por ejemplo, en pacientes con nefropatía por IgA, cuando los pacientes se predicen que tienen pronóstico relativamente malo y pronóstico malo mediante el uso como indicador a "PCX/Cre" y un valor índice que lo usa, el diagnóstico definitivo se puede realizar mediante la realización adicional de biopsia renal. Además, un paciente con eGFR de ≥ 60 y "proteína en la orina/Cre" de menos de 0.5 g/g de creatinina se puede predecir por su pronóstico de la nefropatía por IgA, y la predicción de pronóstico es más exacta que la de un método convencional. Así, no es necesario realizar la biopsia renal en un paciente con una enfermedad renal leve, lo que permite que se reduzca una carga física en el paciente y un coste de tratamiento médico. Adicionalmente, cuando un paciente se considera que tiene necesidad de la biopsia renal, es posible tomar una decisión rápida en una estrategia terapéutica o similar para el paciente, lo que es útil.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA, que comprende calcular un valor índice de podocalixina mediante el uso de un valor para la podocalixina urinaria y un valor para el marcador adicional, y mediante el uso del valor índice de podocalixina como un indicador, en donde un valor para el marcador adicional es una tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) o un valor para la tasa de excreción de proteína en la orina (proteína en la orina/Cre); en donde se obtiene el valor índice de podocalixina
- 10 al dividir la tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre) por la tasa de filtración glomerular estimada (GFR)
o
al multiplicar la tasa de excreción de la podocalixina urinaria (PCX/Cre) por el valor para la tasa de excreción de proteína en la orina (proteína en la orina/Cre),
- 15 2. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además evaluar un sujeto que sea examinado que tenga necesidad de biopsia renal que tiene un valor índice de podocalixina mayor que un valor de referencia de podocalixina.
- 20 3. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el valor de referencia de podocalixina comprende un valor obtenido de un grupo de sujetos que sean examinados que incluyen un grupo de pronóstico bueno y un grupo de pronóstico relativamente bueno de nefropatía por IgA, en donde se define un sujeto de un grupo de pronóstico bueno
- 25 cuando no se encuentra glomerulosclerosis, formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman y
cuando no se encuentran cambios notables tubulares renales, intersticiales, y vasculares; y
- 30 en donde se define un sujeto de un grupo de pronóstico relativamente bueno
cuando no se encuentra glomerulosclerosis, formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman en menos del 10% de todos los glomérulos sometidos a biopsia y
cuando no se encuentran cambios notables tubulares renales, intersticiales, y vasculares.
- 35 4. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la prueba usando podocalixina urinaria se realiza en ejemplares, con excepción de los ejemplares que se habían evaluado que pertenece a un grupo de pronóstico malo con un marcador adicional de la función renal, en donde un sujeto se define de un grupo de pronóstico malo
- 40 cuando no se encuentra glomerulosclerosis, formación de media luna, y adhesión a la cápsula de Bowman en 30% o más de todos los glomérulos sometidos a biopsia y
la tasa de esclerosis es 50% o más de todos los glomérulos, cuando los sitios de esclerosis se suman y convierten a esclerosis global
- 45 5. Un método de ensayo para la predicción de pronóstico de la nefropatía por IgA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la detección de la podocalixina urinaria se lleva a cabo mediante una técnica inmunológica.

Figura 1

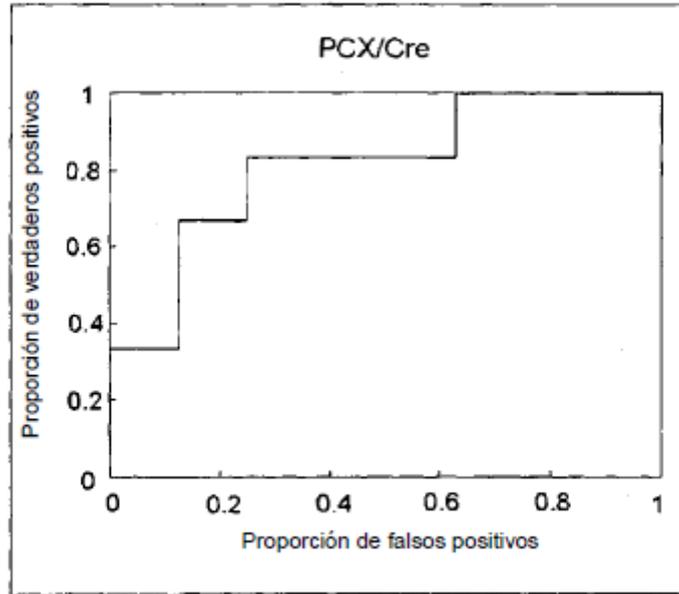


Figura 2

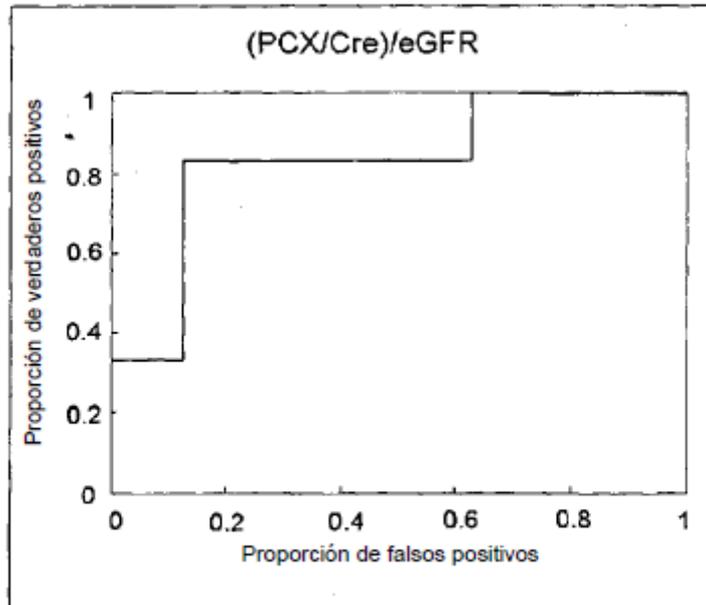


Figura 3

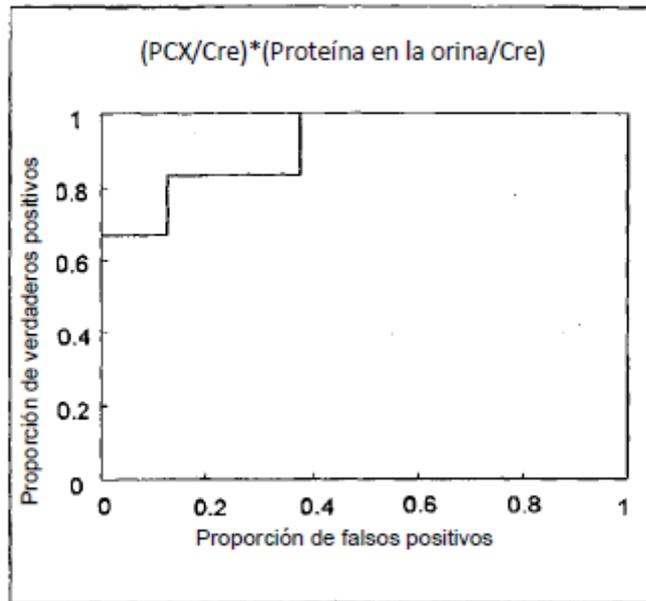


Figura 4

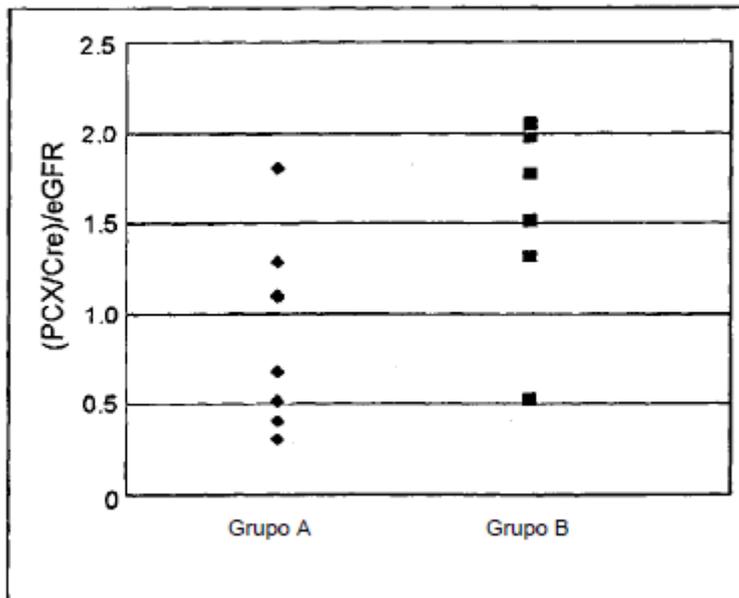


Figura 5

