

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 574**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
G01N 33/493 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C40B 30/00 (2006.01)
G01N 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010 E 10735453 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2391653**

54 Título: **Biomarcadores asociados a la nefropatía**

30 Prioridad:

28.01.2009 US 147785 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2015

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Road
Chutung, Hsinchu 31040, TW**

72 Inventor/es:

**TSENG, TZU-LING;
LU, CHING-FANG;
LIN, WEI-YA;
HSU, TSAI-WEI;
YEH, MARY YA-PING;
CHEN, YI-TING y
YANG, CHWEI-SHIUN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 530 574 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

Biomarcadores asociados a la nefropatía

Antecedentes de la invención

5 La nefropatía, conocida comúnmente como daño del riñón, es causada, entre otras, por la diabetes, la presión arterial alta, la toxicidad de los fármacos y la inflamación.

10 Típicamente, la nefropatía se diagnostica determinando el nivel de proteinuria (por ejemplo, el nivel de albúmina en la orina) o examinando la tasa de filtración glomerular (TFG), un indicador de la función renal. Ambos procedimientos no son adecuados para detectar la nefropatía en fase inicial, que normalmente no presenta síntomas. Aunque la nefropatía también puede ser detectada por biopsia renal, este procedimiento invasivo no es un procedimiento de diagnóstico ideal.

Es de gran importancia desarrollar un método para detectar la nefropatía en fase inicial. La clave para lograr este objetivo es la identificación de biomarcadores fiables asociados a la nefropatía incipiente.

A continuación se resume la técnica anterior pertinente relacionada con la presente invención.

15 El documento de patente WO 2007/124419 A1 describe un método y un kit para la detección precoz del estado renal deteriorado. Dicho documento describe, en una muestra proporcionada, la detección de la presencia de una proteína seleccionada del grupo que consiste en aprotinina, alfa-1-microglobulina (A1M), alfa-1-glicoproteína ácida (A1AG), microalbúmina y sus combinaciones, siendo su presencia un biomarcador temprano de un cambio en el estado renal.

20 El documento de patente WO 2008/141285 A2 describe reactivos y métodos para el diagnóstico de una enfermedad renal en un ser humano o animal. Los métodos de dicho documento comprenden la etapa de analizar una muestra de orina de un ser humano o animal diabético con un reactivo inmunológico inmunológicamente específico para una proteína o péptido producido diferencialmente en la orina de un paciente diabético que tenga o esté en riesgo de desarrollar una enfermedad renal. Además, el reactivo inmunológico inmunológicamente específico para al menos una de sus proteínas o péptidos de la orina es zinc-alfa-2-glicoproteína, alfa-1-microglobulina, alfa-1-glicoproteína ácida 1, alfa-1-glicoproteína ácida 1, etc.

La referencia bibliográfica H. Jiang et al. (*NEPHROLOGY* 2009; 14, 332-337) describe una nueva proteína relacionada con la nefropatía diabética, orosomucoide (alfa-1-glicoproteína ácida), identificada por un método proteómico. Dicha referencia enseña también que el aumento de la excreción urinaria de orosomucoide es un predictor de riesgo de la nefropatía diabética.

30 El documento de patente WO 2008/021431 A2 describe métodos y materiales implicados en el diagnóstico y seguimiento del estado de rechazo de un trasplante y el trastorno inmunológico usando variantes por empalme para mejorar la evaluación de la actividad inmunológica o inflamatoria en muestras de sujetos.

35 La referencia bibliográfica S.A. Varghese et al. (*J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 913-922, 2007) describe biomarcadores en la orina que predicen la causa de la enfermedad glomerular. Dicha referencia describe también que veintinueve manchas en gel de las proteínas procedentes de los pacientes son más importantes para la diferenciación de las enfermedades y que las manchas se identifican por espectrometría de masas como formas con carga de 11 proteínas plasmáticas: orosomucoide, transferrina, α -1-microglobulina, zinc- α -2-glicoproteína, α -1-antitripsina, factor B del complemento, haptoglobina, transtiretina, proteína de unión al retinol plasmático, albúmina y hemopexina.

40 La referencia bibliográfica M. Sharma et al. (*Proteomics Clin. Appl.* 2008 June 18; 2 (7-8): 1065-1086) describe biomarcadores proteicos en la orina de lesiones por radiación. Dicha referencia enseña que se ha encontrado que después de la irradiación aumentan la peptidasa relacionada con la calicreína tisular 1, la cistatina C inhibidora de la cisteína-proteinasa y la histidina oxidada mientras que disminuye un número de inhibidores de proteinasas incluyendo la proteína de unión a la calicreína y la albúmina.

45 La referencia bibliográfica S. Jain et al. (*JAPI • VOL. 53 • JUNE 2005 (2005-06)*, pp 513-520) describe marcadores de proteínas en la orina para la predicción precisa del trastorno renal diabético. El análisis por electroforesis bidimensional en gel (2-DGE) de las muestras de orina de pacientes diabéticos de tipo II revela cuatro proteínas principales junto con la albúmina en estas muestras, que son zinc-alfa-2-glicoproteína, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-microglobulina e IgG.

50 La referencia bibliográfica R. J. Lebbink et al. (*The Journal of Immunology*, 2008, 180: 1662-1669) describe un nuevo mecanismo de regulación inmunológica por un receptor similar a Ig asociado a leucocitos soluble que regula el potencial inhibitor del receptor-1 similar a Ig asociado a leucocitos unido a la membrana por medio de la competencia por los ligandos.

El documento de patente US 2004/0009901 A1 describe métodos y materiales implicados en el diagnóstico de afecciones artríticas que están acompañadas por una deficiencia de NADPH-oxidasa, métodos y materiales

implicados en el tratamiento, prevención o retraso de la aparición de afecciones artríticas que están acompañadas por una deficiencia de NADPH-oxidasas y métodos y materiales implicados en la identificación de agonistas y antagonistas de la actividad de NADPH-oxidasas.

5 La referencia bibliográfica S. G. Coca et al. (*Kidney International* (2008) 73, 1008-1016) describe biomarcadores para el diagnóstico y la estratificación del riesgo de lesiones renales agudas. Dicha referencia también describe que la cistatina C sérica y la lipocalina asociada a la gelatinasa de los neutrófilos en la orina, IL-18, etc., se comportaron mejor en el diagnóstico precoz de lesiones renales agudas.

10 La referencia bibliográfica W. Ouyang (*Journal of Immunological Methods* 292 (2004) 109-117) se refiere al establecimiento de un sistema ELISA para determinar los niveles del receptor-1 similar a Ig asociado a leucocitos soluble en suero de pacientes con fiebre hemorrágica con síndrome renal y trasplante de riñón. Dicha referencia demuestra que el receptor-1 similar a Ig asociado a leucocitos puede ser liberado cuando se activan los linfocitos.

Sumario de la invención

15 La presente invención se basa en los descubrimientos inesperados de que los niveles en orina tanto de receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos como de alfa-1-glicoproteína-2 ácida, y fragmentos de estas dos proteínas con SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 respectivamente, son significativamente superiores en un paciente con nefropatía que en un paciente sin nefropatía. Estas moléculas de proteínas son, por lo tanto, biomarcadores fiables para el diagnóstico de la nefropatía en fase inicial.

20 Por consiguiente, un aspecto de esta invención se refiere a un método de diagnóstico de la nefropatía. Este método incluye al menos las siguientes etapas: (a) obtener una muestra de orina de un sujeto que se sospecha que tiene nefropatía, (b) determinar en la muestra de orina un nivel de un biomarcador y (c) evaluar si el sujeto tiene nefropatía basándose en el nivel del biomarcador. El biomarcador utilizado en el método que se acaba de describir es uno de los siguientes: (i) receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos que es DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1), (ii) una combinación del antes mencionado con alfa-1-glicoproteína ácida o uno de sus fragmentos que es GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2).

25 Un aumento en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores anteriores, en comparación con el de un sujeto sin nefropatía, indica que el sujeto tiene nefropatía. En un ejemplo, el nivel de biomarcador se determina por un ensayo de espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas en la que la ionización se efectúa mediante desorción por láser asistida por matriz (MALDI-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de líquidos-doble espectrometría de masas (LC-MS/MS)). En otro ejemplo, se determina por un ensayo inmunológico (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA) e inmunoensayo luminiscente (LIA)).

35 El método de diagnóstico de la nefropatía anteriormente descrito es aplicable tanto a seres humanos como a animales de laboratorio, por ejemplo, los exentos de proteinuria. El término "un animal de laboratorio" utilizado en la presente memoria se refiere a un animal vertebrado utilizado comúnmente en ensayos con animales, por ejemplo, ratón, rata, conejo, gato, perro, cerdo y primate no humano.

Otro aspecto de esta invención se refiere a un método para seguir el progreso de la nefropatía en un sujeto. Este método incluye: (a) obtener una primera muestra de orina de un sujeto que padece nefropatía (por ejemplo, un ser humano o un animal de laboratorio), (b) determinar en la primera muestra de orina un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores anteriores, (c) obtener una segunda muestra de orina del sujeto 2 semanas hasta 12 meses después de que se haya obtenido la primera muestra de orina, (d) determinar en la segunda muestra de orina un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores y (e) evaluar el progreso de la nefropatía en el sujeto. Un aumento en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en la segunda muestra de orina, en comparación con el de la primera muestra de orina, indica que se agrava la nefropatía en el sujeto. Cuando el sujeto es un ser humano con nefropatía en fase inicial, la segunda muestra de orina se obtiene 6 a 12 meses después de que se haya obtenido la primera muestra de orina. Para un sujeto humano con nefropatía en fase tardía, la segunda muestra de orina se puede obtener 3 a 6 meses después de la primera muestra de orina. Cuando se aplica este método a un animal de laboratorio, la segunda muestra de orina se puede obtener 2 a 24 semanas después de que se haya obtenido la primera muestra de orina.

50 Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para controlar la eficacia de un tratamiento de la nefropatía en un paciente con nefropatía, que incluye (a) determinar un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores anteriores en una muestra de orina del paciente con nefropatía antes del tratamiento, (b) determinar un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en una muestra de orina del paciente después del tratamiento y (c) evaluar la eficacia del tratamiento basándose en un cambio en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores después del tratamiento. Se encuentra que el tratamiento es eficaz cuando el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores después del tratamiento permanece igual o disminuye en comparación con el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores antes del tratamiento.

Esta invención proporciona también un método para evaluar la toxicidad renal de un agente, que incluye (a) obtener una pluralidad de muestras de orina de un sujeto tratado con un agente en diversos momentos durante el tratamiento, (b) determinar en cada una de las muestras de orina un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores anteriores y (c) evaluar la toxicidad renal del agente basándose en un cambio en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores durante el tratamiento. Un aumento en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en el curso del tratamiento indica que el agente es tóxico para el riñón. El agente puede ser un compuesto (por ejemplo, un fármaco o un candidato a fármaco), un producto de hierba medicinal y un producto alimenticio.

Esta invención proporciona además un kit útil en cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Este kit contiene un primer anticuerpo que se une específicamente al receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y un segundo anticuerpo que se une específicamente a alfa-1-glicoproteína ácida. Ambos anticuerpos pueden ser moléculas de inmunoglobulina enteras. En un ejemplo, este kit contiene solamente anticuerpos específicos para antígenos que se van a detectar (por ejemplo, biomarcadores asociados a la nefropatía) en la práctica de uno de los métodos descritos en la presente memoria. Es decir, consiste esencialmente en dichos anticuerpos.

También dentro del alcance de esta invención se encuentra un anticuerpo aislado que se une específicamente a DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) o GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2). El término "anticuerpo aislado" utilizado en la presente memoria se refiere a un anticuerpo sustancialmente exento de moléculas asociadas de forma natural. Más específicamente, una preparación que contiene el anticuerpo se considera "un anticuerpo aislado" cuando las moléculas asociadas de forma natural en la preparación constituyen como máximo 20% en peso seco. La pureza puede ser medida por cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliácridamida y HPLC.

Cualquiera de los anticuerpos antes descritos se pueden utilizar en la fabricación de un kit útil en la práctica de cualquiera de los métodos de esta invención.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de varios ejemplos y también de las reivindicaciones que se acompañan.

Breve descripción de los dibujos

En primer lugar se describen los dibujos.

La Fig. 1 es un diagrama de cajas y bigotes para niveles combinados de un fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y un fragmento de alfa-1-glicoproteína ácida en controles sanos y en pacientes que presentan diversos tipos de nefropatía. Las abreviaturas ND, NlgA, NCH y GNM se refieren a nefropatía diabética, nefropatía por IgA, nefropatía por hierbas chinas y nefropatía glomerulonefritis membranosa, respectivamente. Los límites superior e inferior de las cajas marcan los valores del 25% y 75%, siendo las medianas las líneas que atraviesan las cajas. El bigote superior marca el mayor valor por debajo de la valla superior, que es el valor del 75% más 1,5 intervalos intercuartílicos y el bigote inferior marca el menor valor por encima de la valla inferior, que es el valor del 25% menos 1,5 intervalos intercuartílicos.

La Fig. 2 es un diagrama de cajas y bigotes para niveles combinados de un fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y un fragmento de alfa-1-glicoproteína ácida en controles sanos y pacientes que padecen NCH. Los límites superior e inferior de las cajas marcan los valores del 25% y 75%, siendo las medianas las líneas que atraviesan las cajas. El bigote superior marca el mayor valor por debajo de la valla superior, que es el valor del 75% más 1,5 intervalos intercuartílicos y el bigote inferior marca el menor valor por encima de la valla inferior, que es el valor del 25% menos 1,5 intervalos intercuartílicos.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la nefropatía basándose en el nivel de un biomarcador en la orina, que puede ser el receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos (número de acceso a GenBank CAQ08962; 10-Jan-2010), la alfa-1-glicoproteína ácida (número de acceso a GenBank EAW87416; 10-Jan-2010), un fragmento de ambas proteínas o una de sus combinaciones. El fragmento de ambas proteínas tiene una longitud mínima de diez aminoácidos y, preferiblemente, una longitud máxima de 120 a 200 aminoácidos. Por ejemplo, los fragmentos del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y de la alfa-1-glicoproteína ácida pueden contener hasta 125 y 191 residuos de aminoácidos, respectivamente. En un ejemplo, el fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos es DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y un fragmento de la alfa-1-glicoproteína ácida es GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2).

Cada uno de los biomarcadores de orina antes mencionados se pueden usar para diagnosticar cualquier tipo de nefropatía, incluyendo las relacionadas con la diabetes (es decir, nefropatía diabética), glomerulonefritis resultante de la deposición de IgA en los tejidos renales (es decir, nefropatía por IgA), inflamación (por ejemplo, glomerulonefritis membranosa), fibrosis renal inducida por hierbas chinas (es decir, nefropatía por hierbas chinas),

daño túbulointersticial crónico, que conducen a insuficiencia renal (es decir, nefritis intersticial crónica) y glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

Para realizar el método de diagnóstico de esta invención, se obtiene una muestra de orina de un sujeto que se sospecha que padece nefropatía y se determina entonces el nivel de cualquiera de los biomarcadores antes mencionados por métodos convencionales, por ejemplo, ELISA y transferencia de Western. Cuando el biomarcador es un péptido o una combinación de péptidos, su nivel se puede determinar por un ensayo de espectrometría de masas. El nivel del biomarcador en la orina se puede comparar entonces con un punto de referencia que representa el nivel del mismo biomarcador en la orina de un sujeto que no padece nefropatía. El punto de referencia se puede determinar por la práctica habitual basándose en el nivel representativo de un biomarcador en la orina de un grupo de pacientes con nefropatía frente al de un grupo de sujetos sin nefropatía. Por ejemplo, puede ser el punto medio entre los niveles medios de estos dos grupos. Cuando el nivel del biomarcador en la orina del sujeto es mayor que el punto de referencia, indica que el sujeto tiene nefropatía.

Cuando sea necesario, los pacientes que tienen nefropatía con cambios mínimos (NCM) o enfermedad con cambios mínimos (ECM) se pueden utilizar como grupos de control para determinar el punto de referencia antes mencionado. En general, los pacientes con NCM y ECM presentan proteinuria obvia pero funciones renales normales.

Cuando se usa un fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o un fragmento de la alfa-1-glicoproteína ácida, se puede aplicar el método de diagnóstico de esta invención para detectar la nefropatía incipiente cuando no es detectable la presencia de proteínas (por ejemplo, albúmina) en la orina, es decir, no hay proteinuria.

En otro aspecto, esta invención se refiere a un método para seguir el progreso de la nefropatía en un sujeto basándose en cualquiera de los biomarcadores en la orina antes descritos. Para realizar este método, se pueden obtener dos muestras de orina de un sujeto en un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, 2 semanas a 12 meses) y examinarlas para determinar los niveles de uno de los biomarcadores antes descritos en la orina. Si el nivel del biomarcador en la orina en la muestra de orina obtenida posteriormente es mayor que el de la muestra de orina obtenida anteriormente, indica que la nefropatía progresa en el sujeto.

El método de control se puede aplicar a un sujeto humano que padece nefropatía o en riesgo de padecerla. Cuando el sujeto humano está en riesgo de padecer nefropatía o en fase inicial, el nivel del biomarcador en la orina se puede determinar una vez cada 6 a 12 meses para controlar el progreso de la nefropatía. Cuando el sujeto humano está ya en una fase tardía de nefropatía, se prefiere que el nivel del biomarcador en la orina sea determinado una vez cada 3 a 6 meses. Aunque tengan lesiones renales, los pacientes con nefropatía en fase inicial son generalmente asintomáticos y presentan funciones renales normales. Estos pacientes están en riesgo de progreso de la nefropatía. La nefropatía en etapa tardía se caracteriza por una disminución progresiva de la TFG (por ejemplo, <15 mL/minuto/1,73 m²).

El método de control antes descrito también es aplicable a un animal de laboratorio, siguiendo procedimientos habituales, para estudiar la nefropatía. Preferiblemente, el animal de laboratorio se examina una vez cada 2 a 24 semanas para determinar el nivel de uno de los biomarcadores antes mencionados en la orina. Un aumento en el nivel del biomarcador con el tiempo indica que la enfermedad progresa en el animal.

Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para evaluar la eficacia de un tratamiento de nefropatía en un sujeto que lo necesite (es decir, un paciente humano de nefropatía o un animal de laboratorio con lesiones renales). En este método, los niveles de uno de los biomarcadores antes descritos en la orina se determinan antes, durante y/o después del tratamiento. Si el nivel del biomarcador en la orina permanece igual o disminuye durante el curso del tratamiento, indica que el tratamiento es eficaz.

Cualquiera de los biomarcadores en la orina también se puede utilizar para controlar la toxicidad renal de un agente diana, es decir, si un agente induce una lesión renal. El agente diana puede ser cualquier compuesto o composición para administración humana. Los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, compuestos químicos que pueden ser fármacos (por ejemplo, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos) o candidatos a fármacos, productos o suplementos alimenticios y suplementos de hierbas medicinales. La toxicidad renal de un agente diana está indicada por su capacidad para aumentar con el tiempo el nivel de un biomarcador en la orina.

También se describe en la presente memoria un kit útil para realizar cualquiera de los métodos antes descritos. Este kit contiene al menos dos anticuerpos, uno específico para el receptor-2 similar a Ig, por ejemplo, capaz de unirse a su fragmento DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) o cualquier epítipo contenido en él, y el otro específico para la alfa-1-glicoproteína ácida, por ejemplo, capaz de unirse a su fragmento GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2) o cualquier epítipo contenido en él. En un ejemplo, el kit incluye dos anticuerpos diferentes (es decir, un anticuerpo de recubrimiento y un anticuerpo de detección) que se unen al mismo biomarcador. Típicamente, el anticuerpo de detección se conjuga con una molécula que emita una señal detectable, ya sea por sí misma o mediante la unión a otro agente. El término "anticuerpo" usado en la presente memoria se refiere a una inmunoglobulina entera o a uno de sus fragmentos, tal como Fab o F(ab')₂ que

retiene la actividad de unión al antígeno. Puede existir en la naturaleza o haber sido modificado por ingeniería genética (por ejemplo, anticuerpo monocatenario, anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado).

Los anticuerpos incluidos en el kit de esta invención se pueden obtener de proveedores comerciales. Alternativamente, se pueden preparar por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Para producir anticuerpos contra un biomarcador particular como los enumerados anteriormente, el marcador, acoplado opcionalmente a una proteína portadora (por ejemplo, KLH), se puede mezclar con un adyuvante y ser inyectado en un animal hospedante. Los anticuerpos producidos en el animal se pueden purificar a continuación por cromatografía de afinidad. Los animales hospedantes comúnmente empleados incluyen conejos, ratones, cobayas y ratas. Varios adyuvantes que se pueden utilizar para aumentar la respuesta inmunológica dependen de la especie hospedante e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, CpG, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. Adyuvantes humanos útiles incluyen BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. En el suero del animal inmunizado están presentes anticuerpos policlonales, es decir, poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales, es decir, poblaciones homogéneas de moléculas de anticuerpos, se pueden preparar utilizando tecnología de hibridoma estándar (véase, por ejemplo, Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler et al. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 292; y Hammerling et al. (1981) *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y.). En particular, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo tales como los descritos por Kohler et al. (1975) *Nature* 256, 495 y la Patente de EE.UU. No. 4.376.110; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4, 72; Cole et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026, y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al. (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invención se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. La capacidad de producir altos títulos de anticuerpos monoclonales *in vivo* hace que sea un método de producción particularmente útil.

Por otra parte, los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitación, fragmentos F(ab')₂, que se pueden producir por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂.

Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes realizaciones específicas deben, por tanto, ser interpretadas como meramente ilustrativas y en modo alguno limitativas del resto de la descripción.

Ejemplo 1: Diagnóstico de la nefropatía utilizando como biomarcador receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o alfa-1-glicoproteína ácida

Material y Métodos

(i) Sujetos

En este estudio participaron los siguientes grupos de sujetos humanos:

- (a) donantes sanos: sin diabetes mellitus y con funciones renales normales,
- (b) pacientes con DM: que tienen diabetes mellitus tipo 2, pero no nefropatía,
- (c) pacientes con ND: que tienen nefropatía diabética,
- (d) pacientes con ND y uremia: ND asociada a la uremia,
- (e) pacientes con NIgA: que tienen nefropatía por IgA,
- (f) pacientes con GNM: que tienen glomerulonefritis membranosa,
- (g) pacientes con NCH: que tienen nefropatía inducida por hierbas chinas, y
- (h) pacientes con NIC: que tienen nefritis intersticial crónica.

Las características clínicas de los donantes sanos y los pacientes se resumen a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Características de los pacientes

	Sanos	DM	ND	ND y uremia	NlgA	GNM	NCH	NIC
Edad, media (DT)	67,94 (12,30)	57,33 (10,52)	72,38 (7,44)	58,14 (12,79)	28,33 (12,31)	38,00 (13,11)	47,42 (10,43)	59,88 (7,62)
Mujeres, n (%)	6 (37,5)	2 (33,33)	1 (12,5)	2 (28,57)	4 (44,44)	2 (66,67)	14 (73,68)	4 (50,00)
Creatinina sérica (mg/dL), media (DT)	0,86 (0,14)	0,85 (0,24)	1,39 (0,49)	4,23 (4,65)	1,03 (0,48)	0,60 (0,20)	5,39 (5,39)	3,54 (2,28)
MDRD_S_GFR, media (DT)	86,28 (13,19)	106,86 (70,47)	58,60 (20,75)	58,02 (61,53)	104,29 (56,19)	144,96 (55,15)	22,70 (17,07)	24,32 (15,91)

(ii) Ensayo MALDI-MS

Se recogieron muestras de orina a la mitad de la micción de los grupos de sujetos humanos antes citados por la mañana temprano. Estas muestras de orina tanto de donantes sanos como de pacientes, mezcladas con inhibidores de la proteasa, se analizaron por MALDI-TOF-MS. Se identificaron los candidatos peptídicos que estaban presentes diferencialmente en el grupo de donantes sanos y en los diversos grupos de pacientes en comparación con los patrones de polipéptidos entre cada grupo de pacientes y el grupo de donantes sanos, teniendo en cuenta la evaluación estadística de los parámetros demográficos y de las muestras. Estos péptidos se purificaron y se determinaron sus secuencias de aminoácidos por la tecnología habitual.

(iii) Ensayo de transferencia de Western

Se realizó el análisis por transferencia de Western usando anticuerpos específicos para el fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y el fragmento de la alfa-1-glicoproteína ácida GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2), siguiendo la tecnología habitual. Los resultados se normalizaron frente al nivel de creatinina o proteína en la misma muestra.

(iv) ELISA

Las muestras de orina se mezclaron con inhibidores de proteasa y se diluyeron 1:100 con un tampón de dilución y las muestras de suero se diluyeron 1:10. Las muestras diluidas se colocaron por triplicado en placas para ELISA. Las concentraciones del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y de la alfa-1-glicoproteína ácida se determinaron por el método ELISA sándwich estándar y se normalizaron frente al nivel de creatinina o proteína en la misma muestra.

Resultados

Por medio del ensayo MALDI-MS antes descrito, se detectaron los péptidos DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2) en muestras de orina de pacientes con nefropatía a niveles mucho mayores en comparación con las muestras de orina de los controles sanos. Las SEQ ID NO:1 y 2 son fragmentos del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y de la alfa-1-glicoproteína ácida, respectivamente. Las tasas positivas de estos dos péptidos en el grupo de donantes sanos y en los diferentes grupos de pacientes se muestran a continuación en la Tabla 2:

Categorías	Grupos	Número de pacientes	Tasas positivas de la SEQ ID NO:2 N (%)	Tasas positivas de la SEQ ID NO:1 N (%)
Sanos	Sanos	19	0 (0%)	1 (5,3%)
Nefropatía	DM	7	0 (0%)	2 (28,6%)

Categorías	Grupos	Número de pacientes	Tasas positivas de la SEQ ID NO:2 N (%)	Tasas positivas de la SEQ ID NO:1 N (%)
diabética	ND	8	2 (25%)	8 (100%)
	ND y uremia	11	6 (54,5%)	8 (72,7%)
Nefropatía mediada por complejos inmunológicos	NIgA	12	0 (0%)	8 (66,7%)
	GNM	3	0 (0%)	2 (66,7%)
Nefritis intersticial	NCH	18	10 (55,6%)	17 (94,4%)
	NIC	7	3 (42,9%)	7 (100%)
Total		85	21	53

Los resultados muestran también que los niveles en la orina de estos dos péptidos en pacientes con nefropatía no están correlacionados con la proteinuria, lo que indica que se pueden utilizar para detectar lesiones renales antes de la aparición de las proteínas, en particular la albúmina, en la orina.

- 5 Además, se encontró que los niveles en la orina de estos dos péptidos en pacientes con nefropatía presentan correlaciones inversas con la TFG, lo que indica que pueden servir como marcadores para controlar los cambios de la función renal y el progreso de la nefropatía.

10 Por medio de los ensayos ELISA y de transferencia de Western antes descritos, se encontró que el receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y la alfa-1-glicoproteína ácida estaban presentes diferencialmente en muestras de orina de pacientes con nefropatía (por ejemplo, pacientes que tenían nefropatía inducida por hierbas chinas) frente a las muestras de orina de los controles sanos. Véase la Tabla 3 siguiente. Más específicamente, la presencia de cada proteína en muestras de orina de los controles sanos fue escasamente detectable; mientras que se encontró un nivel mayor de la proteína en muestras de orina de pacientes con nefropatía. Este resultado indica que cada proteína puede ser utilizada como marcador para el diagnóstico de la nefropatía.

Tabla 2. Relaciones entre la alfa-1-glicoproteína ácida y la creatinina en diversos grupos de pacientes								
	Sanos	DM	ND	NIgA	GNM	NCH	NIC	ND y uremia
AGP/Cr (ng/mg) x 1000, media (DT)	2,57 (2,52)	2,91 (1,68)	29,18 (30,93)	15,52 (20,87)	139,51 (137,53)	19,55 (39,36)	51,31 (65,46)	97,13 (140,60)

15 **Ejemplo 2:** Diagnóstico de la nefropatía utilizando como biomarcador la combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y alfa-1-glicoproteína ácida

20 Los niveles del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y de alfa-1-glicoproteína ácida en la orina tanto de controles sanos como de pacientes con nefropatía (incluyendo pacientes con nefropatía diabética, uremia, nefropatía por IgA, nefropatía inducida por hierbas chinas y la nefropatía glomerulonefritis membranosa) se determinaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior.

25 Como se muestra en la Fig. 1, el nivel combinado de los marcadores de las dos proteínas antes mencionadas era mucho mayor en todos los tipos de pacientes con nefropatía en comparación con el de los controles sanos (AUROC = 0,93). Esto indica que el receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y la alfa-1-glicoproteína ácida, en combinación, se pueden utilizar como un biomarcador fiable para el diagnóstico de la nefropatía con alta sensibilidad y especificidad.

Se encontró que la combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y la alfa-1-glicoproteína ácida en la orina eran particularmente fiables en la detección de la nefropatía inducida por hierbas chinas. Véase la Fig. 2. El

área bajo la curva característica de operación del receptor (AUROC) obtenida en este estudio alcanza 1,0, lo que indica que la exactitud del diagnóstico es del 100% cuando se utiliza este biomarcador para el diagnóstico de pacientes con nefropatía inducida por hierbas chinas.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Yeh Mary Ya-Ping
 Tseng, Tzu-Ling
 Lu, Ching-fang
 Lin Wei-Ya
 Hsu, Tsai-Wei
 Chen, Yi-Ting
 Yang, Chwei-Shiun

 10 <120> BIOMARCADORES ASOCIADOS A LA NEFROPATÍA
 <130> 70006 a 009001
 <150> 61/147.785
 <151> 28-01-2009
 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.5
 15 <210> 1
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos
 <400> 1
 Asp Phe Leu Glu Leu Leu Val Lys Gly Thr Val Pro Gly Thr Glu Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Phe Asp Ala Pro
 20
 <210> 2
 <211> 32
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> fragmento de la alfa-1-glicoproteína ácida
 <400> 2
 Gly Gln Glu His Phe Ala His Leu Leu Ile Leu Arg Asp Thr Lys Thr
 1 5 10 15
 Tyr Met Leu Ala Phe Asp Val Asn Asp Glu Lys Asn Trp Gly Leu Ser
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico de la nefropatía en un sujeto, que comprende:

obtener una muestra de orina de un sujeto que se sospecha que tiene nefropatía,

determinar en la muestra de orina un nivel de un biomarcador o de una combinación de biomarcadores seleccionado del grupo que consiste en:

(i) receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos, y

(ii) una combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos y de la alfa-1-glicoproteína ácida o uno de sus fragmentos,

en donde el fragmento de receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos es DFLELLVKGTVPGEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y el fragmento de alfa-1-glicoproteína ácida es GQEHFAHLLILRDTKYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2); y

evaluar si el sujeto tiene nefropatía basándose en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores,

en donde un aumento en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores, en comparación con un punto de referencia que representa el nivel del mismo biomarcador o de la combinación de biomarcadores en un sujeto sin nefropatía, indica que el sujeto tiene nefropatía, en donde el punto de referencia es el punto medio entre el nivel medio del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en un grupo de pacientes con nefropatía y el de un grupo de sujetos sin nefropatía.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores se determina por un ensayo de espectrometría de masas o un ensayo inmunológico.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el ensayo de espectrometría de masas se selecciona del grupo que consiste en espectrometría de masas en la que la ionización se efectúa mediante desorción por láser asistida por matriz (MALDI-MS), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de líquidos-doble espectrometría de masas (LC-MS/MS).

4. El método de la reivindicación 2, en donde el ensayo inmunológico se selecciona del grupo que consiste en ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo fluorescente (FIA) e inmunoensayo luminiscente (LIA).

5. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un animal de laboratorio.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el biomarcador es el receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos.

8. El método de la reivindicación 1, en donde el biomarcador es el fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos.

9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde el sujeto no tiene proteinuria.

10. El método de la reivindicación 1, en donde la combinación de biomarcadores es la combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y la alfa-1-glicoproteína ácida.

11. El método de la reivindicación 1, en donde la combinación de biomarcadores es la combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y el fragmento de alfa-1-glicoproteína ácida.

12. El método de la reivindicación 1, en donde la combinación de biomarcadores es la combinación del fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y la alfa-1-glicoproteína ácida.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la combinación de biomarcadores es la combinación del fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y el fragmento de alfa-1-glicoproteína ácida.

14. El método de la reivindicación 10, 11, 12 o 13, en donde el sujeto no tiene proteinuria.

15. Un método para controlar el progreso de la nefropatía en un sujeto, que comprende:

obtener una primera muestra de orina de un sujeto que padece nefropatía,

determinar en la primera muestra de orina un nivel de un biomarcador o de una combinación de biomarcadores seleccionado del grupo que consiste en:

(i) receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos, y

(ii) una combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos y de la alfa-1-glicoproteína ácida o uno de sus fragmentos,

5 en donde el fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos es DFLELLVKGTVPGEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y el fragmento de alfa-1-glicoproteína ácida es

GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2);

obtener una segunda muestra de orina del sujeto 2 semanas a 12 meses después de que se haya obtenido la primera muestra de orina;

determinar en la segunda muestra de orina un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores; y

10 evaluar el progreso de la nefropatía en el sujeto,

en donde un aumento en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en la segunda muestra de orina, en comparación con la primera muestra de orina, indica que la nefropatía está agravada en el sujeto.

15 16. El método de la reivindicación 15, en donde el sujeto es un ser humano con nefropatía en fase inicial y la segunda muestra de orina se obtiene 6 a 12 meses después de que se haya obtenido la primera muestra de orina.

17. El método de la reivindicación 15, en donde el sujeto es un ser humano con nefropatía en fase tardía y la segunda muestra de orina se obtiene 3 a 6 meses después de que se haya obtenido la primera muestra de orina.

18. El método de la reivindicación 15, en donde el sujeto es un animal de laboratorio y la segunda muestra de orina se obtiene 2 a 24 semanas después de que se haya obtenido la primera muestra de orina.

20 19. Un método para controlar la eficacia de un tratamiento de la nefropatía en un sujeto que padece nefropatía, que comprende:

determinar un nivel de un biomarcador o de una combinación de biomarcadores en una muestra de orina del sujeto antes del tratamiento, seleccionándose el biomarcador o la combinación de biomarcadores del grupo que consiste en:

25 (i) receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos, y

(ii) una combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos y de la alfa-1-glicoproteína ácida o uno de sus fragmentos,

en donde el fragmento del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos es DFLELLVKGTVPGEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y el fragmento de la alfa-1-glicoproteína ácida es

30 GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2); y

determinar un nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en una muestra de orina del sujeto después del tratamiento;

evaluar la eficacia del tratamiento basándose en un cambio del nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores después del tratamiento,

35 en donde el tratamiento es eficaz si el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores después del tratamiento se mantiene sin cambios o disminuye en comparación con el nivel de antes del tratamiento.

20. Un método para evaluar la toxicidad renal de un agente, que comprende:

obtener una pluralidad de muestras de orina de un sujeto tratado con un agente en diversos momentos durante el tratamiento,

40 determinar en cada una de las muestras de orina un nivel de un biomarcador o de una combinación de biomarcadores seleccionado del grupo que consiste en:

(i) receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos, y

(ii) una combinación del receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos o uno de sus fragmentos y de la alfa-1-glicoproteína ácida o uno de sus fragmentos,

en donde el fragmento de receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos es DFLELLVKGTVPGTEASGFDAP (SEQ ID NO:1) y el fragmento de la alfa-1-glicoproteína ácida es

GQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLS (SEQ ID NO:2); y

- 5 evaluar la toxicidad renal del agente basándose en un cambio del nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores durante el tratamiento;

en donde un aumento en el nivel del biomarcador o de la combinación de biomarcadores en el curso del tratamiento indica que el agente es un tóxico para el riñón.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste en un compuesto, un producto de hierbas medicinales y un producto alimenticio.

- 10 22. Un kit para el diagnóstico de la nefropatía, que comprende un primer anticuerpo que se une específicamente al receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y un segundo anticuerpo que se une específicamente a la alfa-1-glicoproteína ácida.

23. El kit de la reivindicación 22, en donde el primero y segundo anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina enteras.

- 15 24. El kit de la reivindicación 22, en donde el kit consiste en un primer anticuerpo que se une específicamente al receptor-2 similar a Ig asociado a leucocitos y un segundo anticuerpo que se une específicamente a la alfa-1-glicoproteína ácida.

Fig. 1

Dos picos combinados (log 10)

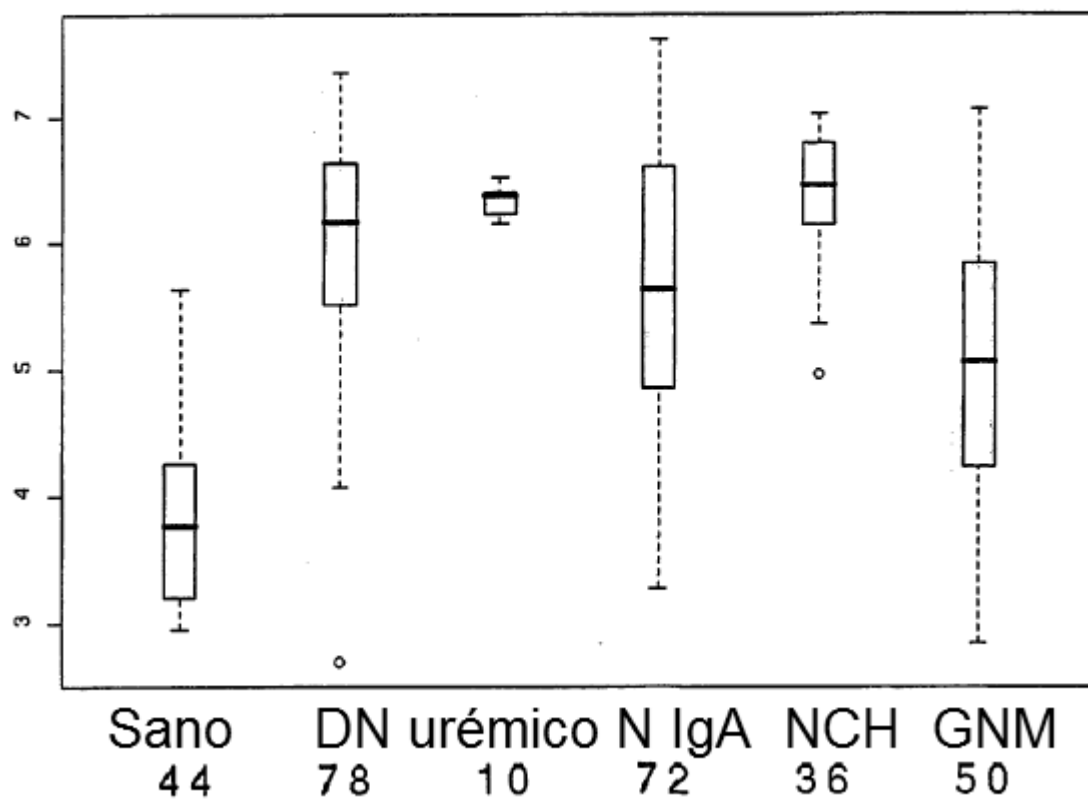


Fig. 2

Dos picos combinados (log 10)

